



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología reproductiva de *Argemone ochroleuca* ssp.
ochroleuca Sweet. (Papaveraceae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

SANDRA RIOS CARRASCO



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

Cd. Universitaria, D. F. 2015

1. Datos del alumno



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.

Rios
Carrasco
Sandra
044 55 61 52 36 15
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308270778

2. Datos del tutor

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

3. Datos del sinodal 1.

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2.

Dra.
Paula
Sosenski
Correa

5. Datos del sinodal 3.

Concepción
Martínez
Peralta

6. Datos del sinodal 4.

Javier Andrés
Juárez
Díaz

7. Datos del trabajo escrito

Biología reproductiva de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* Sweet.
(Papaveraceae)
77 p.
2015

A mis padres, mi mayor ejemplo, y quienes han estado conmigo apoyándome y animándome a continuar en todo momento.

A Luis y a Lulú, que me han hecho ver la vida con más humor para aligerar las cargas.

A César, mi compañero.

A mis amigos, Areli, Johanan, Brenda, Benjamín, Lalo, Mike, Alex y Fer quienes me han acompañado a lo largo de mi vida académica haciendo las clases más amenas.

A todos aquellos que se espinaron ayudándome a realizar este trabajo,

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de conocer la vida en toda la extensión de la palabra, al aceptarme en esta bella carrera.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por su apoyo invaluable durante el desarrollo de este trabajo y por la oportunidad que me ha dado para desenvolverme en el ámbito laboral.

Al M. en C. Aldebarán Camacho Velázquez, por su ayuda en el trabajo de campo y por introducirme al trabajo de laboratorio, enseñándome a trabajar responsablemente.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, a la Dra. Paula Sosenski Correa, a la Dra. Concepción Martínez Peralta y al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias a cargo de la Dra. Silvia Espinosa Matías, quién se encargó del procesamiento del material y la toma de fotografías al MEB.

Al Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias y a la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín por su colaboración en la toma de fotografías en Microscopía de Fluorescencia.

A la M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León por brindarme un espacio en el Taller de Plantas I y II de la Facultad de Ciencias, para sembrar las plantas usadas en el presente trabajo.

A la Dra. María Félix Ramos Ordoñez por su apoyo en el análisis estadístico.

Al M. en C. Arturo García Gómez por la identificación de los insectos.

Al P. de Biol. César Adrián González Martínez por la ilustración de las flores y por su ayuda en el trabajo de campo.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas y a todos sus integrantes por ayudarme a crecer profesional y personalmente.

Al Taller de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM: Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes, porque fue la base para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
Biología reproductiva en angiospermas	5
Sistemas de cruza	6
a) Sistemas de cruza xenógamos (entrecruza)	7
b) Sistemas de cruza autógamos (autocruza)	8
c) Sistemas de cruza mixtos	9
Dispersión de semillas	10
Biología reproductiva en Papaveraceae	11
Sistemas de autoincompatibilidad en Papaveraceae	11
Biología reproductiva del género <i>Argemone</i>	13
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Especie y población de estudio	16
Duración de la antesis, cambios florales y receptividad del estigma	18
Hercogamia y relación polen/óvulos (P/O)	18
Sistemas de cruza	19
Depresión endogámica	21
Crecimiento de tubos polínicos	21
Visitantes florales	22
Recompensas florales	23
Dispersión de semillas	24
RESULTADOS	25
Antesis, comportamiento floral y receptividad estigmática	25

Hercogamia y relación polen/óvulos	27
Sistemas de cruza	29
Pseudocleistogamia	29
Depresión endogámica	32
Crecimiento de tubos polínicos	34
Visitantes florales	40
Recompensas florales	41
Histoquímica de verticilos florales	44
Dispersión de semillas	47
DISCUSIÓN	48
Antesis floral	49
Hercogamia	49
Sistemas de cruza	49
Sistema de cruza mixto	50
Autogamia	51
Pseudocleistogamia	53
Entrecruza	54
Depresión endogámica	55
Visitantes florales	56
Recompensas florales	57
Crecimiento de tubos polínicos	59
Sistemas de autoincompatibilidad	60
Evolución de los sistemas de cruza en <i>A. ochroleuca</i> ssp. <i>ochroleuca</i>	62
Dispersión de semillas	63
CONCLUSIONES	65
LITERATURA CONSULTADA	66

RESUMEN

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* (Papaveraceae) cuenta con una amplia distribución en el territorio mexicano. La información acerca de la biología reproductiva de esta especie es escasa, y no se conocen los mecanismos que utiliza para perpetuarse y colonizar nuevos terrenos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la biología reproductiva de la especie, determinando los sistemas de cruce, su interacción con los visitantes florales y los polinizadores, así como los mecanismos de la dispersión de las semillas.

Para conocer los sistemas de cruce, se realizaron polinizaciones controladas, cuantificando la cantidad de frutos y de semillas formadas por tratamiento. Los resultados indican que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* carece de un sistema de incompatibilidad y presenta un sistema de cruce mixto; siendo la polinización cruzada el mecanismo por el cual se produce el mayor número de semillas y frutos comparado con la autogamia, la cual podría funcionar como un mecanismo de aseguramiento reproductivo por medio de la autopolinización y la pseudocleistogamia. Se detectó depresión endogámica en la población estudiada.

De las observaciones en campo de los visitantes florales y su comportamiento se registraron dos polinizadores, un himenóptero especialista (*Cryptalyra* sp.) y abejas generalistas (*Apis mellifera*.). La recompensa principal es el polen. Los lípidos presentes en los verticilos florales salen a través de estomas y podrían interpretarse como atrayentes florales, o bien como algún tipo de defensa contra herbivoría.

INTRODUCCIÓN

La variación en forma, en posición, en tamaño y en otras características presentes en las flores de diferentes grupos de angiospermas, tiene un papel importante en la reproducción sexual para incrementar el éxito reproductivo, que a su vez es el resultado de las presiones selectivas ejercidas por la diversidad de polinizadores (Castellanos *et al.*, 2004). Lo anterior está ligado a la colonización de nuevos lugares por medio de la producción y dispersión de las semillas (Allem, 2004; Barrett, 2011).

El estudio de la biología reproductiva de las plantas determina los mecanismos que promueven la reproducción y para entender el proceso que ha permitido el mantenimiento de las poblaciones (Barrett, 1998). Con base en esto, se plantea que la sobrevivencia de las poblaciones dependerá del éxito de las estrategias reproductivas presentes en las especies para aumentar el número de individuos de la población y continuar su perpetuación. Entre estas estrategias se encuentran la reproducción sexual y la asexual (Godinez-Álvarez *et al.*, 2008).

Los sistemas de cruce, definidos como el modo en que se da el encuentro entre gametos y la forma de transmisión de genes de una generación a otra a través de la reproducción sexual, son mecanismos clave en la historia de vida de los organismos, ya que determinan la calidad genética de la descendencia, y la adecuación de los individuos (Barrett, 2014). Las características morfológicas de las flores influyen también en la manera en la que se lleva a cabo la

reproducción (Barrett, 2014). Además, por medio de recompensas, atraen polinizadores, cuya actividad participa de manera importante en el proceso de la polinización (Steffan-Dewenter *et al.*, 2005; Losey y Vaughan, 2006).

Otros de los mecanismos que modulan la reproducción de las plantas evitando la formación de semillas por autocruzadas, son los sistemas de autoincompatibilidad, que se definen como la imposibilidad de una planta para producir cigotos a partir de la autopolinización (Lundqvist, 1964; Allen y Hiscock, 2008). Este mecanismo se basa en la capacidad heredada de la flor para rechazar el polen propio promoviendo la variabilidad genética en las poblaciones (de Nettancourt, 1977).

Aunque la familia Papaveraceae se destaca por incluir especies que presentan un sistema de autoincompatibilidad gametofítico, lo cual supone que éstas deberían reproducirse por entrecruzamiento, dentro de esta familia existen algunas especies sin información sobre los mecanismos reproductivos, pero se sabe que dichas especies presentan una amplia distribución. *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* es una papaverácea ampliamente distribuida en México (Calderón de Rzedowski, 1991), de la cual se desconocen los mecanismos reproductivos que utiliza para su perpetuación.

El presente estudio contribuye al conocimiento de la biología reproductiva de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. Especialmente, aporta información sobre los sistemas de cruce, la posible presencia de un sistema de autoincompatibilidad, tal y como ocurre con algunas especies de la familia a la que pertenece.

También se generaron datos sobre sus estrategias reproductivas y de la dispersión de sus semillas, que forman parte de los componentes que permiten el establecimiento, la perpetuación y la ampliación de la distribución de una especie.

ANTECEDENTES

Biología reproductiva en angiospermas

La reproducción de las plantas puede llevarse a cabo de manera asexual (generación de nuevos individuos con la misma carga genética) o sexual (generación de nuevos individuos con diferente carga genética). La reproducción sexual involucra la capacidad que tienen los organismos de producir gametos, los cuales se fusionan en el evento conocido como fecundación (Gurevitch *et al.*, 2002).

Para que la fecundación se lleve a cabo, los gametos masculinos deben transportarse desde las anteras (órganos masculinos) hacia el estigma (órgano femenino). Esta transferencia se llama polinización (Domínguez y Pérez, 2013).

La morfología de los órganos sexuales influye directamente en la fecundación y la polinización. El gineceo es de vital importancia ya que interviene en la adhesión y germinación del grano de polen, además protege, nutre y guía al tubo polínico para llegar al ovario y fecundar a los óvulos (Harder y Routley, 2006; Vázquez, 2013). También se encarga del reconocimiento de los granos de polen, cuya función se relaciona directamente con los sistemas de autoincompatibilidad. La observación de estigmas con polen autógeno y la llegada de tubos polínicos hacia el ovario permite intuir la presencia o ausencia de un sistema de autoincompatibilidad (Cruz y Cruz, 2013).

Las características individuales de las flores influyen en el sistema de cruce de las plantas. Entre estas características se encuentran la disposición de

los verticilos sexuales (androceo y gineceo) en la flor, en los individuos y en las poblaciones. De este modo, pueden presentarse flores hermafroditas y flores unisexuales, es decir, flores femeninas y flores masculinas (Bernardello *et al.*, 2001).

Cuando las poblaciones están formadas por individuos con flores unisexuales, se asegura la reproducción cruzada, pero en las poblaciones con individuos hermafroditas, cuya ocurrencia se encuentra en el 72% de las angiospermas, han surgido otras estrategias reproductivas que promueven la entrecruza (Pierre-Olivier, 2012).

Sistemas de cruza

Los sistemas de cruza involucran los patrones de dispersión del polen y la manera en la cual los gametos masculinos se fusionan con los femeninos (Barrett, 1995, 2014).

Para que la fecundación se lleve a cabo, se depende de varios factores, tales como la distribución del sexo en las flores y en los individuos, de la dispersión del polen, de la presencia de algún sistema de incompatibilidad (Barrett, 1998), así como del tiempo de receptividad del estigma, de la presencia y de la conducta de los polinizadores (Kephart *et al.*, 1999) y de las recompensas que presentan las flores (Carrió *et al.*, 2008).

Por otra parte, los sistemas de cruza ayudan a entender la expresión sexual de las plantas, relacionados a su vez con la morfología y la funcionalidad de los verticilos sexuales y con la presencia/ausencia de sistemas de

incompatibilidad. Para conocer los sistemas de cruce de alguna especie, se realizan experimentos de polinización controlada (autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas). Se comparan la cantidad de frutos y de semillas y el porcentaje de germinación de semillas de cada tratamiento para conocer si la población presenta depresión por endogamia o no (Lande y Schemske, 1985; Husband y Schemske, 1996; Ruan *et al.*, 2009; Mandujano *et al.*, 2010).

a) Sistemas de cruce xenógamos (entrecruza)

La xenogamia o reproducción cruzada ocurre cuando el polen de una flor es transportado al estigma de otra flor de diferente individuo (Geber *et al.*, 1999; Tepedino *et al.*, 2010).

Entre las características que posee la flor y que ayudan a promover el entrecruzamiento se encuentran: 1) la hercogamia, que implica una separación espacial de los sexos en una misma flor; 2) la dicogamia o separación temporal de los sexos (Barrett, 2002); 3) la autoincompatibilidad, un mecanismo genético para rechazar el polen propio (Jiménez-Durán y Cruz-García, 2011). 4) la heterostilia, que se refiere al polimorfismo en los verticilos sexuales, especialmente hay una hercogamia recíproca entre la altura del estigma y los estambres, así como un sistema de incompatibilidad establecida; y 5) la dioecia, que se refiere a la máxima separación de los sexos en individuos diferentes (Martínez y Armendáriz, 2010). Todo lo anterior se consideran adaptaciones que confieren a las especies hermafroditas una manera de promover la fecundación

cruzada, y de esta manera generar una mayor variabilidad genética en las poblaciones (Stebbins, 1970).

b) Sistemas de cruce autógamos (autocruza)

La autogamia ocurre cuando el polen de una flor es transportado al estigma de la misma flor y fecunda los óvulos. La geitonogamia (otra modalidad de autocruza) se presenta cuando el polen de una flor fecunda a los óvulos de otra flor pero del mismo individuo. Para que la autogamia y la geitonogamia ocurran, es requisito indispensable que no existan sistemas de incompatibilidad.

La evolución de la autogamia a partir de altos niveles de entrecruza, es la transición más común en los sistemas de cruce de los organismos hermafroditas. Estos cambios influyen en la asignación de los sexos, alterando así, las historias de vida (Barrett, 2014). Las desventajas del sistema autógamo son los efectos reflejados en la adecuación a través de la depresión por endogamia, que se entiende por la reducción en la viabilidad y/o fertilidad de la descendencia autógama. Resulta principalmente por la expresión de alelos deletéreos recesivos en genotipos homocigotos, cuya expresión es mayor en poblaciones con alta frecuencia de autogamia (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

La ventaja que adquieren los individuos que se reproducen por autogamia, es la producción de semillas cuando las condiciones de entrecruza no son favorables. También ocurre fijación de genotipos completos a partir de la

transmisión doble de genes (Fisher, 1941). Sin embargo, la condición para que la autogamia se lleve a cabo, es que las plantas sean autocompatibles.

La producción de semillas por autogamia permite aumentar el número de individuos en una población aún con baja densidad (Barrett, 2014), siempre y cuando no haya depresión endogámica (Husband y Schemske, 1996).

c) Sistemas de cruza mixtos

Algunas especies hermafroditas presentan sistemas mixtos, lo cual se refiere a la capacidad de producir semillas tanto por autofecundación como por entrecruzamiento (Goodwillie *et al.*, 2005; Ruan *et al.*, 2009).

Los sistemas mixtos han sido considerados como estados transitorios, ya que se basan en características que promueven el entrecruzamiento y aseguran el éxito reproductivo por medio de la autogamia (Carrió y Güemes, 2013). El mantenimiento de los sistemas mixtos radica en la labilidad que presentan las plantas al modular el tiempo de autopolinización con respecto a la entrecruza. Por ejemplo, la autopolinización y la polinización cruzada se pueden llevar a cabo simultáneamente permitiendo la competencia del polen. Cuando se agotan las oportunidades de entrecruzamiento, ocurre la autopolinización retardada, cuyo mecanismo siempre resulta ventajoso (Lloyd, 1979).

La evolución de la entrecruza hacia la autogamia se considera la transición evolutiva más común en la reproducción de las plantas (Stebbins,

1974; Barrett, 2014). Sin embargo, las especies que se reproducen por autogamia pueden presentar depresión por endogamia, en donde la población se ve afectada por la baja cantidad de semillas producidas, o por la muerte de los cigotos, por medio de la acumulación de mutaciones, o bien de la formación de homocigotos con genes deletéreos; esto también se conoce como purga genética. La función de la purga genética es deshacerse de los individuos que probablemente se desempeñarán con menor eficiencia que aquellos resultantes de la reproducción cruzada (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987).

Dispersión de semillas

La dispersión de las semillas forma parte fundamental de la biología reproductiva de las plantas. La morfología de la semilla, por medio del desarrollo de estructuras especializadas, se asocia con el mecanismo de dispersión, que a su vez define el nuevo sitio de establecimiento, ya sea a corta o a larga distancia (Dalling, 2002; Pannell, 2006).

La importancia de la dispersión está en que define la distribución fenotípica de las poblaciones. Ésta, a largo plazo, influye en los sistemas de autoincompatibilidad (Baker, 1967) y en el sistema de cruza, cuya ocurrencia depende las interacciones bióticas y abióticas de la zona (Pannell, 2006).

Biología reproductiva en Papaveraceae

La familia Papaveraceae pertenece al orden Ranunculales (APG III, 2009). Comprende 25 géneros y 200 especies cosmopolitas que presentan diferencias morfológicas florales asociadas a los sistemas de cruza (Petenatti y del Vitto, 2000; Hidalgo y Gleissberg, 2010).

La información sobre la biología reproductiva en la familia Papaveraceae es escasa. Se han realizado pocos estudios acerca de cómo la forma de la flor, el color y la producción de néctar como recompensa, influyen en el tipo y el comportamiento de los polinizadores (Ohara y Higashi, 1994). Por otra parte, los sistemas de autoincompatibilidad son parte fundamental de la biología reproductiva y aunque algunas especies de Papaveraceae han sido estudiadas para comprender los mecanismos moleculares que regulan dichos sistemas, no existe información que detalle su biología reproductiva (Paape *et al.*, 2011).

Sistemas de autoincompatibilidad en Papaveraceae

La autoincompatibilidad es un mecanismo presente en 71 familias de angiospermas que permite al pistilo rechazar el polen propio y aceptar el de individuos con alelos diferentes (Allen y Hiscock, 2008). Esto favorece el entrecruzamiento y evita la depresión por endogamia. Las especies de la familia Papaveraceae con sistema de autoincompatibilidad que se conocen hasta ahora son, *Platystemon californicus* (Hannan, 1981), *Eschscholzia californica*, *Papaver*

rhoeas, *Lamprocapnos spectabilis*, *Argemone munita* (Bilinski y Kohn, 2012) y *Corydalis ambigua* (Ohara y Higashi, 1994).

Papaver rhoeas es la planta modelo con la que ampliamente se ha estudiado el sistema de autoincompatibilidad gametofítico, en el que el grano de polen es identificado por su fenotipo y genotipo haploides, como incompatible y el rechazo del polen se da a nivel del estigma, a diferencia de especies con sistema de incompatibilidad gametofítico de Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae, donde el rechazo del polen (específicamente el tubo polínico incompatible) se da a nivel del estilo (de Nettancourt, 1997, 2001).

El rechazo del grano de polen en las solanáceas, las rosáceas y las plantagináceas se lleva a cabo por medio de la acción de S-RNasas, codificadas en el *locus S*, donde se regula genéticamente el reconocimiento y el rechazo del polen. Las S-RNasas identificaron proteínas estilares que forman complejos con otras proteínas estilares y degradan el RNA del tubo polínico. Sin embargo, en el sistema de AI de las Papaveraceae, el *locus S* codifica a las proteínas S, ahora denominadas PrsS, las cuales se expresan de manera específica en el estigma (Foote, 1994; de Nettancourt, 1997, 2001; Wheeler *et al.*, 2009).

PrsS es una proteína de secreción que actúa de manera directa en el reconocimiento y en el rechazo del polen, siendo así la determinante S del pistilo. Esta proteína actúa como señal o ligando que interacciona con PrpS, que aparentemente es un receptor que se localiza en la membrana del polen (Wheeler *et al.*, 2009). Se sabe que PrpS también está codificado en el *locus S* y

que es la determinante S del polen (Wheeler *et al.*, 2009). En una cruz incompatible, PrsS interacciona con PrpS, provocando una cascada de señales mediada por un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (de Nettancourt, 1997, 2001; Kear y McClure, 2012).

Biología reproductiva del género *Argemone*

En la actualidad sólo existe evidencia de una especie de *Argemone* (*A. aurantiaca*) en la que se ha estudiado la biología floral asociada con la reproducción (Schneider y Nichols, 1984).

Dentro de Papaveraceae existen otras especies, que no solo son autocompatibles, sino también presentan compatibilidad interespecífica, provocando que diferentes especies formen híbridos, considerados ahora como especies diferentes o subespecies (Karnawat y Malik, 2011). De acuerdo a Ownbey (1958, 1961), estos híbridos tienen afinidades ecológicas diferentes. *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* es una especie híbrida alotetraploide (Malik y Grover, 1973) producto de la cruz *A. ochroleuca* X *A. mexicana* (Karnawat y Malik, 2011). Este híbrido es exitoso en ambientes perturbados, pero se desconocen las estrategias reproductivas que han favorecido su expansión a lo largo del territorio mexicano (Calderon de Rzedowski, 1991).

Debido a que la biología reproductiva se ha estudiado poco en la familia, es difícil encontrar información sobre los sistemas de autoincompatibilidad en el género *Argemone*. El único estudio se realizó en *A. munita*, que presenta un

sistema de autoincompatibilidad gametofítico, en donde el crecimiento del tubo polínico de la autocruza se detiene en la superficie del estigma, provisto de una capa densa de papilas (Bilinski y Kohn, 2012). Particularmente, se describe un tipo de semicompatibilidad, en donde los genes *S* se expresan únicamente en el tejido del estigma. Tienen un alelo reconocido como *S25b* que parece ser débil o no funcional. Al momento de realizar cruza entre individuos hermanos de *A. munita* que contienen este alelo, se forman frutos, pero en una baja proporción (Bilinski, 2010; Paape *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca*

Objetivos particulares

- Conocer la fenología de la flor, determinando la duración de la antesis, el tiempo de dehiscencia de las anteras y la receptividad del estigma.
- Determinar si las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presentan hercogamia midiendo las longitudes de los órganos sexuales.
- Establecer el sistema de cruce por medio de polinizaciones controladas.
- Evaluar si la población de estudio presenta depresión endogámica
- Describir la recepción del grano de polen en el estigma y el crecimiento del tubo polínico hasta la fecundación.
- Determinar el tipo de visitantes florales, su comportamiento y el promedio de visitas por flor.
- Analizar los verticilos florales para determinar si existen estructuras de recompensa y de qué tipo son.
- Determinar el modo de dispersión de las semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie y población de estudio

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* es una especie anual que florece de noviembre a junio (Fig. 1a), con un pico de floración de febrero a mayo (observación personal). Sus tallos y sus hojas son glaucos, están provistos de espinas rectas y de látex amarillo (Fig. 1b). Las flores son hermafroditas y solitarias. Los sépalos son tres y los pétalos varían de 4 a 6, de color crema. Posee de 40 a 75 estambres; el gineceo es sincárpico, el estigma es discoidal y carece de estilo (Fig. 1c). Aunque Schwarzbach y Kadereit (1999) describen un estilo corto. El fruto es una cápsula espinosa (Calderon de Rzedowski, 1991) y los granos de polen son tricolpados con apariencia reticulada (Quiroz-García *et al.*, 1994). *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* produce látex, del cual se extraen sustancias con actividad bactericida aplicables en medicina (Fletcher *et al.*, 1993; Alamri y Moustafa, 2010). Este látex también se utiliza empíricamente por los pobladores nativos de algunas regiones del país como cura contra infecciones oculares, enfermedades respiratorias y dermatológicas (Reyes *et al.*, 2011).

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* se distribuye en la zona centro de México a una altitud de 1700 – 2200 msnm, es de hábitat ruderal y arvense; actualmente no se considera una especie amenazada sino como maleza (Calderon de Rzedowski, 1991; Karlsson *et al.*, 2003; CONABIO, 2009).

Las población estudiada se encuentra en El ejido en la delegación Milpa Alta, Distrito Federal, México, con coordenadas 19°12'16.53"N, 98°58'49.32"O, en donde las plantas se encuentran creciendo a la orilla de los caminos, entre los cultivos de nopal de la especie *Opuntia ficus-indica* (INEGI, 2007) y en terrenos en descanso junto con otras malezas.

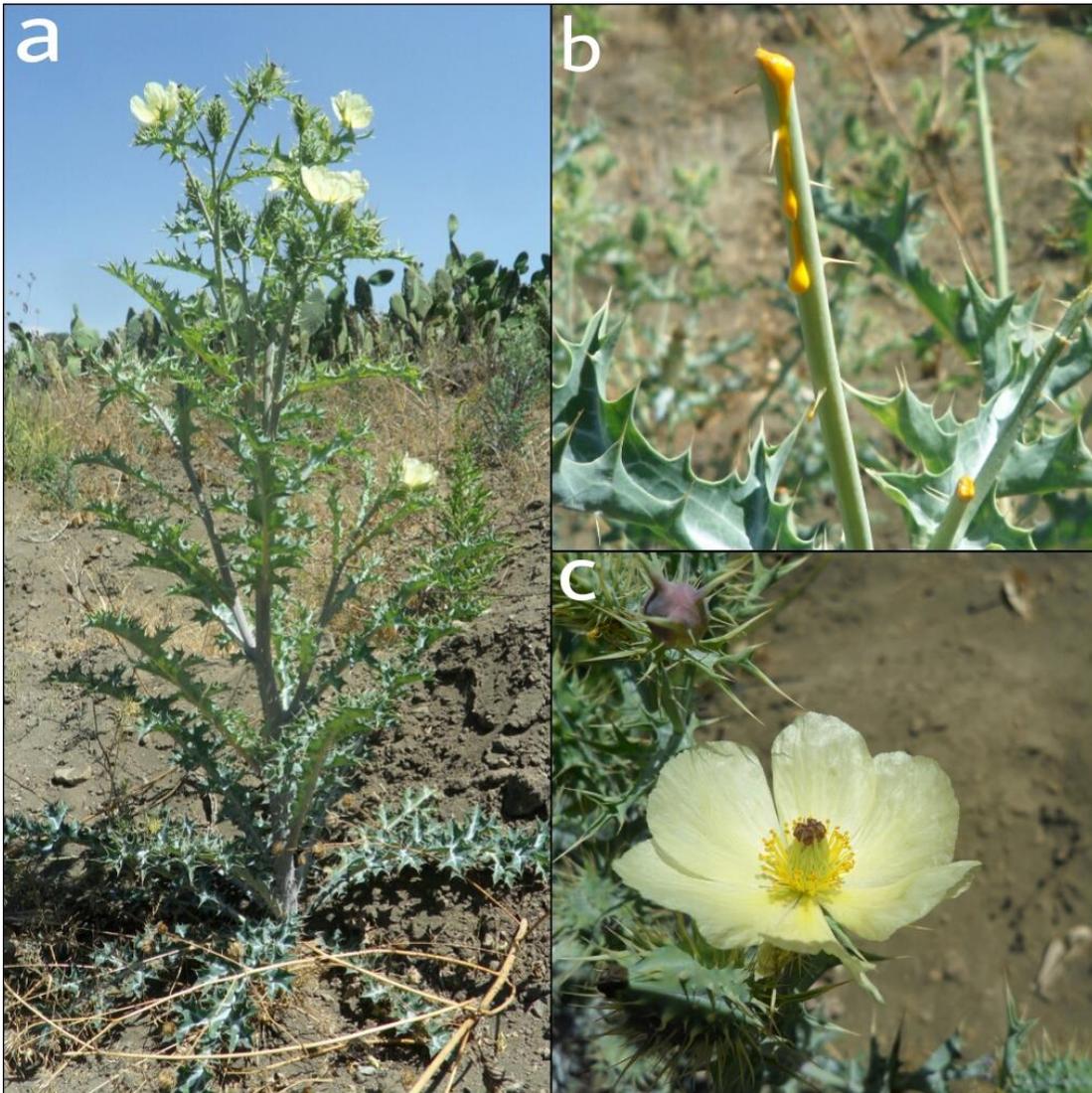


Figura 1. *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. **a.** Hábito herbáceo. **b.** Acercamiento al tallo mostrando el látex amarillo y hojas con espinas. **c.** Flor en anthesis y frutos jóvenes.

Duración de la antesis, cambios florales y receptividad del estigma

La duración de la antesis y los cambios florales, como la posición de las partes florales antes, durante y después de la antesis, incluyendo el tiempo de dehiscencia de las anteras, se monitorearon en parches florales durante marzo del 2013, desde las 8:00 am hasta las 6:00 pm durante siete días consecutivos, alternando los horarios de observación, un día de 8:00 am a 1:00 pm, y al siguiente de 1:00 a 6:00 pm.

La receptividad del estigma se analizó mediante el uso de peróxido de hidrógeno para detectar la actividad de la peroxidasa, una enzima presente en los estigmas receptivos, antes, durante y después de la antesis. Cuando los estigmas están receptivos se observa efervescencia. Para estar seguros de que la efervescencia se debe a la actividad de la peroxidasa de los estigmas y no a la presencia de polen, las flores se emascularon y se cubrieron antes del tratamiento con bolsas de organza (Dieringer y Cabrera, 2002). La prueba se realizó en un total de 30 flores durante tres días, se usaron 10 flores por cada día. El primer día, la receptividad se observó antes (en 5 flores) y después de la antesis (en 5 flores).

Hercogamia y relación polen/óvulos (P/O)

Se recolectaron un total 30 flores de diferentes plantas, que se fijaron en etanol al 70%. Se contó el número de óvulos, de granos de polen por flor y de estambres como a continuación se describe. La longitud de los estambres y la

de los pistilos se midieron con un vernier digital. A todos los parámetros se les calculó la desviación estándar (SD) y la media. Para saber si las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presentan hercogamia, se realizó una *t* de student pareada y una correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en Excel.

La relación de polen/óvulos (P/O) fue calculada según Cruden (1977) y se considera como un indicador conservativo de los sistemas sexuales en angiospermas. Este índice se obtuvo dividiendo el número de granos de polen entre el número de óvulos por flor. Los granos de polen que fueron contados se obtuvieron de anteras indehiscentes que se colocaron en tubos eppendorf con 100 μ l de agua destilada con detergente y se abrieron cuidadosamente con una aguja de disección. Después, se agitaron vigorosamente para homogenizar la mezcla y tomar una alícuota de 10 μ l, la cual se colocó sobre una cámara de Neubauer. El número de granos de polen que se contaron en los 10 μ l se multiplicaron por el factor de dilución para obtener el número de granos por antera, el resultado se multiplicó por el número de anteras por flor para obtener el total de granos de polen por flor. Se contaron dos anteras por flor en 30 flores y el resultado se promedió. Los óvulos se contaron en 30 flores a las cuales se les disectó el ovario para dejar expuestos todos sus óvulos.

Sistemas de cruza

Para conocer los sistemas de cruza se aplicaron los siguientes tratamientos de polinización. Las polinizaciones se realizaron de febrero a mayo en los años 2013 y 2014. Se utilizó un mínimo de 30 flores por tratamiento, usando dos flores por planta para el mismo tratamiento.

Autopolinización natural. Flores cubiertas no manipuladas, pero que excluyen a los polinizadores.

Autopolinización manual. El polen de una flor emasculada en botón, fue depositado sobre su propio estigma.

Polinización cruzada. Se aplicó el polen mezclado proveniente de otros individuos sobre flores emasculadas en botón pre-antesis. Posteriormente se embolsaron.

Apomixis. Se evita que el polen propio o extraño se deposite sobre un estigma. Las flores se emasculan en botón y posteriormente se cubre la flor. No se deposita polen sobre el estigma.

Polinización abierta. Las flores no se cubren ni se manipulan. Funciona como control.

Se utilizó una pinza de punta fina colocando el polen directamente de las anteras sobre el estigma correspondiente a cada tratamiento (excepto la autopolinización natural y la apomixis). Las flores se cubrieron con bolsas de organza. Después de 15 días, se contó el número de frutos formados en cada

tratamiento y el número de semillas por fruto para obtener un promedio. Con estos datos se obtuvo el porcentaje de frutos formados con respecto a la cantidad de flores polinizadas.

Para el análisis de los tratamientos, los resultados de semillas se sometieron a una prueba de comparación de muestras de Kruskal-Wallis y la comparación de Dunn, utilizando la corrección de Bonferroni para ajustar los datos, en el programa XLStat de Excel.

Depresión endogámica

Con los resultados de la autopolinización manual y polinización cruzada se calculó la depresión por endogamia utilizando la ecuación: $\delta = 1 - (w_s/w_o)$ de Lande y Schemske (1985) en donde w_s es el resultado de la autocruza y w_o el resultado de la entrecruza, tomando en cuenta la proporción de frutos formados y la proporción de semillas formadas para cada tratamiento. Finalmente, para obtener un resultado acumulativo se utilizó la siguiente ecuación: $\delta = 1 - [(w_{sa}/w_{oa}) \times (w_{sb}/w_{ob})]$ (Husband y Schemske, 1996), en donde a es la etapa de fruto y b la de semillas.

Crecimiento de tubos polínicos

Se procesó material para su observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) (López *et al.* 2005). Se observaron estigmas de flor en botón y en anthesis

para ubicar las zonas de recepción del polen. Se disectó el gineceo para observar y detallar la ruta del tubo polínico desde el estigma hasta los óvulos. También se realizaron cortes histológicos de estilos incluidos previamente en Paraplast© y se tiñeron con safranina-verde rápido en metilcelosolve para conocer su morfología y con vainillina al 10% en etanol absoluto para observar la presencia de taninos (López *et al.*, 2005) cuya función es proteger a las papilas estigmáticas y estilares de patógenos (Wink, 1988).

Para conocer si *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presenta una barrera a nivel de estigma o estilo que impide la formación de semillas (sistema de autoincompatibilidad), se realizaron 15 autopolinizaciones momentos después de haber iniciado la antesis y se cubrieron las flores para evitar contaminación de polen ajeno. Las flores tratadas fueron colectadas a las dos, cuatro y seis horas después de la polinización (5 por tiempo) y se fijaron en Farmer (etanol al 100% y ácido acético en una proporción de 3:1). Una vez que las muestras permanecieron en Farmer por más de 24 horas, se colocaron 3 horas en sulfito de sodio (NaSO_3) para ablandar el tejido. Enseguida se colocaron en azul de anilina al 1% en agua destilada durante toda la noche para evidenciar la pared de calosa de los tubos polínicos cuando se observan por microscopía de fluorescencia. Se hicieron cortes longitudinales de estigma y ovario, así como cortes transversales de estilo para ubicar el tejido de transmisión. Finalmente se tomaron fotomicrografías en un microscopio de fluorescencia.

Visitantes florales

Se realizaron observaciones de los visitantes florales en la zona de estudio, en cuatro parches florales; en cada parche se observaron cinco flores, una por planta elegidas al azar. En total fueron 20 flores. Las observaciones se hicieron de 9:00 a 11:30 am en dos de los parches, mientras que en los dos restantes se hicieron de 12:00 a 2:30 pm, en 10 minutos de observación por 20 de descanso. De los visitantes observados, se obtuvo un promedio de visitas por flor, por tipo de visitante.

Recompensas florales

Para indagar sobre la posible existencia de nectarios, se realizó una inspección previa de las flores en microscopio estereoscópico y se deshidrataron muestras de sépalos, pétalos, anteras y ovarios para observarlas en el MEB (López *et al.*, 2005).

También se realizaron pruebas histoquímicas en cortes longitudinales de botones florales cercanos a la antesis. Los botones se incluyeron en Paraplast© para determinar la presencia de recompensas o atrayentes florales. Se usó ácido peryódico-Reactivo de Schiff (APS) para polisacáridos insolubles y Rojo "O" de aceite para reservas lipídicas. Sumado a esto se realizaron pruebas histoquímicas de anteras recién colectadas (en fresco), utilizando Sudán III y Rojo "O" de aceite para revelar la presencia de lípidos y reactivo de Schiff para reconocer azúcares (López *et al.*, 2005). Las anteras fueron colocadas enteras

en portaobjetos y se les agregó una gota del reactivo, después de incubar por 2 min, se tomaron fotografías en microscopio óptico.

Dispersión de semillas

Con el objetivo de conocer el modo de dispersión de las semillas, se hicieron observaciones en campo durante la dehiscencia de los frutos. Para conocer la morfología de las semillas así como la presencia de estructuras de dispersión, las semillas se procesaron para su observación al MEB y se tomaron fotomicrografías.

RESULTADOS

Antesis, comportamiento floral y receptividad estigmática

Las flores tienen tres sépalos fusionados lateralmente entre ellos, incluso hasta el ápice formando una cubierta cilíndrica. Cada ápice de los sépalos se extiende en forma de cuerno, mientras que la base se desprende del receptáculo y en los primeros minutos de la antesis permanecen sobre los pétalos (Fig. 2a). Al irse extendiendo los pétalos, se provoca el desprendimiento total y la caída del cáliz.

Los estambres son numerosos y dentro del botón floral y en las primeras horas de la antesis se encuentran muy próximos unos de otros al igual que del gineceo. Las anteras se ubican por debajo del nivel del estigma sin tocarlo y se encuentran dehiscentes momentos antes de la antesis (Fig. 2b).

Las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* inician la antesis desde las 09:00 am (Fig. 2b) y logran la máxima apertura de los pétalos y extensión de los estambres alrededor de las 12:00 pm, permitiendo que los estambres se separen unos de otros, así como del estigma (Fig. 2c). Minutos después de haber comenzado la antesis, el estigma se encuentra receptivo. Finalmente, las flores se cierran hacia las 6:00 pm en días soleados, mientras que en días nublados, el cierre de las flores puede ser antes, ya que depende de la cantidad de luz que incide (Fig. 1d). La antesis dura 3 días, pero en el transcurso del tercer día, se caen los pétalos y se pierde la receptividad del estigma.



Figura 2. Periodo de antesis. **a.** Botón floral con los sépalos desprendidos de la base pero unidos en el ápice; se observa la prolongación en forma de cuerno de cada uno de los sépalos y las espinas en el envés. **b.** Flor en antesis temprana, los sépalos se han desprendido completamente de manera natural, los estambres se encuentran cercanos al ovario. **c.** Flor en la máxima apertura de los pétalos y los estambres se observan separados del ovario y entre ellos. **d.** Flor en el atardecer del primer día de antesis y en el que los pétalos se cierran para volver a abrir al siguiente día.

Los resultados de la prueba de receptividad del estigma con peróxido de hidrógeno mostraron que éste es de color rosa claro cuando la flor está en botón y no es receptivo (Fig. 3a), una vez iniciada la antesis vira a guinda, se encuentra receptivo y así permanece durante tres días (Fig. 3b). Cuando el período de antesis ha transcurrido, el estigma se torna café y deja de ser

receptivo; la coloración de éste se oscurece hasta llegar a negro cuando comienza la formación del fruto (Fig. 3c).



Figura 3. Color del estigma relacionado con la receptividad. **a.** Estigma no receptivo de color rosa en botón floral cercano a la antesis, los sépalos fueron removidos y los pétalos ligeramente abiertos. **b.** Estigma receptivo de color guinda al momento de iniciar la antesis. **c.** Estigma no receptivo después de la antesis, es de color negro.

Hercogamia y relación polen/óvulos (P/O)

Dentro de las características que se analizaron, se encontró que el número de lóculos (y por lo tanto de carpelos) por ovario varía de 4-6. El número de óvulos por ovario es altamente variable, con un intervalo de 200 a 550 (360.52 ± 17.31). La cantidad de estambres por flor varía de 33 a 87 (52.52 ± 2.39) (Tabla 2). La correlación de Pearson para saber si las flores presentan hercogamia resultó ser significativa ($r= 0.75$, g. l. = 29, $p<0.005$), es decir, la longitud de los estambres y la de los pistilos está correlacionada positivamente. La longitud de los estambres varía de 6.7 a 11.5 mm (8.93 ± 0.22) y la del pistilo de 8.9 a 15.7 mm (12.19 ± 0.36). La relación P/O fue de 338.09 ± 310.93 ($118335.3 \pm 108261.47/360.52 \pm 94.84$) (Tabla 2).

Tabla 2. Características reproductivas de 30 flores de 30 plantas de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* colectadas al azar

Característica	Promedio ± DE	Intervalo
Número de óvulos por ovario	360.52 ± 94.84	201-552
Número de lóculos por ovario	5.11 ± 0.537	4-6
Longitud del pistilo	12.19 ± 1.99 mm	8.92-15.69 mm
Número de estambres	52.52 ± 13.11	33-87
Longitud de estambres	8.93 ± 1.23 mm	6.79-11.49 mm
Granos de polen/flor	118335.3 ± 108261.47	-
Proporción Polen/Óvulos	338.09 ± 310.93	-

En la Fig. 4 se muestra una gráfica de la relación entre los tamaños del androceo y del gineceo, en ella se observa que al aumentar la longitud de los pistilos, también aumenta la de los estambres, pero siempre conservando una distancia de separación, lo que significa que a pesar de las variaciones en las longitudes del androceo y del gineceo en la población, siempre se conserva una distancia significativa de separación espacial que marca la condición hercogámica ($t = -15.31$; g. l. = 29; $p < 0.05$).

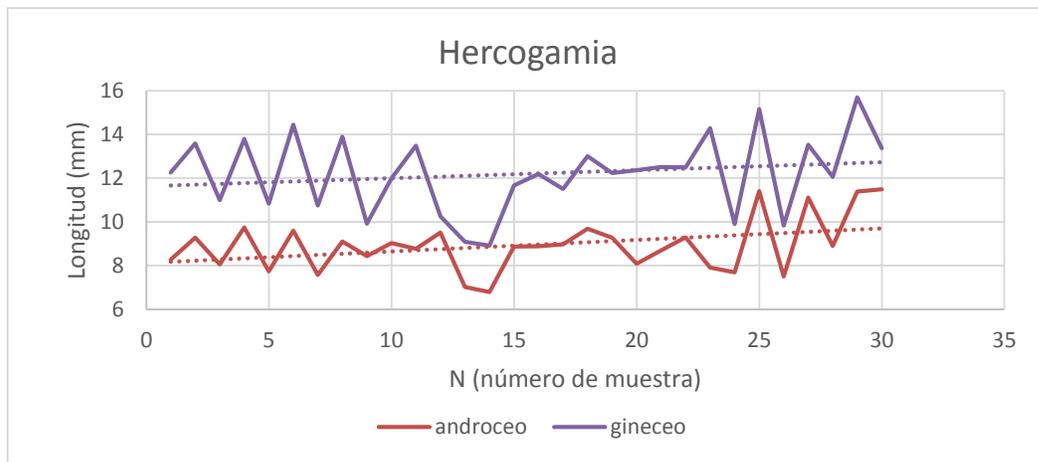


Figura 4. Variaciones en la longitud del androceo y del gineceo de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* en donde se muestra la constancia de la separación espacial entre ambos verticilos.

Sistemas de cruza

Se observaron los frutos formados en distintas etapas de maduración en la mayoría de los tratamientos después de dos semanas de la polinización (Tabla 3, Fig. 5), excepto el de apomixis, indicando que la formación de las semillas es por vía sexual. De la autopolinización natural, sólo el 66% de flores produjeron frutos; mientras que de la autopolinización manual, de la polinización cruzada y de la abierta, todas formaron frutos (Figs. 5 y 6).

Pseudocleistogamia

Cabe destacar que durante la recolección de frutos de los tratamientos de autopolinización natural (en donde no se manipularon las flores) se observó que los sépalos se desprenden de la base pero no se caen, sino que permanecen formando la capucha que cubre a los pétalos, lo cual impide dar comienzo a la antesis. Los pétalos quedan abrazados por los sépalos que en este caso, permanecen cubriendo al estigma hasta la formación del fruto. Esto indica que en algunos individuos, algunas flores presentan un tipo de cleistogamia y ocurre autopolinización natural, ya que la antesis no se lleva a cabo, por lo que el estigma debe ser polinizado por polen propio (Fig. 6). Por esta razón se etiquetaron las flores que se observaron con esta condición y se les dio seguimiento. Tampoco se observó la presencia de polinizadores en estas flores. De las 19 flores seleccionadas, sólo 15 formaron frutos que contuvieron 62.52 ± 78.4 semillas por fruto. Los resultados anteriores se muestran en la Tabla 3 como el tratamiento de pseudocleistogamia, es decir, plantas que presentan

flores tanto cleistógamas como casmógamas, pero que no presentan diferencias morfológicas entre ellas.

Tabla 3. Número de flores, frutos (%) y semillas formadas y colapsadas por tratamiento.

Tratamiento	N	Frutos formados (%)	Semillas formadas \pm DE	Semillas colapsadas \pm DE
AN	50	33 (66%)	200.28 \pm 196.66	33.88 \pm 83.78
AM	30	30 (100%)	96.33 \pm 52.96	32.46 \pm 54.73
PC	32	32 (100%)	304.09 \pm 127.64	0
PA	50	50 (100%)	377.06 \pm 128.32	0
A	30	0 (0%)	0	0
PSC	19	15 (78.94%)	62.52 \pm 78.4	0

AN= autopolinización natural, AM= autopolinización manual, PC= polinización cruzada, PA= polinización abierta, A= apomixis, PSC= pseudocleistogamia

La producción de semillas fue variable en todos los tratamientos, presentándose en la polinización abierta la cantidad más alta (377.06 \pm 128.32). La polinización cruzada tuvo una gran cantidad de semillas, pero menor que en el control (304.09 \pm 127.64); la autopolinización natural formó 200.28 \pm 196.66 semillas; el tratamiento de autopolinización manual resultó en la formación de 96.33 \pm 52.96 de semillas y el de apomixis no formó ninguna.

En el tratamiento de autopolinización natural no se observó un desarrollo aparente del fruto cuando se colectaron, pero al hacer las disecciones se observaron semillas, por esta razón se consideran frutos, aunque poco desarrollados, puesto que contienen semillas en baja proporción. En los frutos de este tratamiento, con crecimiento normal, al momento de abrirlos, se observó que la mayoría de las semillas, en ocasiones todas, estaban colapsadas o poco desarrolladas. En algunos casos, los frutos se observaron con crecimiento

normal y con una alta cantidad de semillas en comparación con los de entrecruzamiento. También se hallaron flores que no formaron frutos ni semillas (Fig. 5).

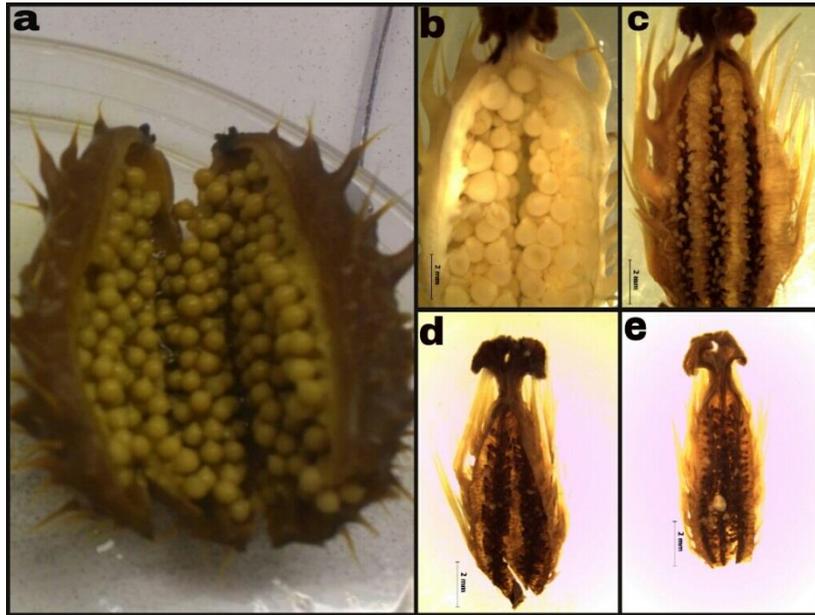


Figura 5. Frutos a los 14 días postpolinización en los tratamientos de autopolinización y polinización cruzada. **a.** Fruto de entrecruza con semillas bien desarrolladas. **b-e.** Frutos de autopolinización natural: fruto con semillas bien desarrolladas (b), con semillas colapsadas (c), sin semillas (d) y con pocas semillas (e).

Para la comparación de los tratamientos, la prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias entre los tratamientos realizados que produjeron semillas ($K=7.85$, g. l.=3, $p<0.0001$). La comparación de Dunn mostró que no existen diferencias entre los tratamientos de polinización cruzada y polinización abierta (control), pero sí con los demás.

Debido a que hubo formación de frutos en todos los tratamientos en donde las flores fueron polinizadas, *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presenta un sistema de cruce mixto.

Depresión endogámica

Los resultados de la depresión endogámica fueron $\delta = 0.34$ para la formación de frutos, para las semillas formadas fue $\delta = 0.68$ y el acumulativo de $\delta = 0.77$, lo que indica que la población presenta depresión por endogamia (cuando los resultados son $\delta > 0.5$ indica que la población presenta depresión endogámica).

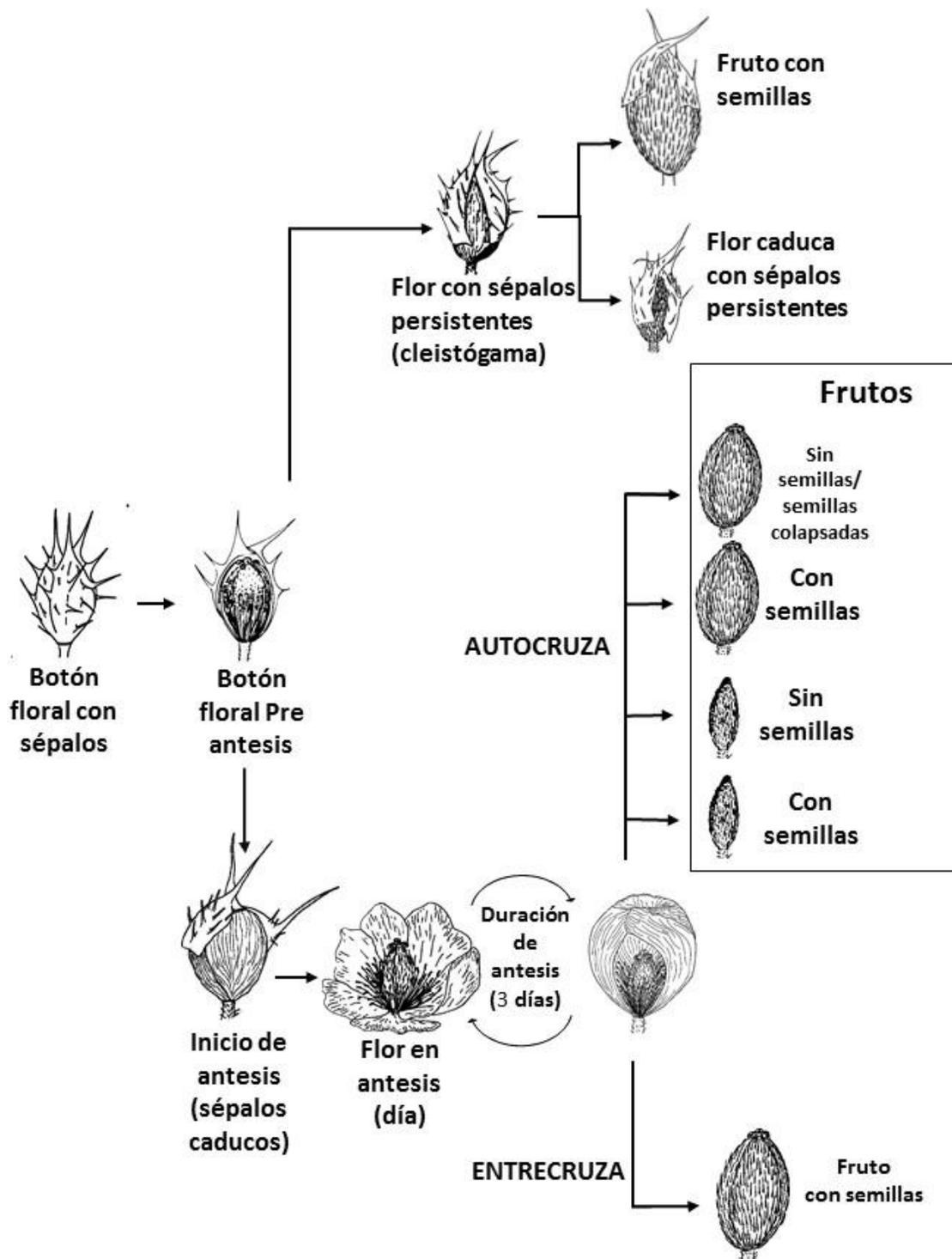


Figura 6. Características de los frutos de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, a partir de autocruza, entrecruza y pseudocleistogamia. (Elaborado por César A. González).

Crecimiento de tubos polínicos

Las fotomicrográficas tomadas al microscopio electrónico de barrido (MEB) muestran que el gineceo de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* está conformado por un estigma discoidal seguido de un ovario unilocular con 4-6 carpelos, carece de estilo (Fig. 7). Los lóbulos estigmáticos están hundidos formando canales papilosos radiales, que a su vez representan la zona específica para la recepción de los granos de polen (Fig. 8a), mientras que la zona que no es receptiva presenta estomas y ceras epicuticulares abundantes (Fig. 8b).

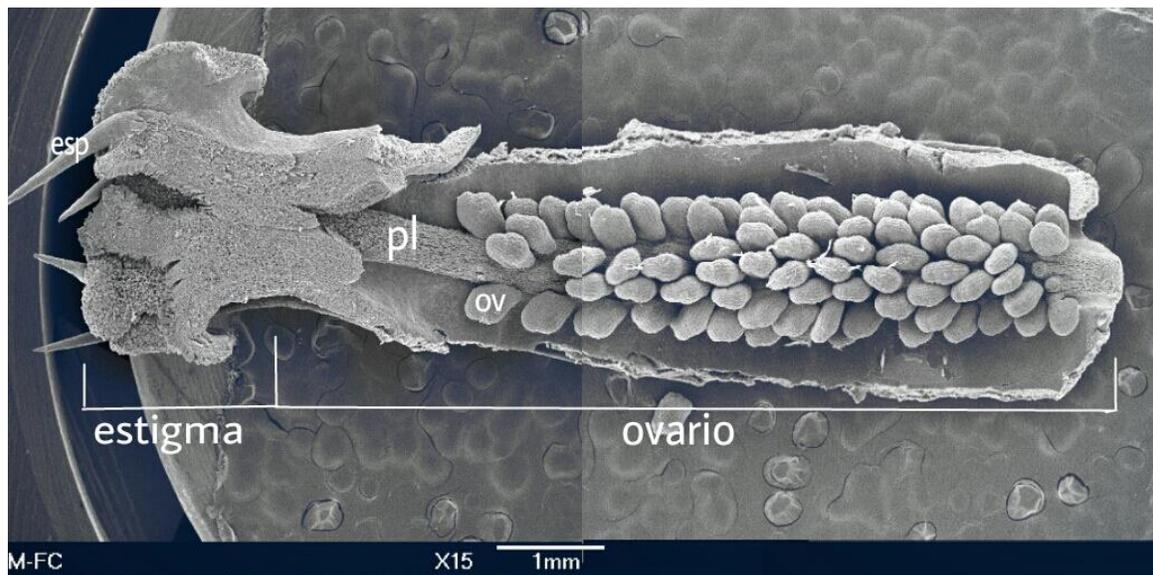


Figura 7. Gineceo de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* en corte transversal. Se observa a detalle las partes que lo conforman: el estigma lobulado y un lóculo del ovario con óvulos en la placenta, así como la ausencia de estilo. esp=espina, ov=óvulo, pl=placenta.

La descripción morfológica de los granos de polen (Figs. 8c y d) coincide con la descrita por Quiroz-García *et al.* (1994). Son tricolpados, sincolpados, semitectados, esferoidales y con superficie reticulada. Una vez que los granos de polen son depositados en el estigma, éstos se adhieren e hidratan y los tubos polínicos comienzan a emerger por uno de los colpos. Con esto comienza la fase de invasión del tubo polínico al envolver a las papilas estigmáticas para después entrar hacia el canal radial de las papilas hasta llegar al ovario (Fig. 8e y f). Una vez atravesado el estigma, los tubos polínicos entran al ovario, en donde crecen sobre las papilas de la placenta para llegar a los óvulos, de esta manera llegan al micrópilo (Fig. 8g y h).

Debido a que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* carece de estilo, los granos de polen se dirigen hacia el ovario por medio de las papilas que se encuentran en los canales del estigma que se conectan a su vez con la placenta del ovario (Fig. 9). En un corte transversal, el estigma se encuentra, de afuera hacia adentro, delimitado por la epidermis externa, el córtex con múltiples estratos de parénquima y haces vasculares; la epidermis con células papilosas delimitan los canales estigmáticos (Fig. 10).

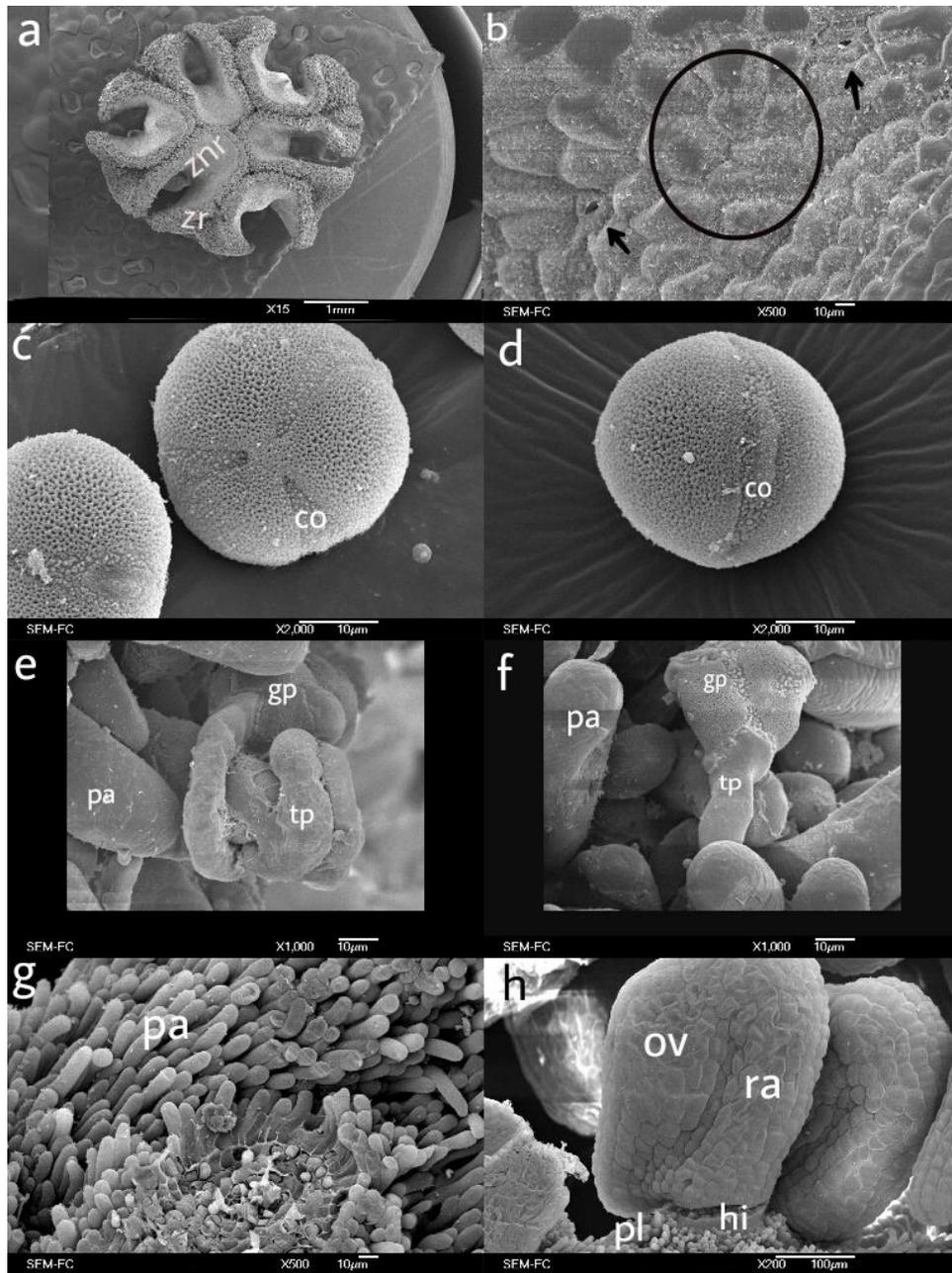


Figura 8. Estigma y germinación de granos de polen observados al MEB. **a.** Estigma discoidal conformado por lóbulos estigmáticos en cuya zona adaxial forman canales radiales lleno de papilas y es la zona receptiva. **b.** Superficie no receptiva (zona abaxial) del estigma. **c.** Vista polar del polen tricolpado. **d.** Vista ecuatorial del polen mostrando la exina reticulada y uno de los colpos. **e.** Tubo polínico enrollándose en una de las papilas estigmáticas. **f.** Grano de polen germinando, con el tubo polínico creciendo hacia el interior del tejido estigmático. **g.** Placenta cubierta de papilas por donde crecen los tubos polínicos. **h.** El óvulo maduro es anátropo, casi sésil y la zona de la rafe es amplia. co= colpo, gp= grano de polen, hi= hilo, ov= ovario, pa= papila, pl= placenta, ra=rafe, tp= tubo polínico, znr= zona no receptiva, zr= zona de recepción del polen, Círculo= ceras epicuticulares, flechas= estomas.

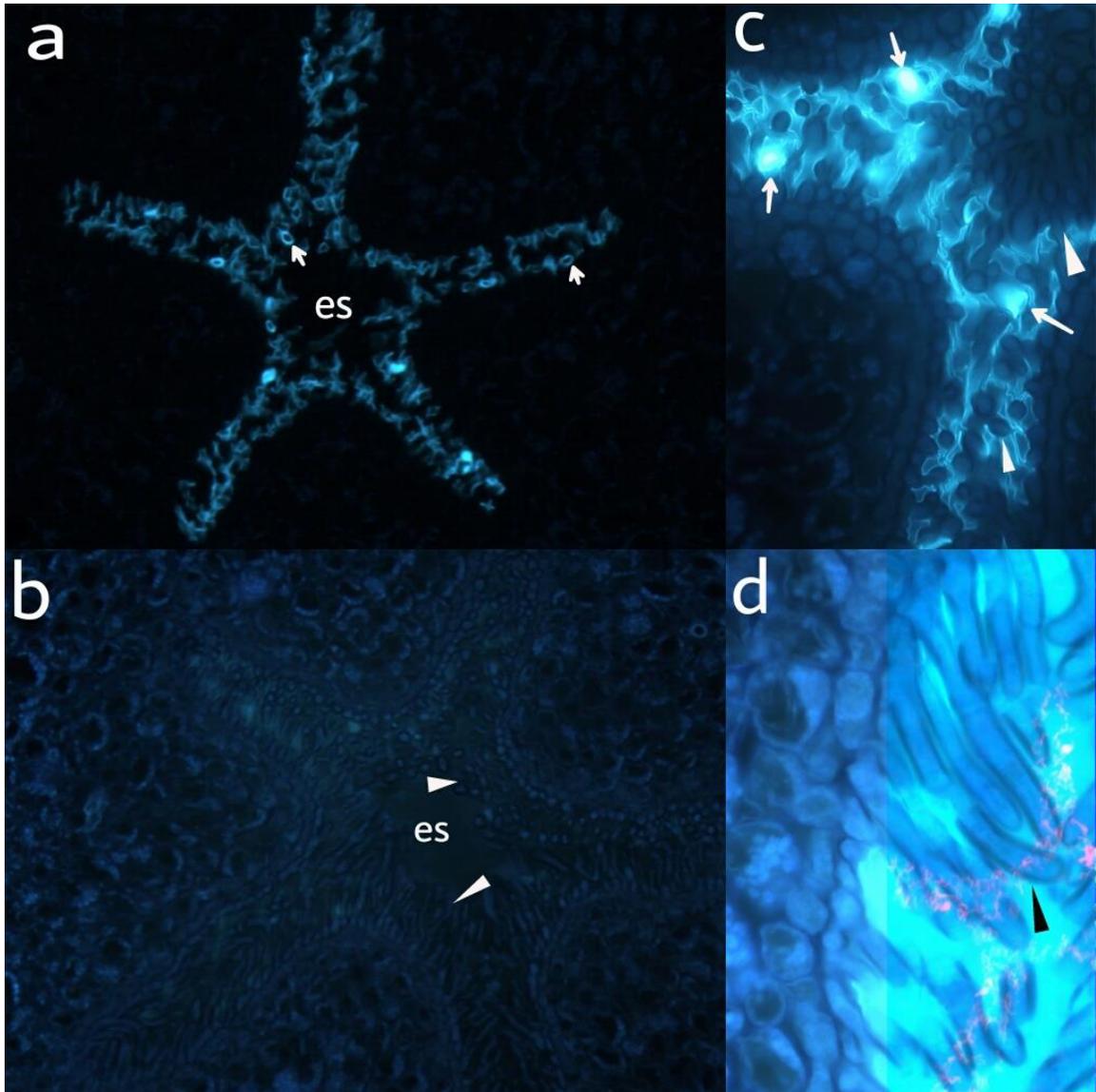


Figura 9. Estigma de flores polinizadas observados en fluorescencia. **a.** Vista panorámica de un corte transversal de estigma donde se observan tubos polínicos entre las papilas (flechas) **b.** Papilas estigmáticas (cabeza de flecha). **c.** Acercamiento a uno de los canales estigmáticos donde se observan tubos polínicos y papilas cortados transversalmente. **d.** Acercamiento a las papilas estigmáticas por las que se desliza el tubo polínico. es= canal estigmático; flechas= tubos polínicos; punta de flecha= papilas estigmáticas.

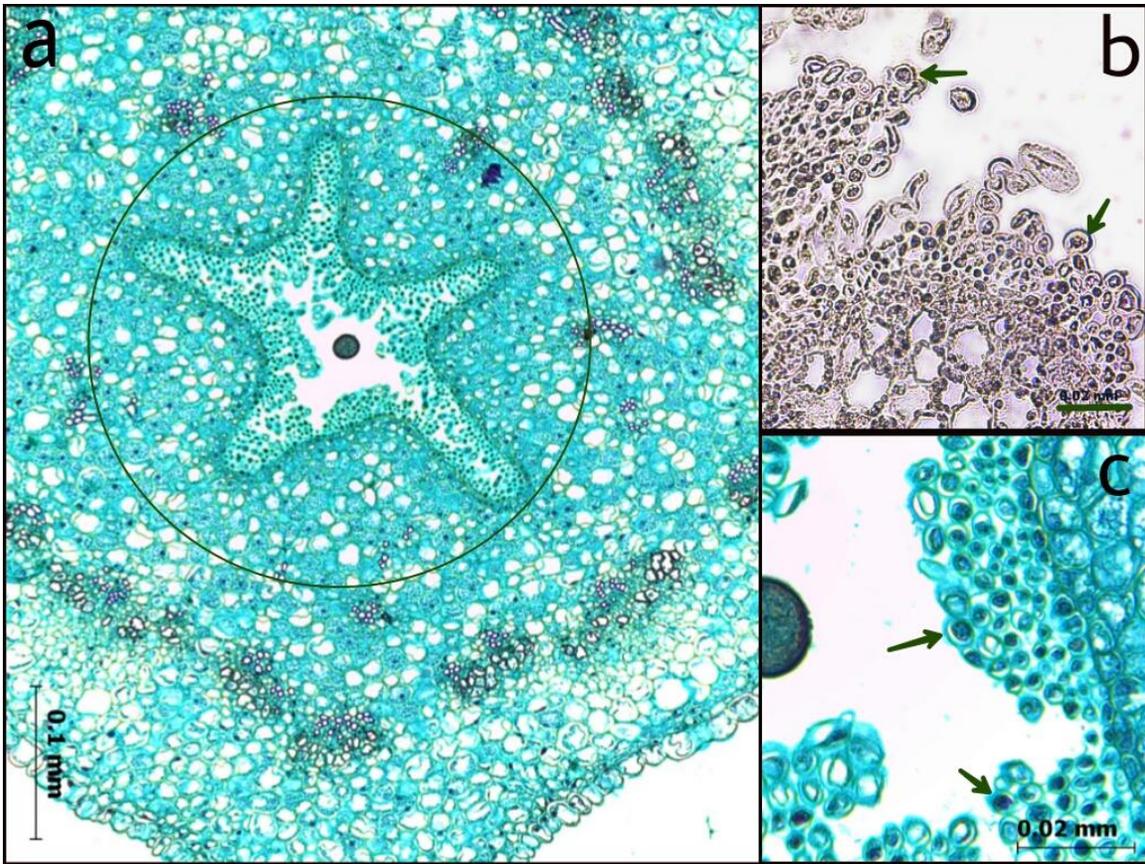


Figura 10. Estigma de *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. **a.** Corte transversal del estigma **b.** Acercamiento a las papilas del canal que forma el estigma teñido con vainillina para detectar taninos insolubles. **c.** Papilas estigmáticas con safranina-verde rápido. Círculo = canal formado por los canales radiales del estigma, flechas= taninos en células de las papilas.

Las observaciones bajo el microscopio de fluorescencia que se realizaron para saber si existe algún tipo de rechazo por parte del estigma hacia los tubos polínicos, mostraron que a las dos horas de haber autopolinizado los estigmas, los granos de polen germinaron y los tubos polínicos comenzaron a crecer por entre las papilas del estigma (Fig. 11a). Transcurridas 4 h postpolinización (hpp) en autocruza, se observó que los tubos polínicos aumentaron su longitud y también formaron tapones de calosa en sitios distantes al ápice (Fig. 11b).

Finalmente, a las 6 hpp, se observaron muchos granos de polen germinados y con los tubos polínicos tan largos que penetran el micrópilo de los óvulos. Los tubos polínicos crecen entre los canales del estigma provistos de papilas (Fig. 11c) para llegar al ovario. También se pueden ver algunos granos de polen que germinaron, pero los tubos polínicos permanecen en la superficie de las papilas estigmáticas. Los tubos polínicos que entran al ovario llevan a cabo la fecundación por porogamia (Fig. 11d).

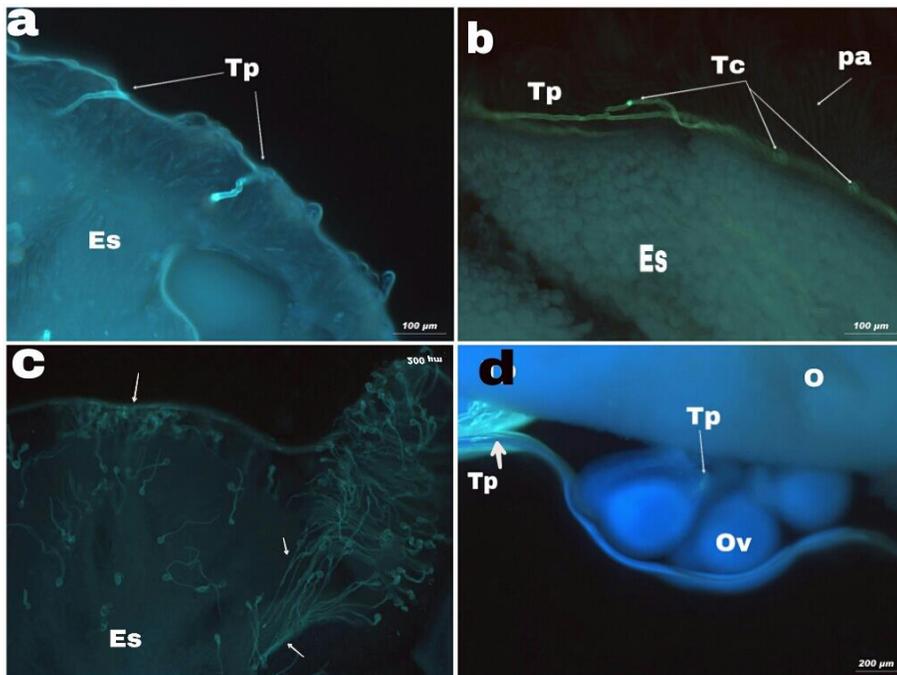


Figura 11. Crecimiento de tubos polínicos en autocruzamientos. **a.** Estigma a 2 hpp, en donde el tubo polínico ha comenzado a crecer. **b.** Estigma a 4 hpp, los tubos polínicos han crecido considerablemente y se forman tapones de calosa. **c.** A las 6 hpp, las flechas señalan algunos tubos dirigiéndose al estilo. **d.** Tubos polínicos llegando al ovario y entrando a los óvulos después de 6 hpp. Es: estigma; O: ovario; Ov: óvulo; pa: papilas; Tc: tapones de calosa; Tp: tubos polínicos.

Los resultados muestran que las autopolinizaciones forman frutos (Tabla 3). Por lo tanto, la especie estudiada es autocompatible y no existen barreras precigóticas durante la germinación de los granos de polen, ni para el crecimiento de los tubos polínicos, ni para la fecundación.

Visitantes florales

Se observó que al inicio de la antesis llegaron pequeños himenópteros del género *Cryptalyra* sp. incluidos en la familia Megalyridae (Fig. 12a). Cada vez que llegan a una flor, aterrizan en el estigma. Posteriormente, recorren las anteras dando vueltas alrededor del androceo desde abajo hacia arriba por alrededor de 30 segundos y, finalmente, vuelan hacia otras flores o plantas de la misma especie. Dichos himenópteros son constantes en las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, ya que se registró un promedio de 7 visitantes en 10 minutos por flor. La actividad de *Cryptalyra* sp. termina cuando la flor abre completamente, cerca de las 11:00 am, puesto que después de este momento ya no se observaron. Una vez que las flores han abierto en su totalidad, es decir, a las 12:00 h aproximadamente, son visitadas por abejas de la especie *Apis mellifera* (también himenópteros) en un promedio de 8 abejas en 10 minutos por flor (Fig. 12b), las cuales también forrajeaban a las flores de otras plantas que crecen cercanas a *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, mientras que *Cryptalyra* sp., sólo se observó en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*.

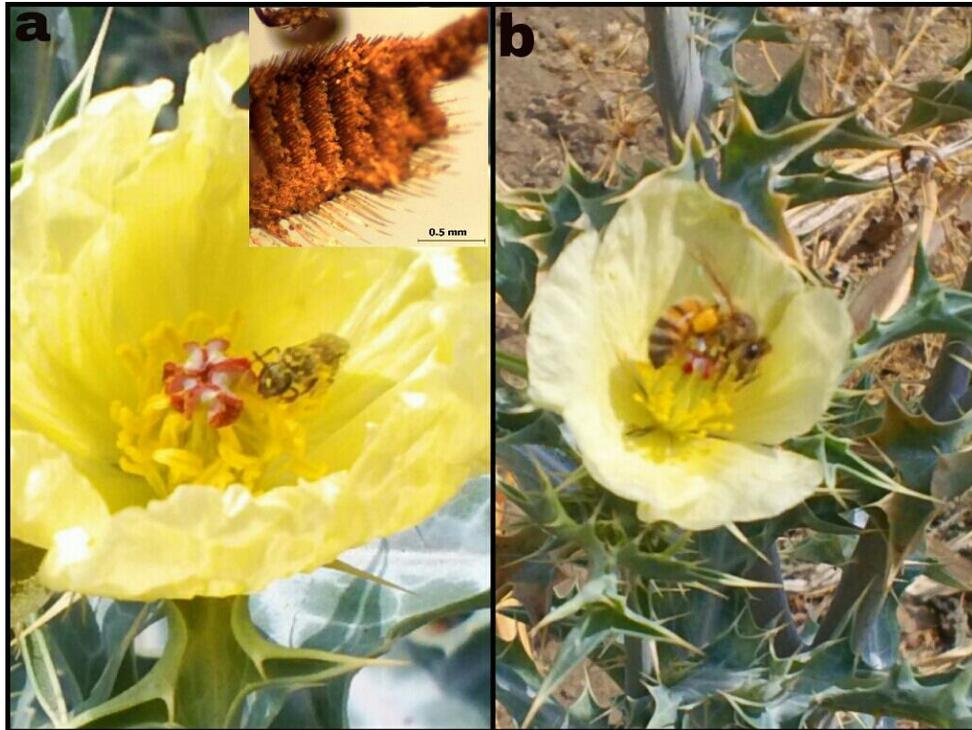


Figura 12. Visitantes florales. **a.** *Cryptalyra* sp. que visita la flor al inicio de la antesis. El recuadro muestra el detalle de una de las patas del insecto en donde se adhiere el polen. **b.** Visita de abejas *Apis mellifera* contactando anteras y estigma.

Recompensas florales

Durante la disección de las flores no se encontraron nectarios. Se encontró que las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presentan estomas en todos los verticilos florales, a través de los cuales salen algunas secreciones.

El tamaño de estos estomas no varía entre los verticilos, pero sí varía su densidad. En los sépalos y en los pétalos, la densidad es menor que en las anteras y en el ovario. El verticilo que tiene menor densidad de estomas es la corola (Fig. 13).

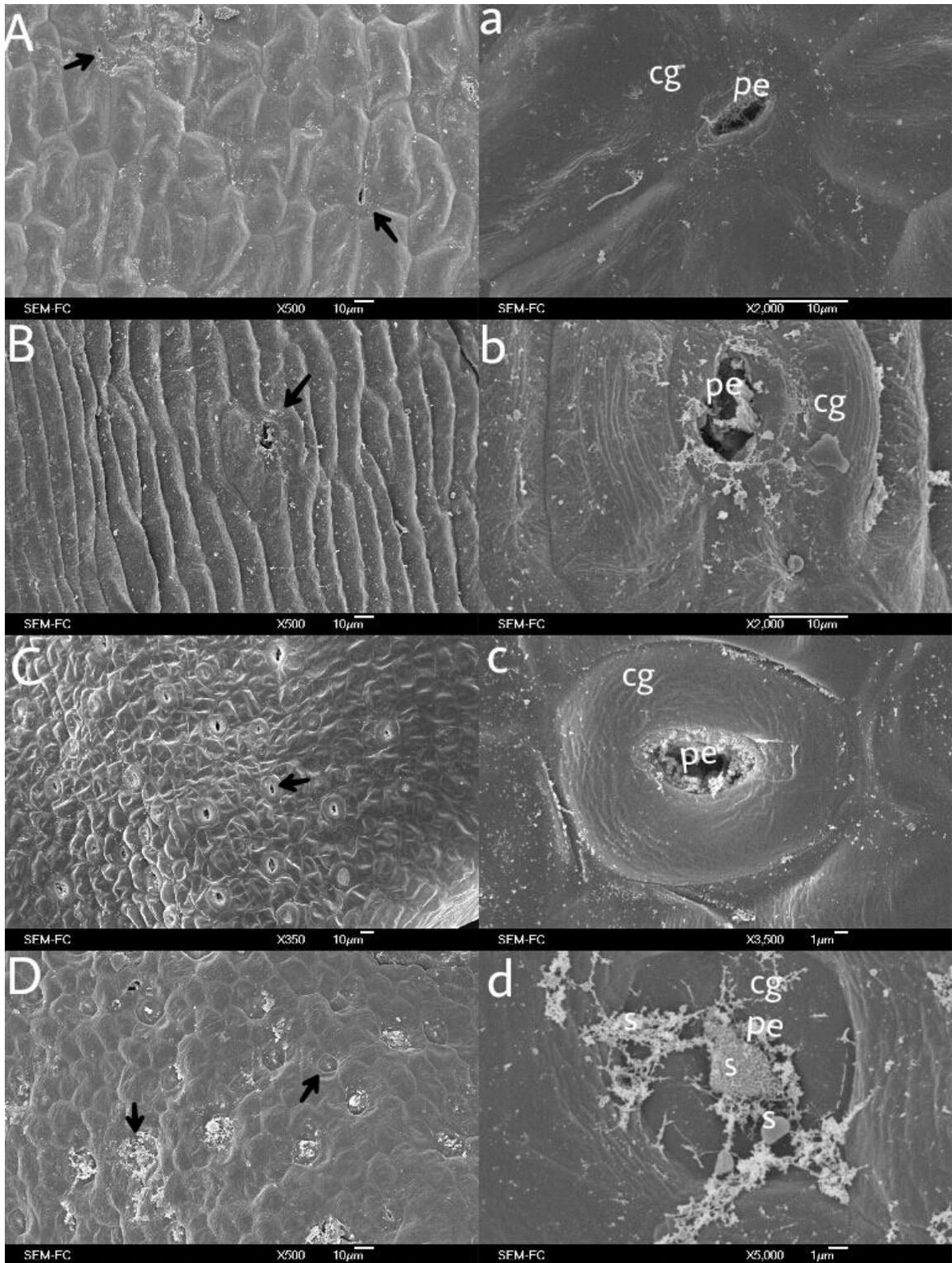


Figura 13. Fotomicrografías de estomas en los verticilos florales vistos al MEB. **A. a.** Sépalo. **B. b.** Pétalo. **C. c.** Antera. **D. d.** Ovario. Minúsculas significan acercamientos. cg= células guarda, pe= poro estomático, s= secreciones; flechas= estomas.

Histoquímica de verticilos florales

Las pruebas histoquímicas que se realizaron en cortes longitudinales de botones florales en pre-antesis revelaron la presencia de polisacáridos insolubles y aceites en todos los verticilos florales (Figs. 14 y 15). En los estomas de los sépalos se observan secreciones lipídicas que se extienden por la superficie (Fig. 14a), y polisacáridos, siendo los puntos de donde provienen dichas secreciones las que se tiñen con mayor intensidad (Fig. 15a). Lo mismo ocurre con los pétalos, donde se observan los puntos de secreción y restos de dichas secreciones sobre la superficie (Fig. 14b y 15b). En las anteras no se alcanzan a observar zonas secretoras específicas, sólo se observan secreciones sobre la epidermis de las anteras (Fig. 14c y 15c).

En la Fig. 14 se logran observar lípidos sobre la superficie de los tejidos de los cuatro verticilos. De manera importante, en el ovario (Fig. 14d) se detectan cantidades mayores de lípidos que en los otros verticilos (Fig. 14a, b y c). En la Fig. 15 se muestran teñidos los polisacarádios insolubles. A diferencia de lo que se observa en la Fig. 14, aquí sí se tiñeron los estomas, sugiriendo que son los sitios por donde se liberan la secreción lipídica en los cuatro verticilos.

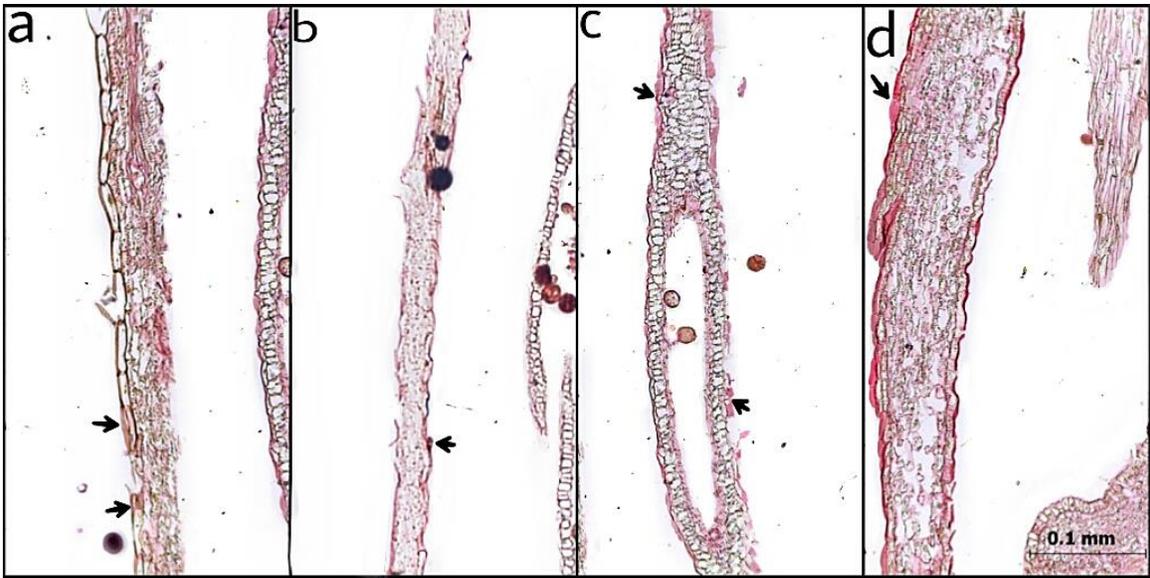


Figura 14. Cortes longitudinales de botón floral teñidos con Rojo "O" de aceite. **a.** Pétalo. **b.** Sépalo. **c.** Antera. **d.** Ovario. Flechas= zonas con mayor concentración de lípidos.

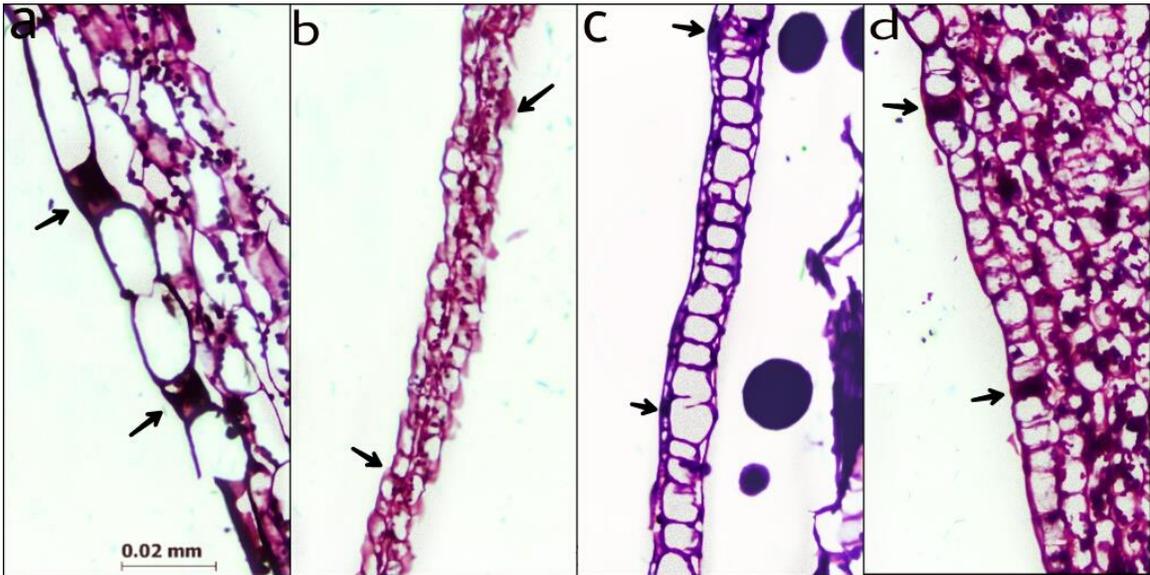


Figura 15. Cortes longitudinales de botón floral teñidos con Ácido periódico-Reactivo de Schiff (APS). **a.** Pétalo. **b.** Sépalo. **c.** Antera. **d.** Ovario. Flechas= zonas con mayor concentración de polisacáridos insolubles.

Debido a que en las anteras no se encontraron zonas de secreción definidas (Fig. 15c) como las de los demás verticilos (Fig. 15a, b y d), se

realizaron las pruebas histoquímicas en fresco, cuyas tinciones revelaron la presencia de secreciones lipídicas que se adhieren al polen cuando éste es liberado. El Sudán III dio positivo (en color naranja) para la presencia de las gotas lipídicas en la superficie de la antera (Fig. 16a) y el Reactivo de Schiff funcionó como prueba negativa ya que lo que reveló fue la presencia de azúcares en el grano de polen coloreados de rosa debido a la reacción, y que contrasta con las gotas lipídicas que se le adhieren a los granos, que no se tiñeron pero se observan claramente en color amarillo, posiblemente secretadas por el tapete (Fig. 16b).

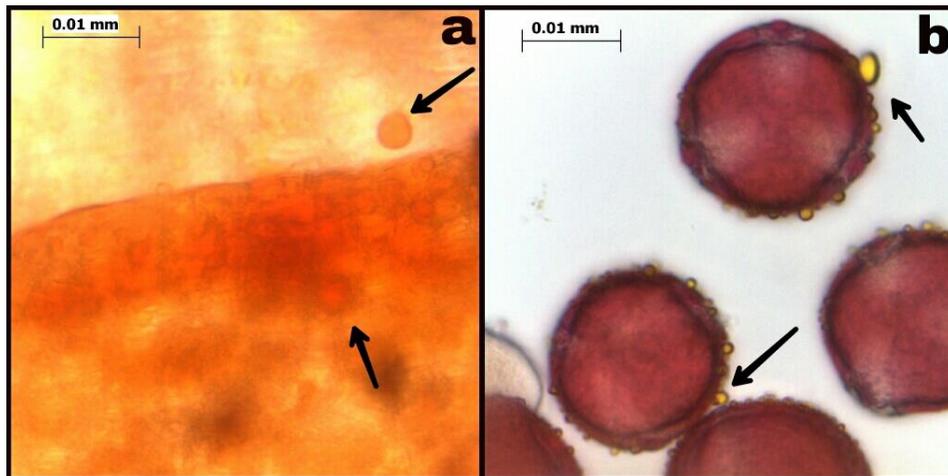


Figura 16. Histoquímica de anteras en fresco. **a.** Antera con Sudán III que revela la presencia de gotas lipídicas en la superficie de la antera (flechas). **b.** Polen recién liberado y teñido de rosa con Reactivo de Schiff que indica la presencia de azúcares y contrasta con las gotas lipídicas adheridas a su superficie (flechas).

Dispersión de semillas

La dispersión primaria de las semillas se lleva a cabo por medio del viento. Cuando las semillas maduran por completo, los frutos son cápsulas que al deshidratarse se observan en forma de canasta debido a que se abren por valvas apicales. En la base de la cápsula los carpelos permanecen fusionados y no se abren en esa zona. En la parte apical del fruto, el estigma es persistente y a ella quedan unidos los haces vasculares provenientes de los carpelos. En el interior de las cápsulas recién abiertas se observan las semillas (Fig. 17), las cuales salen y caen al piso por la agitación de un lado a otro del pedúnculo que sostiene a los frutos al ser movidos por el viento, permitiendo así, la dispersión primaria de las semillas.

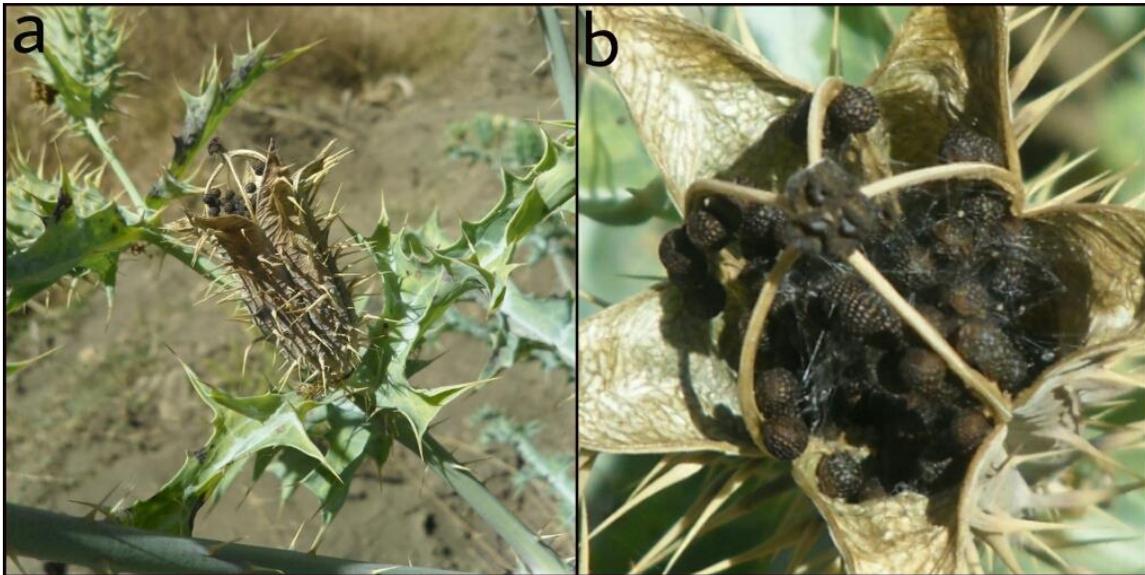


Figura 17. Frutos capsulares (con dehiscencia parcial a través de valvas) de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. **a.** Imagen panorámica de los frutos secos sobre los pedúnculos. **b.** Acercamiento a la cápsula abierta en forma de canasto, con el estigma y haces vasculares persistentes mostrando a las semillas maduras.

Las semillas maduras son globosas y tienen una costilla abultada a lo largo de la rafe. Las células epidérmicas de la costilla son pequeñas con respecto al resto de la superficie de las semillas. La zona hilo-micropilar es ovalada (Fig. 18a), sobre todo las de las zonas laterales, las cuales son grandes y abultadas. Las células de la zona micropilar también son pequeñas y en ella se observa el pequeño micrópilo obstruido y a su lado la zona del hilo mostrando células parenquimáticas expuestas cuando la semilla se desprende del fruto (Fig. 18b).

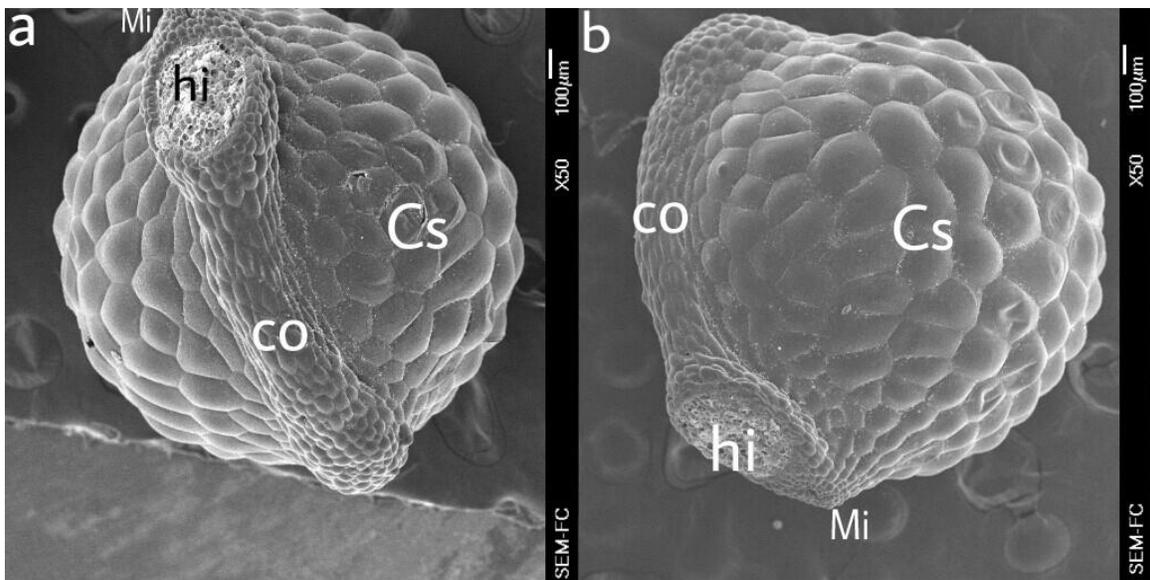


Figura 18. Semillas de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. vistas al MEB. **a.** Vista de la región hilo micropilar y de la rafe, mostrando la costilla. **b.** Vista lateral de la semilla mostrando la costilla con células epidérmicas pequeñas con respecto a las células grandes y abultadas de la cubierta seminal y la posición del micrópilo. hi= hilo, co=costilla, Cs= cubierta seminal, Mi=micrópilo.

DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos y de las observaciones, detallan la biología reproductiva de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* desde el momento de la floración. El sistema de cruce mixto presente en esta especie está dado por las características de la flor y del ecosistema, por ejemplo la presencia de polinizadores. Cuando los polinizadores son constantes en las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, la cantidad de polen depositado sobre el estigma aumenta, propiciando la formación de semillas. Cuando éstas llegan a la madurez, los frutos las dispersan con ayuda del viento y dependiendo de las condiciones ambientales, éstas germinarán para establecerse y llegar a la madurez para repetir el ciclo reproductivo.

Antesis floral

La mayoría de las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* son casmógamas, aunque presenta algunas cleistógamas. En las flores casmógamas, la duración de la antesis y la apertura floral de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* están influenciados por las condiciones ambientales, como la radiación solar, lo cual también está reportado para otras angiospermas (Amasino, 2005). En *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* lo anterior es de suma importancia para los sistemas de cruce, ya que la flor abre durante tres días (tiempo que dura receptivo el estigma), lo que otorga a los individuos más oportunidades de entrecruza por medio de polinizadores.

Hercogamia

La hercogamia es una de las características que presentan algunas flores hermafroditas como mecanismos que sirven para promover la polinización cruzada (Richards, 1997). Con los resultados obtenidos de la medición de las longitudes de los órganos sexuales de la flor y los cambios florales que se observaron, se propone que los individuos de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presentan flores con hercogamia, ya que se encontraron diferencias significativas entre la longitud del pistilo y de los estambres, y además tienen una correlación positiva en la separación espacial constante entre dichas longitudes (Fig. 4).

Sistemas de cruza

En el caso de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, que se desarrolla en ambientes perturbados o en etapas sucesionales tempranas, tiene la capacidad de reproducirse tanto por autocruza como por entrecruza. La relación P/O apoya ésta afirmación, puesto que los resultados se ajustan entre las categorías de autogamia facultativa y xenogamia facultativa que propone Cruden (1976) para los sistemas de cruza. En otros términos, se refiere a lo mismo que un sistema mixto.

La vasta cantidad de polen que producen las flores puede deberse a que existe una pérdida de polen al ser transportado por un vector, además de que aumenta la competencia en el gineceo al momento de la polinización en la germinación y crecimiento del tubo polínico (Mitchell, 1997).

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* no tiene reproducción asexual por propagación vegetativa y, con respecto a los tratamientos de polinización, se observó que no hay formación de semillas por apomixis, con lo que se descarta la formación de semillas sin fecundación, descartando que su éxito reproductivo se deba a algún tipo de reproducción asexual (Quero *et al.*, 2010).

Sistema de cruce mixto

El sistema mixto se considera como una transición entre el entrecruzamiento y la autofecundación (Barrett, 2002). La desventaja de este sistema es que al producir menos semillas por autogamia se reduce la adecuación de las plantas, pero a su vez es una manera de asegurar la reproducción al no llevarse a cabo la entrecruza. En el caso de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se asume que la autopolinización debe ocurrir de manera simultánea por medio de la autopolinización facilitada, en donde los polinizadores transportan tanto polen autógeno como xenógeno sobre un estigma. También es posible que ocurra después, ya que las flores se cierran durante dos días y el movimiento de los pétalos así como las corrientes de aire podrían ocasionar la polinización posterior a la antesis (Lloyd, 1979, Carrió *et al.*, 2008). En *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* a polinización previa a la antesis de las flores casmógamas es difícil que ocurra, ya que los estigmas se encuentran por debajo del nivel del estigma, además conforme la flor abre, éstos se extienden hacia la periferia por lo que la distancia entre los órganos sexuales es aún mayor que en un principio, lo que

permite que las flores tengan oportunidades de entrecruza como lo describe Lloyd (1979, 1992) para otras angiospermas.

Con los datos obtenidos se muestra que, a pesar de que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se desarrolla en un ambiente perturbado, la autopolinización no le favorece, ya que forma menor cantidad de semillas por esta vía que por la polinización cruzada, lo que resulta contrario a lo que propone Cruden (1977). Por ésta razón se puede considerar a *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* como un ejemplo de especie en donde el sistema mixto muestra una dirección hacia la entrecruza, sin perder la oportunidad de autogamia ya que carece de un sistema de incompatibilidad.

Autogamia

El hecho que en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* el producto de autopolinización natural se hayan observado semillas colapsadas en frutos tanto poco desarrollados como bien desarrollados, puede deberse a la posibilidad de que presenten cigotos que expresen alelos letales que causan su muerte, por lo que no se observa un correcto desarrollo en las semillas. Este fenómeno sucede cuando se han llevado a cabo varios ciclos de autofecundación o porque existen barreras postcigóticas, por lo que las plantas, por medio de la formación de homocigotos con genes deletéreos, eliminan a estos cigotos a causa del a depresión por endogamia y la eliminación es la consecuencia genética (Husband y Schemske, 1996).

Una segunda razón por la cual no hay formación de semillas en las autopolinizaciones naturales es porque, además de presentar hercogamia, el transporte del polen no es tan efectivo como en la polinización abierta, en donde los polinizadores desempeñan un papel importante como se describe más adelante. Esto se confirma con los resultados de la autopolinización manual, en donde todas las flores polinizadas formaron fruto, lo que significa que para que se efectúe la polinización debe haber transporte de polen aunque sea el propio (autopolinización facilitada o geitonogamia), ya que de acuerdo a Richards (1997), la hercogamia funciona como mecanismo para reducir la autopolinización. A pesar de que en la mayoría de las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* con autopolinización natural se formaron frutos y semillas, hubo algunas en donde esto no ocurrió.

Lo anterior sugiere que el grado de hercogamia puede variar dentro de la población estudiada de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*, lo que provoca que las anteras de algunas flores puedan alcanzar el nivel del estigma. También es posible que durante el transcurso de la de anthesis, en donde las anteras están liberando polen y los estigmas se encuentran receptivos, los movimientos que lleva a cabo la flor por medio del cierre y la apertura de los pétalos, provoquen el transporte del polen hacia el estigma como ocurre en otras especies de angiospermas mencionadas por Carrió *et al.* (2008).

Pseudocleistogamia

Una de las alternativas reproductivas que deja al descubierto este estudio es que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* también utiliza un sistema de autofecundación alternativo, la pseudocleistogamia, ya que en algunas flores no se caen los sépalos y las flores no abren, por lo que las anteras no tienen oportunidad de extenderse, por el contrario, maduran y liberan el polen cerca del estigma, de tal forma que en ellas se puede llevar a cabo la autofecundación.

La pseudocleistogamia presentada en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se observó en varias flores que no fueron cubiertas ni manipuladas y, aunque fue fácil reconocer a estas flores y a sus frutos por la presencia de los sépalos cubriendo al estigma y las remanencias de los demás verticilos florales, es probable que algunos frutos de este tipo no se hayan observado y colectado debido a que los sépalos pudieron caerse por acción del viento, cuestión que también se observó en campo.

Por definición, este fenómeno se conoce como cleistogamia, en donde las flores son polinizadas en ausencia de antesis, pero también se define como la producción de flores abiertas (casmógamas) y cerradas (cleistógamas) en una misma especie, incluso dentro del mismo individuo (Kuhn, 1867). Dentro de las clasificaciones de los tipos de cleistogamia definidos por Lord (1981), se puede colocar a *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* dentro del grupo de las especies con pseudocleistogamia, la cual se refiere a los casos en donde no existen diferencias morfológicas entre las flores cleistógamas y las casmógamas. Las

que se fecundan por cleistogamia es porque hay un factor que evita la antesis floral (Lord, 1981), en este caso la permanencia de los sépalos es el factor que evita la apertura de la flor y permite que el polen sea depositado en el estigma.

Entrecruza

En los tratamientos de polinización cruzada y polinización abierta aplicados en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se obtuvo una alta cantidad de semillas formadas y, aunque se aprecian diferencias, éstas no fueron significativas. Lo que sugiere que, las polinizaciones cruzadas fueron hechas correctamente. También, al no encontrarse diferencias en la producción de semillas entre el control y la polinización cruzada, pero sí con los dos tratamientos de autopolinización, se especula que los frutos y las semillas formadas en el control pudieron formarse por entrecruza, que a su vez indica que la actividad de los polinizadores es alta y además existe una constancia por parte de los insectos que forrajean y transportan el polen de las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*.

A pesar de que no existen diferencias entre el control y el tratamiento de polinización cruzada, ni en la forma ni en el número de semillas producidas, por el primero excede el del segundo. Esto sugiere que los polinizadores que visitan las flores de en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* tienen un papel importante en la polinización cruzada, lo que se ve reflejado en la formación de semillas y en el número de granos de polen por flor que exceden el número de óvulos con el fin

de maximizar la fecundación, argumento defendido por Mitchell (1997) en otras especies.

Depresión endogámica

En cuanto a la depresión por endogamia, el número de frutos formados, el número de semillas y el resultado acumulativo mostraron que la población de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se presenta depresión por endogamia. De acuerdo a Lande y Schemske (1985) y Husband y Schemske (1996), las diferencias en la formación de frutos y la baja cantidad de semillas son un fuerte indicador de la presencia de depresión endogámica.

Por lo tanto la depresión endogámica presente en la población estudiada de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* marca una presión de selección que favorece el entrecruzamiento como lo mencionan Lande y Schemske (1985). Lo que se ve reflejado en las semillas formadas por tratamiento, en la gran cantidad de polen que producen las flores y en la presencia de hercogamia.

Una manera de compensar la baja cantidad de semillas de autocruza, es por medio del reclutamiento de individuos que provengan de semillas con embriones viables y competentes. Esta compensación tiende a aumentar la incidencia de alelos letales en la población, lo que causaría una futura purga genética en donde los individuos que permanezcan serán aquellos con mayor heterocigosis, que a su vez, favorece la autocruza porque se reduce el riesgo de depresión endogámica. Si estos eventos ocurren a largo plazo, se puede

reconocer un ciclo en donde las poblaciones oscilan entre la tendencia hacia la entrecruza y tendencia hacia la autocruza. Por esta razón, los sistemas mixtos prevalecen, gracias a la compensación reproductiva (Porcher y Lande, 2005).

Visitantes florales

El promedio de visita de los polinizadores indican que existe una constancia floral por parte del insecto especialista *Cryptalyra* sp. porque fue observado únicamente forrajeando las flores de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*. Cuando los polinizadores visitan únicamente las flores de una especie hace que aumente la tasa reproductiva debido a que el polen es transportado de una flor a otra (entrecruza) evitando contaminación o la saturación del estigma por polen de otras especies. Por lo tanto, la manera en la que los polinizadores sean efectivos y transporten el polen influye en gran parte en los sistemas de cruza (Grindeland, *et al.*, 2005; Molina-Montenegro y Cavieres, 2006).

Es posible que los polinizadores lleven a cabo autopolinización facilitada (Lloyd, 1979), en donde el transporte de polen lo realizan al estigma de la misma flor, pero la cantidad de semillas formadas en la polinización abierta refleja que en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* el transporte de polen es altamente efectivo, sobre todo en las primeras horas de antesis, que es cuando *Cryptalyra* sp. tiene mayor actividad y los estigmas se observan saturados de polen. Las abejas observadas, no son polinizadores exclusivos de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* porque éstas también forrajean flores de otras especies que se encuentran a los

alrededores. Además, su actividad es posterior a la de *Cryptalyra* sp. Entonces, el polen depositado por las abejas, ya sea de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* o no, queda por encima del polen depositado por *Cryptalyra* sp., el cual tuvo la ventaja de ser depositado antes y que incluso ya pudieron haber germinado.

Recompensas florales

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* no tiene nectarios florales, por lo que la visita constante de los polinizadores está relacionada con otros mecanismos de atracción de las flores (polen principalmente) y con las recompensas que producen. Con los resultados que se obtuvieron en las pruebas histoquímicas y lo que se ha reportado en otros grupos como evidencia, es posible que los polinizadores sean atraídos por los lípidos, os en los verticilos florales o bien, de las gotas lipídicas que se adhieren al polen, posiblemente secretados por el tapete y adheridos a los granos de polen maduros.

Se ha reportado que en 28 grupos de angiospermas (Renner y Schaefer, 2010), las flores ofrecen aceites como recompensa, que se secretan en glándulas o en estructuras especializadas como los elaióforos (Vogel, 1990). Existe un grupo de abejas neotropicales que pertenecen a la familia Apidae, en donde se encuentra *Apis mellifera*, que se caracterizan por poseer estructuras que le permiten recoger el aceite de las flores (Torretta *et al.*, 2011). Dichas recompensas tienen un gran aporte nutrimental, las abejas utilizan los aceites florales mezclados con polen para alimentar a sus larvas o la elaboración de sus

colmenas (Grajales-Conesa, *et al.* 2011), sumado a los azúcares contenidos en los granos de polen (Hidalgo, *et al.* 1990). En *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se observa que los granos de polen se cubren del aceite. Cuando los polinizadores llegan a la flor, el polen se adhiere a su cuerpo con facilidad gracias a las características morfológicas, tanto del polinizador como del polen, por ejemplo, la ornamentación reticulada del grano de polen (Fig. 8c y d) (Pacini y Hesse 2005).

En los acercamientos a los estomas de cada verticilo se aprecian las secreciones, las cuales también varían, aunque este resultado puede deberse a que las sustancias secretadas se van lavando con el proceso de deshidratación del material para su observación bajo el MEB. La densidad de los estomas varía entre los verticilos sexuales, presentándose una mayor densidad por unidad de área en los órganos sexuales, que, como ya se mencionó, es posible que funcionen como atrayentes y/o recompensas para los polinizadores, quienes son atraídos por su alta concentración tanto en anteras (en donde se adhiere el polen al cuerpo del insecto), como en el ovario. En un estudio realizado en *Clarkia breweri* de la familia Onagraceae, se encontró que los pétalos producen compuestos en las células epidérmicas que funcionan como atrayentes por medio del olor (Dudareva y Pichersky, 2000). En *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* se encuentran estomas en la epidermis de sépalos y pétalos que secretan lípidos, pero no se sabe con certeza la función de las secreciones.

En la actualidad no existen estudios que revelen la presencia de estomas por los cuales salgan las secreciones de las flores, en la familia Papaveraceae.

Por esta razón es importante continuar con estudios de este tipo que detallen la biología de la polinización relacionada con los mecanismos de atracción y los tipos de recompensa dentro de la familia.

La presencia de estomas no funcionales en sépalos y pétalos puede estar o no relacionada con la reproducción, debido a su baja concentración, pueden servir como defensa al secretar sustancias para evitar que los polinizadores también se alimenten de los tejidos florales (McCall e Irwin 2006, Zangerl y Berenbaum, 2009; Tsuji y Sota, 2010).

La presencia de taninos, producto del metabolismo secundario de las papilas estigmáticas (Fig. 9), también funciona como protección contra herbívoros y contra patógenos, tales como bacterias (Swain 1977), que puedan hallarse entre las papilas, ya que el estigma es una superficie apta para la incubación de microorganismos (Spinelli *et al.* 2005). Por lo tanto, las plantas de *A. ochroleuca ssp. ochroleuca* no sólo invierten en la producción de gametos, sino también en la producción de posibles recompensas, atrayentes florales y de sustancias protectoras.

Crecimiento de tubos polínicos

En adición a los tratamientos de polinización que se realizaron en campo, la observación de los tubos polínicos al MEB muestran que los granos de polen sólo pueden ser depositados en una zona específica del estigma provista de papilas, las cuales no sólo tienen una función importante para el reconocimiento,

la hidratación y la germinación del grano de polen (Safavian y Goring 2013), sino también sirven como guía para dirigir a los tubos polínicos hacia el ovario (Cruz y Cruz, 2013).

El carecer de estilo también es un carácter que favorece la fecundación, ya que la distancia que debe recorrer el tubo polínico es menor, lo que permite que se conserve energía para crecer lo suficiente para fecundar los óvulos de la parte basal del ovario, ayudado por las papilas de la placenta (Fig. 8g y h) por las cuales se desliza (Vázquez, 2013).

Sistemas de autoincompatibilidad

Las fotomicrografías en fluorescencia de los tubos polínicos revelan que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* es una especie autocompatible, a diferencia de *A. munita*, que se describe como sistema semicompatible, puesto que sí hay formación de frutos en la autofecundación, debido a genes *S* débiles o no funcionales que permiten la germinación del polen y el paso de los tubos polínicos a través del estigma hacia el ovario (Paape *et al.*, 2011; Bilinski y Kohn, 2012). En, *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* no se puede decir que presenta un sistema similar al de *A. munita*, ya que no se sabe si la diferencia en el largo de los tubos polínicos se deba a un sistema de autoincompatibilidad, o bien a que esa parte de los tubos polínicos se encuentra en uno de los canales estigmáticos por lo que se observan agrupados y lejanos. Por lo tanto queda abierta a la posibilidad de que la baja formación de semillas y frutos en los tratamientos de

autopolinización se deban a un sistema de autoincompatibilidad débil, o bien, se debe a la depresión por endogamia como se ha detallado anteriormente.

La variabilidad en la formación de semillas y de frutos por medio de la autopolinización puede deberse a que en algunas plantas, la autoincompatibilidad se pierde o se debilita con el paso del tiempo (Good-Avila y Stephenson, 2002), es decir que el posible sistema de autoincompatibilidad puede ser menos estricto en los últimos días de anthesis, permitiendo a las plantas asegurar su reproducción, como ocurre en una especie de la familia Convolvulaceae, cuyo mecanismo de autoincompatibilidad se debilita en algunos individuos, a lo largo de los cuatro días de anthesis (Good-Avila y Stephenson, 2002).

También se ha reportado que en algunas especies poliploides han perdido las características que confieren autoincompatibilidad (Chawla *et al.* 1997). Para confirmar este hecho, sería útil que estudios como los del presente trabajo se realizaran en las especies parentales de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* (*Argemone ochroleuca* y *Argemone mexicana*) (Karnawat y Malik 2011), para saber si presentan características de un sistema de autoincompatibilidad y si se ha reducido en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*.

Cabe la posibilidad de que *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presente otros tipos de sistemas de autoincompatibilidad de acción tardía (sistemas de autoincompatibilidad ováricos) o autoesterilidad, que hagan que la producción de semillas por autocruza sea baja o nula. Éstos se caracterizan por

llevar a cabo el rechazo del tubo polínico a nivel del ovario, ya sea antes o después de la fecundación (Allen y Hiscock, 2008). La etapa en la que se lleve a cabo el rechazo del tubo polínico en estos sistemas ováricos, es difícil de saber, además de que no se conocen con exactitud dichos mecanismos, podría ser también, una consecuencia de la depresión endogámica. Lo anterior explica por qué en los tratamientos de autopolinización se observan semillas colapsadas o no formadas, quiere decir que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* podría presentar un sistema de autoincompatibilidad ovárico, ya que en las fotomicrografías sí se observa crecimiento del tubo polínico a través del ovario hasta llegar a los óvulos, por lo que la inhibición del tubo polínico debería ocurrir momentos antes o después de la fecundación. La presencia de dichos sistemas ováricos se ha relacionado con la presencia de estilos huecos o bien, a la ausencia de un verdadero estilo (Allen y Hiscock, 2008), tal como ocurre en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*.

A pesar de estas características del estilo presentes en diversas especies de la familia Papaveraceae, no se ha reportado, hasta la fecha, algún caso de inhibición ovárica en dicha familia, ni en el orden al que pertenece (Ranunculales) (Allen y Hiscock, 2008).

Evolución de los sistemas de cruza en *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*

Los resultados de este trabajo, en conjunto, demuestran que *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* presenta un sistema mixto que, según el modelo de Lande y

Schemske (1985), se ve favorecido por la entrecruza ya que las autopolinizaciones dejan a la población con altos niveles de depresión por endogamia. Las características que apoyan esta idea, son las que promueven la polinización cruzada, entre las que se encuentran: la hercogamia en las flores, las secreciones florales, la vasta cantidad de polen y finalmente, las interacciones que se han creado con *Cryptalyra* sp. Lo anterior no es consistente con lo que menciona Barrett (2013) acerca de la existencia de una tendencia evolutiva, en donde los sistemas de cruza xenógamos y de autoincompatibilidad muestran una evolución con dirección hacia la autogamia y hacia la autocompatibilidad, respectivamente. Este caso sería una excepción, en donde las presiones de selección están dirigiendo el sistema mixto de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca* hacia la entrecruza.

Dispersión de semillas

Con respecto a la dispersión de las semillas, las plantas presentan anemocoria, es decir, las semillas se dispersan alrededor de la planta madre con el movimiento de los frutos por acción del viento. Esto provoca que para la siguiente temporada, varias plantas crezcan cercanas unas de otras aumentando la densidad, lo que confiere una desventaja como se ha mencionado anteriormente. Aunque en la población estudiada no se observó dispersión secundaria, es decir, una vez que la semilla sale del fruto y es dispersada por otro vector, no se descarta que esto pueda ocurrir.

Con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se tiene un conocimiento más amplio sobre las estrategias reproductivas presentes en una maleza, las cuales podrían ayudar a explicar su amplia distribución. Sin embargo, es claro que se requieren más estudios de este tipo, en especies del mismo género o familia que contribuyan, en conjunto, al entendimiento de la transición de los sistemas de cruza y a la evolución y pérdida de los sistemas de autoincompatibilidad en la familia Papaveraceae, así como de las estrategias reproductivas presentes en malezas, lo que les confiere mayores ventajas en la colonización de nuevas áreas.

CONCLUSIONES

Argemone ochroleuca ssp. *ochroleuca* lleva a cabo su reproducción sexual por medio de un sistema de cruza mixto, que se compone de características que favorecen el entrecruzamiento pero que permiten la autopolinización. Lo anterior, sumado a la efectiva dispersión de las semillas nos permite entender los algunos factores que promueven la colonización y la amplia distribución de *A. ochroleuca* ssp. *ochroleuca*.

Entre las características que promueven la entrecruza, se encuentran las posibles recompensas florales que producen las flores a través de sus estomas no funcionales que secretan lípidos, o bien la alta cantidad de polen producido por las flores. También la separación espacial de los órganos sexuales, que impiden la saturación del estigma por polen propio, aumentando la efectividad de la polinización cruzada.

Aunque la formación de semillas es mayor por la vía de entrecruza, también la autocruza ofrece un aseguramiento reproductivo asociado a la autocompatibilidad y a la presencia de pseudocleistogamia en algunas flores. Estos mecanismos de aseguramiento reproductivo conducen a la población hacia un estado de depresión endogámico. La depresión por endogamia se muestra como evidencia de cómo una especie con un sistema de cruza mixto, tiende hacia la entrecruza.

LITERATURA CONSULTADA

- Alamri, S. A. y M. F. Moustafa. 2010. Antibacterial activity of the latex of *Argemone ochroleuca* Sweet. *Saudi Medical Journal* 31(11): 1207–1210.
- Allem, A. C. 2004. Optimization theory in plant evolution: An overview of long-term evolutionary prospects in the angiosperms. *The Botanical Review* 69(3): 225-251.
- Allen, A. M. y S. J. Hiscock. 2008. 4. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. En: V. E. Franklin-Tong (ed.), *Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*. Berlin: Springer. p: 73-102.
- Amasino, R. M. 2005. Vernalization and flowering time. *Current opinions in biotechnology* 16:154-158.
- A.P.G. [= Angiosperm Phylogeny Group] III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Baker, H. G. 1967. Self-compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. *Evolution* 9(3): 347-349.
- Barrett, S. C. H. 1995. Mating-system evolution in flowering plants: micro- and macroevolutionary approaches. *Acta Botanica Neerlandica* 44(4): 385– 402.
- Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3(9): 335–341.
- Barrett, S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3(4):274-284.
- Barrett S. C. H. 2011. Why reproductive systems matter for the invasion biology of plants. En: Richardson, D. M. (Ed.) *Fifty years of invasion ecology: The legacy of Charles Elton*. 1ra. Edición. Blackwell Publishing Ltd. Methuen, Londres. p: 195-210.
- Barrett, S. C. H. 2013. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible?. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 1-9.
- Barrett S. C. H. 2014. Evolution of mating systems: Outcrossing versus selfing. En: Losos, J. (Ed.). *The Princeton guide to evolution*. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey. p: 356-362.
- Bernardello, G., G. J. Anderson, T. F. Silvestry y D. J. Crawford. 2001. A survey of floral traits, breeding systems, floral visitors, and pollination system of the angiosperms of the Juan Fernández islands (Chile). *The Botanical Review* 67(3):255-308.
- Bilinski, P. 2010. Sites of Self-Pollen Tube Inhibition in Papaveraceae (*sensu lato*). Thesis of M.S. in Biology. UC San Diego. 23 pp.
- Bilinski, P., y J. Kohn. 2012. Sites of self-pollen tube inhibition in Papaveraceae (*sensu lato*). *Plant Systematics and Evolution* 298(7): 1239–1247.
- Calderón de Rzedowski, G. 1991. Flora del bajío y de regiones adyacentes. *Fascículo 1: Familia Papaveraceae*. 36 pp.
- Carrió, E., R. Herreros, G. Bacchetta y J. Güemes. 2008. Evidence of Delayed Selfing in *Fumana juniperina* (Cistaceae). *International Journal of Plant Sciences* 169(6): 761–767.
- Carrió, E., y Güemes, J. 2013. The role of a mixed mating system in the reproduction of a Mediterranean subshrub (*Fumana hispidula*, Cistaceae). *Journal of plant research* 126(1): 33–40.

- Castellanos, M. C., Wilson, P. y Thomson, J. D. 2004. "Anti-bee" and "pro-bird" changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* 17:876-885.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- Chawla, B., R. Bernatzky, W. Liang y M. Marcotrigiano. 1997. Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum*: inheritance and expression of S-related proteins. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 992-996.
- CONABIO. 2009. Malezas de México. Heike Vibrans (ed.). Consultado el 25 de abril del 2014. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone-ochroleuca/fichas/ficha.htm>
- Cruden, R. W. 1976. Intraespecific variation in pollen-ovule ratios and nectar secretion-preliminary evidence of ecotypic adaptation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 277-289.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Cruz, F. y Y. Cruz. 2013. Interacción polen-pistilo. En: Biología de Angiospermas, Márquez, J. G., Collazo, M. O., Martínez, M. G., Orozco, A. S. y Vázquez, S. S. (eds.) UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de la Investigación Científica, 1a. ed. México, p: 110-117.
- Dalling, J. W. 2002. Ecología de semillas. En: Guariguata, M. y Kattan, G. (eds.). Ecología y conservación de bosques tropicales, Libro Universitario Regional. Cartago, Costa Rica, p: 345-375.
- de Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics. Vol. 3. Springer-Verlag, Berlín. 232 pp.
- de Nettancourt, D. 2001. Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Berlin: Springer-Verlag.
- Dieringer, G., y Cabrera, L. 2002. A manual for the study of pollination ecology at field stations. 39 pp.
- Domínguez, C. y J. R. Pérez. 2013. Tema IV. Capítulo III. La biología de la polinización. En: Márquez, J. et al. Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México, Las prensas de Ciencias, México, D. F. p: 101-109.
- Durareva, N. y E. Pichersky. 2000. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology* 122: 627-633.
- Fisher, R. A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics* 11:53-63.
- Fletcher, M. T., G. Takken, B. J. Blaney y V. Alberts. 1993. Isoquinoline alkaloids and keto-fatty acids of *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Mexican Poppy). *Australian Journal of Agricultural Research* 44: 265 - 275.
- Foote, H. C. C., J. P. Ride, V. E. Franklin-Tong, E. A. Walker, M. J. Lawrence y F. C. Franklin. 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2265-2269.
- Geber, M., T. Dawson y L. Delph. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Berlín: Springer- Verlag. 305 pp.
- Godínez-Álvarez, H., Jiménez, M., Mendoza, M., Pérez, F., Roldán, P., Ríos-Casanova, L., y Lira, R. 2008. Densidad, estructura poblacional, reproducción y supervivencia de cuatro especies de plantas útiles en el Valle de Tehuacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 393-403.

- Good-Avila, S. V. y A. G. Stephenson. 2002. The inheritance of modifiers conferring self-fertility in the partially self-incompatible perennial, *Campanula repunculoides*. *Evolution* 50:54-70.
- Goodwillie, C., S. Kalisz y C. G. Eckert. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36(1): 47-79.
- Grajales-Conesa, J., V. Meléndez-Ramírez y L. Cruz-López. 2011. Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1356-1367.
- Grindeland, J. M., N. Sletvold y R. A. Ims. 2005. Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology* 19(3): 383–390.
- Gurevitch, J., S. M. Scheiner, and G. A. Fox. 2002. The ecology of plants. Sinauer Assoc., Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Hannan, G. L. 1981. Flower color polymorphism and pollination biology of *Platystemon californicus* Benth. (Papaveraceae). *American Journal of Botany* 68(2):233-243.
- Harder, L. D. y M. B. Routley. 2006. Pollen and ovule fates and reproductive performance by flowering plants. En: Harder, L. D. y Barret, S. C. H. (eds.). *Ecology and evolution of flowers*, Oxford University Press, 1a. ed. Gran Bretaña, p: 61-80
- Hidalgo, I., M. L. Bootello y J. Pacheco. 1990. Origen floral de las cargas de polen recogidas por *Apis mellifera* L. en Alora (Málaga, España). *Acta Botánica Malacitana* 15: 33–44.
- Hidalgo, O. y S. Gleissberg. 2010. Evolution of reproductive morphology in the Papaveraceae s.l. (Papaveraceae and Fumariaceae, Ranunculaceae). *International Journal of Plant Developmental Biology* 4(1):76-85.
- Husband, B. C. y D. W. Schemske. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50:54-70.
- INEGI. 2007. Características principales del cultivo de nopal en el Distrito Federal. caso Milpa Alta: Censo agropecuario 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 68 pp.
- Jiménez-Durán, K., y Cruz-García, F. 2011. Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotecnia Mexicana* 34(1): 1–9.
- Karlsson, L. M., T. Tamado y P. Milberg. 2003. Seed dormancy pattern of the annuals *Argemone ochroleuca* and *A. mexicana* (Papaveraceae). *Flora* 198: 329–339.
- Karnawat, M. y C. P. Malik. 2011. Determination of nature of polyploidy in *Argemone ochroleuca* ssp. *ochroleuca* Sweet. *The Nucleus* 54(3): 153–158.
- Kear, P. J. y B. McClure. 2012. How didflowering plants learn to avoid blind date mistakes? Self-incompatibility in plants and comparisons with nonself rejection in the immune response. En: López-Larrea, C (ed.) *Self and nonself*. Landes Bioscience. Springer Series: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 738:108-123.
- Kephart, S. R., E. Brown y J. Hall. 1999. Inbreeding depression and partial selfing : evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic , *Silene douglasii* var . *oraria* (Caryophyllaceae). *Heredity* 82: 543–554.
- Kuhn, M. 1867. Einige Bemerkungen über *Vandellia* und den Blüten Dimorphismus. *Botanische Zeitung* 25: 65–67.

- Lande R. y D. W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.
- Lloyd, D. G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *The American Naturalist* 113(1): 67-79.
- Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153: 370-380.
- López, M., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las prensas de Ciencias. México, D. F. 178 pp.
- Lord, E. M. 1981. Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *The Botanical Review* 47(4):421-442.
- Losey, J. E. y Vaughan, M. 2006. The economic value of ecological services provided by insects. *BioScience* 56(4): 311.
- Lundqvist, A. 1964. III. Frequency of specific incompatibility alleles in a population of *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas* 52:189-196
- Malik, C. P. y I. S. Grover. 1973. The Genus *Argemone*. *Theoretical and Applied Genetics* 43: 329– 334.
- Mandujano, M., I. Carrillo-Ángeles, C. Martínez-Peralta y J. Golubov. 2010. Reproductive Biology of Cactaceae. En: K. G. Ramawat (Ed.). *Desert Plants*. Berlín: Springer- Verlag. p: 197-230.
- Martínez, J. M. y S. Armendáriz. 2010. Bases morfológicas de cómo pudo haberse originado el dimorfismo sexual en el pasto Búfalo. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3(4): 69-73.
- McCall, A. C. e R. E. Irwin. 2006. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. *Ecology Letters* 9: 1351-1365.
- Mitchell, R. J. 1997. Effects of pollination intensity on *Lesquerella fendleri* seed set: variation among plants. *Oecología* 109:382-388.
- Molina-Montenegro, M. A., y Cavieres, L. A. 2006. Efecto de la densidad y tamaño floral sobre el éxito reproductivo de *Nothoscordum graminum* (Alliaceae). *Gayana* 63(1): 93–98.
- Ohara, M. y Higashi, S. 1994. Effects of inflorescence size on visits from pollinators and seed set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). *Oecología* 98:25-30.
- Ownbey, G. B. 1958. Monograph of the genus *Argemone* for North America and the West Indies. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 21:1- 159.
- Ownbey, G. B. 1961. The genus *Argemone* in South America and Hawaii. *Brittonia* 13: 91–109.
- Paape, T., T. Miyake, N. Takebayashi, D. Wolf y J. R. Kohn. 2011. Evolutionary genetics of an S-like polymorphism in Papaveraceae with putative function in self-incompatibility. *PLoS one* 6(8): 2–14.
- Pacini E. y M. Hesse. 2005. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora* 200: 399-415.
- Pannell, J. R. 2006. Effects of colonization and metapopulation dynamics on the evolution of plant sexual systems. En: Harder, L. D. y Barrett, S. C. H. (eds.). *Ecology and evolution of flowers*, Oxford University Press, 1a. ed. Gran Bretaña. p: 223-238.
- Petenatti, E. M., y Del Vitto, L. A. 2000. Papaveraceae. In C. Ciarlante (Ed.), *Flora Fanerogámica Argentina*. Argentina: IMBIV. p: 907–908.
- Pierre-Olivier, C. 2012. The evolution of plant mating system: Is it time for a synthesis? En: Fusté, M. Carmen (ed.). *Studies in Population Genetics*. InTech, Croacia. p: 17-38.

- Porcher, E y R. Lande. 2005. Reproductive compensation in the evolution of plant mating systems. *New Phytologist* 166: 673-684.
- Quero, A., J. Enríquez, C. Morales y L. Miranda. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 1(1):25-42.
- Quiroz-García, D. L., R. Palacios-Chávez y M. Arreguin-Sánchez. 1994. Flora polínica de Chamela, Jalisco (Familias Amaranthaceae, Combretaceae, Loasaceae, Martyniaceae, Papaveraceae, Tiliaceae y Violaceae). *Acta Botánica Mexicana* 29: 61–81.
- Renner, S. S. y H. Schaefer. 2010. The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 365: 423-435.
- Reyes, F. D., C. J. Peña, M. Canales, M. Jiménez, S. Meráz y T. Hernández. 2011. Antimicrobial activity of *Argemone ochroleuca* Sweet (Chicalote). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10(2): 139–146.
- Richards, A. J. 1997. Plant breeding systems. 2da. Edición. Chapman y Hall. Nueva York.
- Ruan, C. J., H. Li y S. Mopper. 2009. *Kosteletzkya virginica* displays mixed mating in response to the pollinator environment despite strong inbreeding depression. *Plant Ecology* 203(2): 183–193.
- Safavian, D. y D. R. Goring. 2013. Secretory activity is rapidly induced in stigmatic papillae by compatible pollen, but inhibited for self-compatible pollen in the Brassicaceae. *PLoS ONE* 8(12): e84286.
- Schneider, E. L. y D. M. Nichols. 1984. Floral biology of *Argemone aurantiaca* (Papaveraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 3(1): 1-7.
- Schwarzbach, A. E., y J. W. Kadereit. 1999. Phylogeny of prickly poppies , *Argemone* (Papaveraceae), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant Systematics and Evolution* 218: 257–279.
- Spinelli, F., F. Ciampolini, M. Cresti, K. Geider y G. Costa. 2005. Influence os stigmatic morphology on flower colonization by *Erwinia amylovora* and *Pantoea agglomerans*. *European Journal of Plant Pathology* 113: 395-405.
- Stebbins, G. L. 1970. Adaptative radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- Stebbins, G. L. 1974. Flowering plants: evolution above the species level. Belknap Press, Cambridge, Massachusetts. 400 pp.
- Steffan-Dewenter, I., Potts, S. y Packer, L. 2005. Pollinator diversity and crop pollination services are at risk. *Trends in ecology & evolution* 20(12): 651-652.
- Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annual review of Plant Physiology* 28: 479-501.
- Tepedino, V. J., T. L. Griswold, y W. R. Bowlin. 2010. Reproductive biology, hybridization, and flower visitors of rare *Sclerocactus* taxa in Utah's Uintah basin. *Western North American Naturalist* 70(3): 377–386.
- Torretta, J. P., N. E. Gómez, S. S. Aliscioni y M. E. Bello. 2011. Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (Orchidaceae, Cymbidieae, Oncidiinae). *Darwiniana* 49(1): 16-24.
- Tsuji, K. y T. Sota. 2010. Sexual differences in flower defense and correlated male-biased florivory in a plant-florivore system. *Oikos* 119(11): 1848-1853.
- Vázquez, S. S. 2013. Desarrollo del gineceo. En: Biología de Angiospermas, Márquez, J. G., Collazo, M. O., Martínez, M. G., Orozco, A. S. y Vázquez, S. S. (eds.)

- UNAM, Facultad de Ciencias: Coordinación de la Investigación Científica, 1a. ed. México, p: 90-100.
- Vogel, S. 1990. History of the Malpighiaceae in the light of pollination ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130-142.
- Wheeler, M. J., B.H.J. de Graaf, N. Hadjiosif, R.M. Perry, N.S. Poulter, K. Osman, S. Vatovec, A. Harper, F.C.H. Franklin, V.E. Franklin-Tong. 2009. Identification of the pollen self-incompatibility determinant in *Papaver rhoeas*. *Nature* 459: 992–995.
- Wink, M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* 75:225-233.
- Zangerl, A. R. y M. R. Berenbaum. 2009. Effects of florivory on floral volatile emissions and pollinator succes in the wild parship. *Arthropod-Plant interactions* 3:181-191.