



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Desarrollo de las estructuras masculinas en *Prockia  
oaxacana* J. Jiménez Ramírez & Cruz Durán  
(Salicaceae): una especie poligamodioica**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIOLÓGA**

**P R E S E N T A :**

**ANA LAURA URRUTIA CÁRDENAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN  
2016**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Urrutia

Cárdenas

Ana Laura

55 2332 8090

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412060089

### 2. Datos del tutor

Dra.

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jaime

Jiménez

Ramírez

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Martha Juana

Martínez

Gordillo

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.

Juan Enrique

Fornoni

Agnelli

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Mónica Karina

Pérez

Pacheco

### 7. Datos del trabajo escrito.

Desarrollo de las estructuras masculinas en *Prockia* oaxacana J. Jiménez Ramírez & Cruz Durán (Salicaceae): una especie poligamodioica

64p

2016

## DEDICATORIA

A mis padres, Alejandro Urrutia y Claudia Cárdenas, por su apoyo y amor incondicional que me han acompañado y fortalecido incluso lejos de casa.

A mi hermano Alejandro por ser mi mejor amigo todos los días a todas horas.

A Mariana y Esther que con su cariño me han enseñado a ser más valiente.

A Ana que me ha acompañado con su amistad durante mucho tiempo.

A mis amigas que me han ayudado a descubrir que el mundo es extraordinario: Rosa, Ara, Ana Laura, Fernando, José y Bere.

A la familia Wence Cárdenas por abrirme su casa y su corazón.

A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, por su compañía, su cariño y su apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, máxima casa de estudios, por darme la maravillosa oportunidad de formar parte de la comunidad universitaria.

A la Dra. Judith Márquez Guzmán, por todo su apoyo y por su pasión por enseñar que siempre me llenó de entusiasmo por la botánica.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez por sus enseñanzas y su paciencia en el laboratorio.

Al M. en C. Ricardo Wong por ayuda y compañía en el laboratorio y especialmente en el campo.

A la Biol. Yolanda Hornelas por su apoyo brindado en el procesamiento, observación y toma de fotografías en el microscopio electrónico de barrido.

A la M. en F. P. Ana Isabel Bieler por su apoyo ofrecido en la toma de micrografías.

A las profesoras del Taller de Biología en la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dra. Margarita Collazo Ortega, Dra. Karina Jiménez Durán, Dra. Ana Laura López Escamilla, M. en C. Patricia Olguín Santos y Javier Andrés Suárez Díaz, por sus enseñanzas y consejos.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas y a todos sus integrantes por toda la experiencia y todo lo que me permitió aprender.

Al jurado revisor: Dra Judith Márquez Guzmán, Dr. Jaime Jiménez Ramírez, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo, Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli, M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco, por sus correcciones y comentarios que enriquecieron este trabajo.

## Índice

▪ Resumen.....	7
▪ Introducción.....	8
▪ Antecedentes.....	10
- Taxonomía de Salicaceae.....	11
- Características embriológicas .....	13
- Sistemas reproductivos.....	16
▪ Dioecia criptica	
▪ Poligamodioecia	
▪ Androdioecia	
▪ Hipótesis.....	20
▪ Objetivos.....	20
▪ Materiales y métodos.....	20
- Sitio de estudio.....	20
- Trabajo en campo.....	22
- Trabajo en laboratorio.....	24
▪ Resultados.....	27
▪ Discusión.....	46
▪ Conclusión.....	53
▪ Referencias.....	54

**Si Dios es las flores y los árboles,  
Los montes, el sol y el claro de luna,  
Entonces creo en él,  
Creo en él a todas horas,  
Toda mi vida es oración y misa,  
Una comunión con los ojos y los oídos.**

Fernando Pessoa

## Resumen

*Prockia oaxacana* (Salicaceae) son árboles descritos con un sistema sexual poligamodioico. Estudios recientes han demostrado que existen dos tipos de individuos en las poblaciones, cada tipo de individuo con un morfo floral diferente. Un morfo con estilo corto, óvulos atrofiados y anteras, denominado morfo masculino y un morfo con estilo largo, óvulos bitégmicos con células en su interior y anteras, denominado morfo hermafrodita.

Este trabajo se dedicó al estudio del desarrollo y la estructura del polen en ambos morfos florales, utilizando microtecnia convencional, microscopía electrónica de barrido y acetólisis.

*Prockia oaxacana* tiene  $137.6 \pm 24.51$  estambres en el morfo masculino y  $106 \pm 24.44$  en el morfo hermafrodita. Las anteras son tetrasporangiadas bilobuladas con dehiscencia longitudinal. Cada morfo floral posee un tipo polínico distinto: el hermafrodita tiene granos de polen de mayor tamaño ( $14.86 \pm 1.18 \mu\text{m}$ ) y policolpados. Los granos de polen del morfo masculino miden  $10.10 \pm 1.07 \mu\text{m}$  en el diámetro ecuatorial y son tricolporados. El desarrollo de los granos de polen en ambos morfos sigue un desarrollo normal hasta antes de la meiosis. A partir de este evento, en el morfo hermafrodita, se observa un patrón anómalo en el desarrollo que termina con la producción de granos de polen colapsados. En el morfo masculino el desarrollo del polen lleva a la formación de granos de polen con citoplasma, dos núcleos y exina bien formada. A estos granos de polen se los ha visto germinando sobre los estigmas del morfo hermafrodita.

Con lo observado se puede decir que *P. oaxacana* presenta un sistema reproductivo dimórfico y junto con los estudios realizados por Quiroz (2015) la morfología del gineceo y del androceo de *P. oaxacana* indica un sistema dioico críptico.

## Introducción

En las angiospermas se encuentra una gran variedad de sistemas reproductivos que han sido estudiados a lo largo de los años y de los que han surgido muchas preguntas importantes con respecto a su evolución y ecología. Un sistema reproductivo en plantas se refiere a la forma en la cual los órganos sexuales (androceo y gineceo) se posicionan tanto morfológica, espacial y algunas veces temporalmente en los individuos de una población. Estos sistemas reproductivos se pueden clasificar en dos grupos: monomórficos y polimórficos. Los sistemas sexuales monomórficos se caracterizan por presentar individuos con flores con expresión del sexo semejante en toda la población, dichas flores pueden ser exclusivamente bisexuales como las hermafroditas o pueden ser flores unisexuales masculinas y femeninas o incluso flores unisexuales entremezcladas con bisexuales como las ginomonoicas, andromonoicas y trimonoicas. En cambio, en los sistemas sexuales polimórficos los individuos de la población presentan flores de más de un tipo, por lo que debe haber por lo menos dos tipos de individuos. En los sistemas sexuales polimórficos se puede encontrar que las flores de los individuos son estrictamente unisexuales formando sistemas dioicos o existir individuos bisexuales mezclados con unisexuales en una población como las androdioicas, ginodioicas, trioicas y poligamodioicas (Orozco y Vázquez, 2013).

El 90% de las angiospermas han sido descritas como hermafroditas, entre 6 y 7% se consideran dioicas y tan solo 3 ó 4% de las plantas con flor presentan sistemas reproductivos como las ginodioicas, androdioicas y trioicas. Pese a representar tan solo 7% de los sistemas reproductivos, la dioecia se encuentra representada en casi la mitad de las familias de angiospermas y podría haberse originado por lo menos en 100 ocasiones distintas a partir de ancestros hermafroditas (Barrett y Hough, 2013).

*Prockia oaxacana* fue descrita como una especie poligamodioica (Jiménez et al., 2008); sin embargo, estudios realizados por Quiroz (2015) demuestran que los óvulos del morfo masculino se encuentran atrofiados o detenidos en las etapas

iniciales de la formación de tegumentos lo que sugiere que esta especie podría ser androdioica o dioica (Quiroz, 2015).

Para determinar cuál es el sistema reproductivo de *P. oaxacana*, es necesario empezar por estudiar, tanto los órganos femeninos como los masculinos presentes en los dos morfos florales, el hermafrodita y el masculino. Por tal motivo, el propósito de este trabajo fue estudiar el desarrollo de las estructuras masculinas en ambos morfos florales, determinando que sean estructuralmente viables, lo que sería clave para determinar, junto con otros factores, su funcionalidad.

## Antecedentes

*Prockia oaxacana* es una especie de la familia Salicaceae y del orden Malpighiales.

El orden Malpighiales es monofilético y consta de 16,000 especies aproximadamente, lo que constituye el 6% de la diversidad de angiospermas (Davis *et al.*, 2005). Malpighiales tuvo su origen en el Cretácico hace 114 millones de años y en la actualidad se reconocen 42 familias dentro del orden (Davis *et al.*, 2005; Korotkova *et al.*, 2009; Wurdack y Davis, 2009). Entre estas familias se encuentra Salicaceae.

La familia Salicaceae está ampliamente representada con 350 especies. Son arbustos y árboles leñosos dioicos, que habitan principalmente en el hemisferio norte (Fig. 1) (Leskinen y Alstöm-Rapaport, 1999; Glimn-Lacy y Kaufman, 2006). Tiene placentación parietal, los elementos de vaso exhiben placas de perforación simple o escalariforme; sus pecíolos son arqueados o anulares, con alas abultadas; la filotaxia es espiralada u opuesta, la lámina de la hoja tiene estípulas, es vernada, curvada-supervoluta o involuta; la venación es palmada. Tiene inflorescencias variables, con flores inconspicuas, unisexuales y/o bisexuales, aclamídeas o trímeras a hexámeras. Cuando se presentan sépalos y pétalos, se encuentran en un arreglo alterno, acompañados de brácteas y reunidos en amentos péndulos o erectos, con nectarios extraestaminales, regularmente con glándulas o lóbulos; anteras con línea de dehiscencia extrorsa. Son especies entomófilas, de color amarillo intenso y de colores más apagados en la anemófilas o de color rojizo como en los amentos del género *Populus*; estilos separados o fusionados; frutos en cápsulas (Glimn-Lacy y Kaufman, 2006; Wurdack y Davis, 2009; Stevens, 2012).

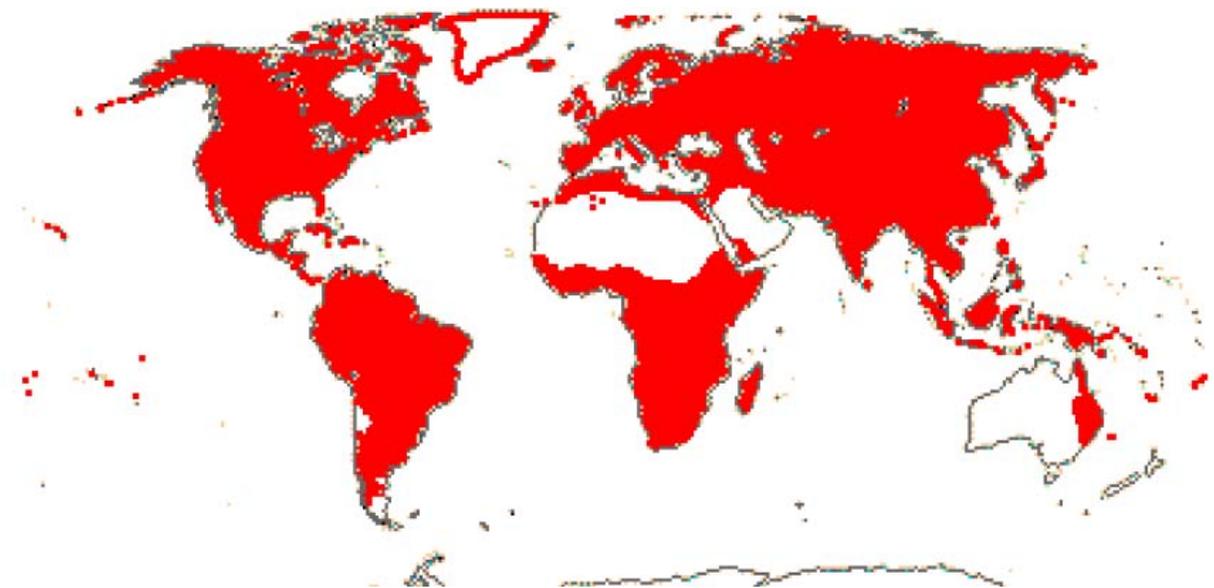


Figura 1. Distribución de la familia Salicaceae. Tomado de Stevens, 2012.

### Género *Prockia*

El género *Prockia* consta de seis especies: *P. crucis* P. Brown ex.L., *P. flava* H. Karst, *P. pentamera* A. H. Gentry, *P. costaricensis* Standl, *P. oaxacana* J. Jiménez Ram. et Cruz D., *P. krusei* J. Jiménez Ram. et Cruz D. y *P. jaliscana*, una nueva especie del estado de Jalisco (datos no publicados, Jiménez y Cruz, 2015). Estas especies se distribuyen en México, Centroamérica y Sudamérica (Fig. 2) (GBIF, 2015; Gilg, 1960; Jiménez y Cruz, 2005), además se caracterizan por tener hojas alternas, glabras o con tricomas, simples, con glándulas presentes en la base de las hojas o en el pecíolo, estípulas falciformes, dentadas y grandes, e inflorescencia en racimos. La flor es morfológicamente hermafrodita, el cáliz consiste de tres sépalos persistentes en el fruto. Los estambres son numerosos, con anteras redondas y dehiscencia lineal. El ovario está compuesto de 3 a 6 lóculos y las placentas están insertas en un pseudoeje; el fruto es una baya y las semillas son glabras (Alford, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Vázquez, 2013).



Figura 2. Distribución del género *Prockia* en América. Tomado de Quiroz (2015).

*Prockia oaxacana*

Árboles de 3 – 6 m de alto, con corteza exfoliante en placas, ramas con abundantes lenticelas blancas; hojas de ovadas a elípticas, con base redonda, ápice acuminado, margen crenado, ápice de cada diente terminado en una glándula, haz glabro y envés pubescente. Las inflorescencias son racemosas. Las flores miden 2 cm (incluyendo pedicelo), pareadas en cada nudo, con 3 brácteas en la base de cada par de flores; el cáliz tiene de 3 a 5 sépalos, verde-amarillentos, elípticos, ciliado-pubescentes en el margen, ápice agudo. Los estambres amarillos,

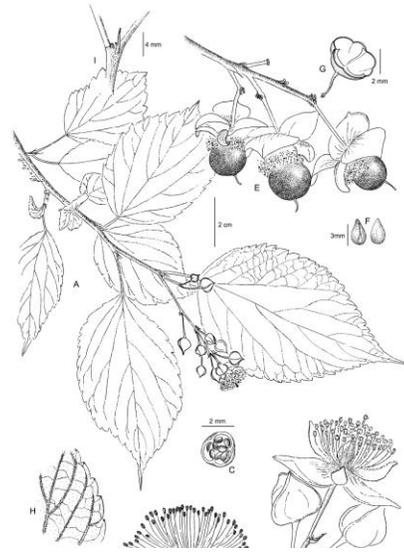


Figura 3. *Prockia oaxacana*. Tomado de Jiménez et al. (2008).

75 a 80, con anteras redondeadas, dehiscencia longitudinal; el ovario es unilocular, de 0.5 mm de diámetro, con 3 placentas parietales. El estilo es recto de 1 mm, el estigma ligeramente trilobulado. El fruto es una baya globosa, 4(-5.5) 3 4(-5.5) mm, negra cuando madura, con pedicelos de hasta 1.5 cm, con articulación de hasta 1 mm, sépalos rojos, persistentes, pétalos rojos, también persistentes, placentas ligeras e irregularmente intrusivas, estilo persistente, de hasta 3 mm. Las semillas son de 3 – 3.5 mm, negras, subglobosas, 4 a 7 por baya (Fig.3). *P. oaxacana* fue descrita como poligamodioica dado que presenta individuos con flores estaminadas y algunas flores pistiladas; en cambio, otros poseen solamente flores pistiladas (Jiménez *et al.*, 2008).

#### Características embriológicas de la familia Salicaceae

##### El androceo

El androceo corresponde al tercer verticilo de una flor completa y está constituido por esporófilas modificadas portadoras de sacos polínicos, dentro de los cuales se forman los granos de polen. El androceo está formado por estambres que son variables en número, según el grupo taxonómico (Ludlow, 2013).

En general los estambres, están formados por un filamento que sostiene en el extremo superior a la antera que es el órgano portador del polen. La antera está constituida por cuatro microsporangios, tejido conectivo y haz vascular; la antera tiene dos lóbulos o tecas que están compuestos, cada uno, por dos microsporangios. La meiosis ocurre dentro de los microsporangios y produce microsporas que más tarde germinan para formar el gametofito masculino (granos de polen) en el que se encuentran las células espermáticas (Vargas, 2011; Ludlow, 2013).

##### Pared de la antera

La pared de la antera está conformada por cuatro capas principales; la epidermis, el endotecio, las capas medias y el tapete. Existen cuatro tipos de formación de

pared de antera que se han clasificado con base a los patrones de división de las capas parietales secundarias, por lo que existen el tipo básico, el tipo monocotiledóneo, el tipo dicotiledóneo y el tipo reducido (Davis, 1966).

Desde la superficie de la antera hacia el interior, después de la epidermis se encuentra el endotecio. Esta capa celular es responsable de la dehiscencia de la antera. Sus células se agrandan y desarrollan engrosamientos de lignina en sus paredes tangenciales interiores, estos engrosamientos irradian hacia el exterior en el momento de la maduración de la antera (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992).

En el mismo orden, después del endotecio siguen las capas medias. Estas capas suelen almacenar nutrientes, el número varía desde cinco a ninguna capa media. Por lo general, se reabsorben durante el desarrollo, pero algunas pueden persistir o desarrollar engrosamientos fibrosos como los del endotecio (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992).

El tapete, la capa más interna, sirve como un tejido nutritivo que proporciona metabolitos, nutrientes y precursores lipídicos de la esporopolenina para el desarrollo del polen. Se sabe que las células tapetales transcriben genes implicados en la biosíntesis de la pared del polen, y en la secreción de la cubierta del polen, o trifina, que contiene flavonoides, fenolamidas, carotenoides, lípidos y proteínas que cubren la superficie y cavidades de la exina (Jiang *et al.*, 2013).

#### Microsporogénesis y microgametogénesis

La microsporogénesis es el proceso del desarrollo que lleva a la producción de cuatro esporas haploides a partir de un esporocito diploide por medio de la meiosis y citocinesis. La microsporogénesis es la producción de microsporocitos en las plantas heterospóricas y es un paso clave en el ciclo de vida de las plantas porque lleva a la formación de las microsporas haploides que darán lugar al gametofito masculino (Furness *et al.*, 2002; Ma, 2005).

Existen dos patrones básicos de microsporogénesis: el simultáneo y el sucesivo. En la microsporogénesis simultánea, después de la meiosis I no se deposita placa

celular y los dos núcleos existen en un citoplasma común, la meiosis II es seguida por una citocinesis simultánea entre los cuatro núcleos y la formación interna de calosa. En la microsporogénesis sucesiva, las divisiones celulares de la meiosis I y II son inmediatamente seguidas por la formación del fragmoplasto y la placa celular de calosa, formando las cuatro microsporas en tétradas que pueden ser tétradas tetragonales, romboidales, lineares o en forma de T (Furness *et al.*, 2002).

No se sabe mucho de la microsporogénesis de la familia Salicaceae. Para *Populus* se ha descrito una citocinesis simultánea posterior a la división nuclear. La calosa proviene de vesículas del tapete y las tétradas pueden ser tetraédricas, romboidales o irregulares (Furness, 2011).

Para *P. krusei* se ha reportado una meiosis simultánea que forma tétradas tetraédricas envueltas por calosa (Mayorga-Lizaola, 2013).

La microgametogénesis comienza con la liberación de las microsporas de las tétradas. Después de una división asimétrica del núcleo de las microsporas haploides, se forman los gametofitos masculinos. Durante la microsporogénesis, la microspora unicelular se divide asimétricamente para formar un grano de polen joven con una célula vegetativa y una generatriz. El grano de polen puede dispersarse en etapa bicelular o tricolular (Barinova *et al.*, 2002).

#### Grano de polen

En las plantas con semilla, el gametofito masculino es el grano de polen, un organismo en extremo reducido que está rodeado por tres capas: membrana plasmática, intina y exina. Las células vivas comprenden a la célula vegetativa y a la célula generatriz, que forma a los gametos masculinos. La intina está compuesta por celulosa y proteínas, suele tener un espesor homogéneo (Pearsall, 2000). La exina es la capa más externa, es una pared formada de esporopolenina una sustancia orgánica que se caracteriza por su resistencia. En las angiospermas la exina se divide en dos partes; la nexina, que es la capa interna y homogénea, y la sexina que es la capa externa y cuyas características esculpturadas,

conformadas por bastones que se pueden unir para formar columelas (baculas), se utilizan mucho para distinguir distintos grupos de plantas (Sáenz, 1978; Fahn, 1982; Nadot *et al.*, 2008).

Otra de las características que se utilizan para distinguir distintas taxa de plantas son la cantidad y el tipo de aperturas presentes en la pared del grano de polen. Estas aperturas son regiones que se diferencian en forma significativa del resto de la pared en morfología y anatomía y que funcionan como sitio de germinación del tubo polínico. Existen dos tipos principales de apertura; una apertura circular es llamada poro y una apertura elongada se llama colpo. Una combinación del poro y del colpo se llama colporo (Hesse *et al.*, 2009).

### Sistemas reproductivos

Un sistema reproductivo, en plantas, se refiere a la distribución y forma en la cual los órganos sexuales (androceo y gineceo) se posicionan tanto morfológica, espacial y algunas veces temporalmente en los individuos de una población (Sakai y Weller, 1999; Renner *et al.*, 2007; Orozco y Vázquez, 2013). *Prockia oaxacana* pertenece a un sistema polimórfico. En los sistemas sexuales polimórficos, los individuos de la población presentan flores de más de un tipo, por lo menos dos clases. En los sistemas sexuales polimórficos se puede encontrar que las flores de los individuos son estrictamente unisexuales, formando sistemas dioicos o existir individuos bisexuales mezclados con unisexuales en poblaciones androdioicas, ginodioicas o trioicas (Barret, 2002; Orozco y Vázquez, 2013).

Un concepto importante en el estudio de los sistemas reproductivos es el género funcional (Lloyd y Bawa, 1984; Hesse y Pannell, 2011) que permite cuantificar la adecuación de individuos o grupos para beneficiarse de la función masculina (granos de polen viables, paternidad de semillas) o la femenina (producción de semillas). De manera tradicional, se ha usado la morfología de la flor para clasificar los sistemas reproductivos, pero para fines evolutivos es muy importante

el género funcional que se basa en la adecuación de la función masculina o femenina (Delph y Wolf, 2005).

Por ejemplo, en poblaciones androdioicas, si los individuos hermafroditas producen mucho menos polen que los masculinos, los masculinos tendrán la paternidad de la mayoría de las semillas, y muy pocas serán formadas con el polen de las hermafroditas. Así, el género funcional de las hermafroditas estará altamente sesgado a las femeninas. Si las hermafroditas y los masculinos producen cantidades similares de polen, las hermafroditas serán propensas a formar algunas semillas, teniendo un género funcional menos sesgado al femenino; por lo tanto, la asignación de género y la proporción de sexos en una población interactúan para determinar el sexo funcional (Manabe, 1996; Delph y Wolf, 2005).

Dentro de otros sistemas reproductivos se encuentra la poligamodioecia que es un sistema que casi no ha sido estudiado por lo que no existe un verdadero consenso sobre su definición. Algunos autores consideran que el sistema poligamodioico corresponde a poblaciones que presentan tres tipos florales: pistilados, hermafroditas y estaminados en distintos individuos (Manabe, 1996; Machado *et al.*, 2006); otros consideran a una especie poligamodioica cuando presenta por lo menos algunos individuos con flores estaminadas y flores hermafroditas, y otros con sólo flores pistiladas (Hammel y Cornejo, 2009; Valencia *et al.*, 2012). De acuerdo con la última definición, *Prockia oaxacana* fue descrita como una especie poligamodioica, pues algunos individuos tienen flores estaminadas y algunas flores pistiladas; en cambio, otros poseen sólo flores pistiladas (Jiménez *et al.*, 2008). De acuerdo con lo dicho por Lloyd (1980), el sistema poligamodioico funciona casi como un sistema dioico, en el que un individuo contribuye como progenitor masculino, aquel que tiene flores estaminadas o hermafroditas, y otro individuo funciona como progenitor femenino, aquel que tiene flores pistiladas. Es por esta razón que este sistema también ha sido considerado un sistema subdioico.

Los sistemas subdioicos suelen ser transicionales entre el hermafroditismo y la dioecia y se han propuesto como sistemas reproductivos muy cercanos al dioicismo dentro de las rutas ginodioica, donde se propaga la mutación de esterilidad masculina dentro de una población ancestralmente hermafrodita, y la androdioica (Manabe, 1996; Delph y Wolph, 2005; Burke *et al.*, 2010). También se ha mencionado como una subpoblación resultado de una zona de hibridación de plantas del mismo género donde algunas poblaciones son dioicas y otras hermafroditas (Killeen y Ruologo, 1992).

Estudios recientes, enfocados en el gineceo de *P. oaxacana* muestran la posibilidad de que no se trate de una especie poligamodioica sino de una androdioica o dioica críptica debido a la poca representatividad de flores hermafroditas en los árboles masculinos y a que los óvulos del morfo masculino se encuentran atrofiados o detenidos en las etapas iniciales de la formación de tegumentos (Quiroz, 2015).

El sistema androdioico es aquel en el que en una población se pueden encontrar tanto individuos hermafroditas como unisexuales masculinos (Bawa y Beach, 1981; Pannell, 2002a; Orozco y Vázquez, 2013). Se considera el sistema de reproducción más raro por diversos motivos: las plantas masculinas pueden invadir una población hermafrodita sólo bajo la condición de tener la producción de por lo menos el doble de granos de polen viables, la paternidad del doble de la descendencia exitosa que las hermafroditas, altas tasas de entrecruza y una fuerte depresión por endogamia (Lloyd, 1975; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Charlesworth, 1984). Como los individuos masculinos sólo contribuyen con polen y no pueden contribuir con semillas a la población, a diferencia de los individuos hermafroditas que tienen tanto polen como óvulos, sus posibilidades de dejar descendencia son menores.

La androdioecia es considerada un sistema transitorio, tanto del hermafroditismo hacia la dioecia (Lloyd, 1975; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Charlesworth,

1984; Pannell, 1997) como de la dioecia al hermafroditismo (Pannell, 2000; Wolf y Takebayashi, 2004). Ejemplos de transición de hermafrodita a dioica son el género *Fraxinus* (Wallander, 2008) y *Sagittaria lancifolia* (Sarkissian *et al.*, 2001). De la transición de dioica a hermafrodita se reconoce a *Mercurialis annua* (Durand y Durand, 1991), *Datisca glomerata* (Pannell, 2002b) y *Castilla elastica* (Sakai, 2001).

Entre las revisiones de Pannell (2002b) y de Renner (2014), se reconocen ocho especies androdioicas funcionales (Tabla 1), cada una de distinta familia. Aunque la androdioecia funcional ha sido confirmada para estas especies de plantas este sistema aún se considera poco representado y es el menos estudiado (Charlesworth, 1984; Pannell, 2002a; Pannell, 2002b; Orozco y Vázquez, 2013).

Tabla 1. Especies androdioicas funcionales

Especie	Familia	Referencia
<i>Datisca glomerata</i>	Datiscaceae	Pannell (2002); Renner (2014)
<i>Mercurialis annua</i>	Euphorbiaceae	Pannell (2002); Renner (2014)
<i>Schizopepon bryoniaefolius</i>	Cucurbitaceae	Pannell (2002); Renner (2014)
<i>Sagittaria lancifolia</i>	Alismataceae	Pannell (2002); Renner (2014)
<i>Castilla elastica</i>	Moraceae	Pannell (2002)
<i>Spinifex littoreus</i>	Poaceae	Pannell (2002)
<i>Fraxinus ornus</i>	Oleaceae	Renner (2014)
<i>Phillyrea angustifolia</i>	Oleaceae	Renner, (2014)

Sin embargo, en muchas poblaciones que por su morfología son androdioicas, los individuos morfológicamente hermafroditas pueden tener flores funcionalmente femeninas y los individuos masculinos flores funcionalmente masculinas, en esta situación se trata de un sistema reproductivo conocido como dioecia críptica (Mayer y Charlesworth, 1991; Geber *et al.*, 1999). Casi todos los estudios en los que se ha reportado androdioecia han presentado evidencia de dioecia críptica, en la que las flores morfológicamente perfectas resultan ser funcionalmente femeninas (Mayer y Charlesworth, 1991; Dunthorn, 2004).

## **Hipótesis**

Dado que existen dos morfos florales en *Prockia oaxacana*, cada uno de estos morfos producirá un tipo diferente de grano de polen.

## **Objetivo general**

Estudiar el desarrollo de los granos de polen, así como su estructura al momento de la dispersión en ambos morfos florales presentes en *Prockia oaxacana*.

## **Objetivos particulares**

- Conocer la micromorfología y estructura de los granos de polen.
- Describir el desarrollo de la pared de las anteras.
- Describir la microsporogénesis y la microgametogénesis.

## **Materiales y métodos**

### Sitio de estudio

Se ubica a *P. oaxacana* en la región mixteca del estado de Oaxaca, México. Se distribuye de los 1480 a los 2050 m de altitud, en bosque de *Quercus*, bosque de *Pinus-Quercus*, bosque de *Quercus-Juniperus*, selva baja caducifolia y bosque mixto de *Quercus*. Florece de junio a agosto y fructifica de julio a septiembre, a principios de la temporada lluviosa (Jiménez *et al.*, 2008).

La localidad exacta en la que se realizaron las colectas fue en la carretera Cristóbal Colón, kilómetro 24.3, coordenadas N17.71542 W97.663448 y N 17.71434 W97.66198 (Fig. 4). Se realizaron tres visitas en el año 2013: la primera a inicios de junio, la segunda a finales de junio y la tercera a inicios de agosto. En esta última visita se colectó el material con el que se trabajó.

En el año 2014, se realizaron otras tres visitas: la 1a durante la tercera semana de junio, en la 2a la primera semana de julio y la 3ª y última en la primera semana de agosto.

En 2015 se visitó los sitios en dos ocasiones: en la segunda semana de junio, cuando se colectó material con el que se trabajó, y en la primera semana de julio.

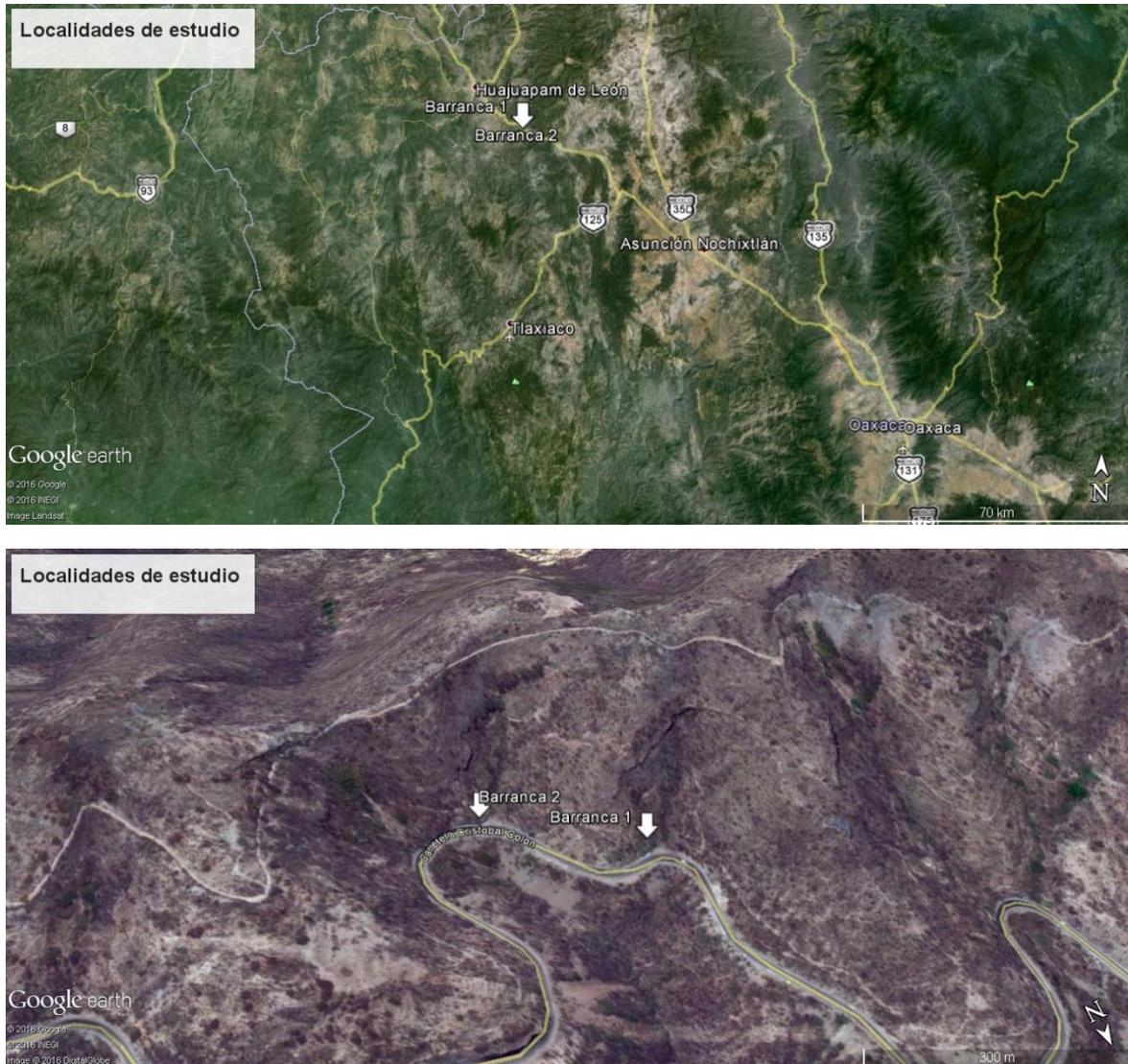


Figura 4. Fotografías satelitales del sitio de estudio.

## Trabajo en campo

En la primera visita que se realizó en 2013 se encontró sólo un individuo en flor, de este individuo se colectó material y se fijó en FAA (Formaldehído, ácido acético glacial, alcohol etílico 96% y agua destilada, 1:5:0.5:3.5), se le consideró un morfo masculino. En la segunda visita se encontró al mismo individuo en flor y a los demás, en ambas localidades, con numerosos brotes de hojas pero sin flor. En la tercera visita se encontraron todos los individuos en flor.

Se realizó un marcaje de los individuos en ambas localidades y se colectó material de todos los individuos hermafroditas y de algunos masculinos, el cual se fijó en FAA para su posterior análisis en el laboratorio.

En 2014 se realizaron otras tres visitas, no se encontraron flores en ninguna y sólo en la tercera visita se encontraron frutos inmaduros en cantidades muy reducidas. Las otras dos visitas se utilizaron para marcaje e identificación de nuevos individuos dentro de las dos localidades, llegando a 32 individuos en la localidad uno y 16 en la localidad dos (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Sexado de individuos de la barranca 1.

Localidad	Número De individuo	Morfo: Masculino (M) Hermafrodita (H)
1	1	M
1	2	?
1	3	H
1	4	M
1	5	H
1	6	M
1	7	H
1	8	M
1	9	H
1	10	M
1	11	H
1	12	M
1	13	H
1	14	M
1	15	H
1	16	H
1	17	H
1	18	H
1	21	H
1	24	H
1	29	H
1	30	H
1	31	H
Total=	32	M=7 H=15

Tabla 3. Sexado de individuos de la Barranca 2.

Localidad	Número de individuo	Morfo: Masculino (M) Hermafrodita (H)
2	1	M
2	2	M
2	3	M
2	4	M
2	5	H
2	6	H
2	7	H
2	8	M
2	9	H
2	10	M
2	11	H
2	12	H
2	13	H
Total=	13	M=6 H=7

Nota: Solamente se colocó en las tablas a los individuos que fue posible sexar.

## Trabajo en laboratorio

*Microscopía electrónica de barrido.* Las muestras se deshidrataron en una serie gradual de etanoles (30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100%), después se desecaron a punto crítico con CO<sub>2</sub>. Se cubrieron las muestras con oro con el fin de hacerlas conductoras y que no se perdieran los detalles de las superficies; esto se hace adhiriendo la muestra a un portaobjetos metálico por medio de pegamento conductor que contiene carbón (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000).

Se observaron flores en antesis de ambos morfos florales cortadas longitudinalmente y botones florales de la etapa 5, próximos a antesis, o en antesis, pero con las anteras cerradas, aplastadas para la observación de la micromorfología de los granos de polen de ambos morfos.

*Inclusión en LR White.* Se seleccionaron cinco botones de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 del material fijado, se deshidrataron gradualmente hasta etanol 95% por una hora en cada cambio y dos cambios de 12 h en etanol absoluto. Las muestras se infiltraron en mezclas de LR White-Etanol absoluto en proporciones 25%-75%, 50%-50% y 75%-25% y se hicieron dos cambios de 2 h en LR White puro. Se incluyó el material en cápsulas de gelatina y se polimerizó a 56 °C por 12 h. Se cortó con ultramicrotomo con navajas de vidrio (López *et al.*, 2005).

Se incluyeron flores en antesis y botones florales en diferentes estados de maduración en LR White. En forma posterior, se obtuvieron cortes histológicos y se tiñeron con azul de toluidina al 1%.

*Acetólisis.* Se disectaron las anteras de flores en antesis y se maceraron en seco. Se agregó el doble de una mezcla acetólica (Anhídrido acético-ácido sulfúrico, 9:1) y se mantuvieron a 65 °C en baño maría, con agitación constante, durante 8 minutos y medio, en el caso de los individuos hermafroditas y 10 en el de los individuos masculinos.

Pasado el tiempo se detuvo la reacción acetólica con ácido acético glacial, se centrifugó y decantó, descartando el sobrenadante. Se volvió a añadir ácido acético dos veces. La cantidad del sedimento obtenido se centrifugó, decantó y descartó el sobrenadante de nuevo. Se repitió una vez más el proceso sustituyendo el ácido acético con agua destilada y finalmente se tamizó el contenido y se colocó en un portaobjetos para observar la ornamentación y estructura de los granos de polen (modificado de Erdtman, 1966; Dafni, 1992).

Se analizaron 33 granos de polen acetolizados por morfo y se midieron los siguientes parámetros: largo del eje polar y ecuatorial en vista ecuatorial, tipo de aberturas, número de aberturas. Asimismo, se determinó la forma, tamaño y patrón de ornamentación de la exina siguiendo la terminología de Erdtman (1966) y de Punt *et al.* (2007).

Se tomaron las fotomicrografías de las inclusiones en LR White y la acetólisis en un fotomicroscopio Olympus Provis AX-70 utilizando microscopía de campo claro y contraste de fases.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa R Project 3.2.3. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. De presentar normalidad se efectuó una prueba de t de Student y de lo contrario se realizó una prueba de Wilcoxon.

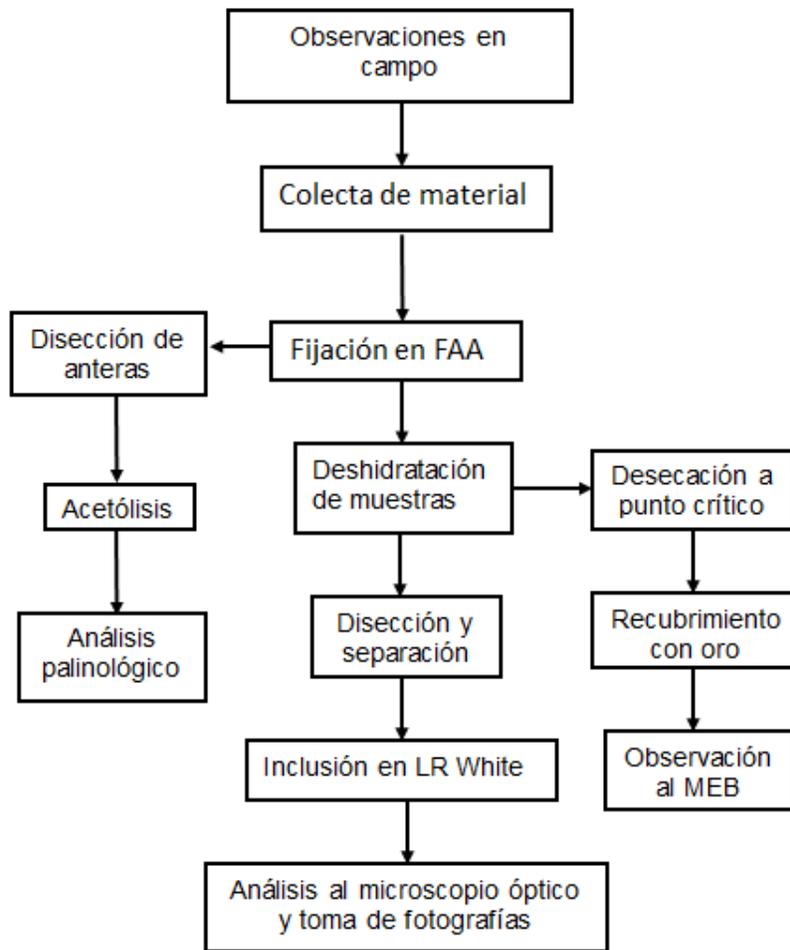


Figura 3. Diagrama de flujo que sintetiza la metodología utilizada.

## Resultados

### *Observaciones en campo*

Los árboles de *P. oaxacana* son fácilmente distinguibles por su corteza exfoliante (Fig. 5).

Los morfos se clasifican en hermafroditas y masculinos. El morfo considerado hermafrodita es aquel en el que el gineceo es conspicuo, normalmente sobresaliendo entre las anteras (Quiroz, 2015) (Fig. 6).

El morfo masculino tiene un gineceo muy pequeño, nunca sobresale entre las anteras (Fig. 7) y siempre es más pequeño que el gineceo presente en las flores hermafroditas.



Figura 5. Corteza exfoliante de *P. oaxacana*

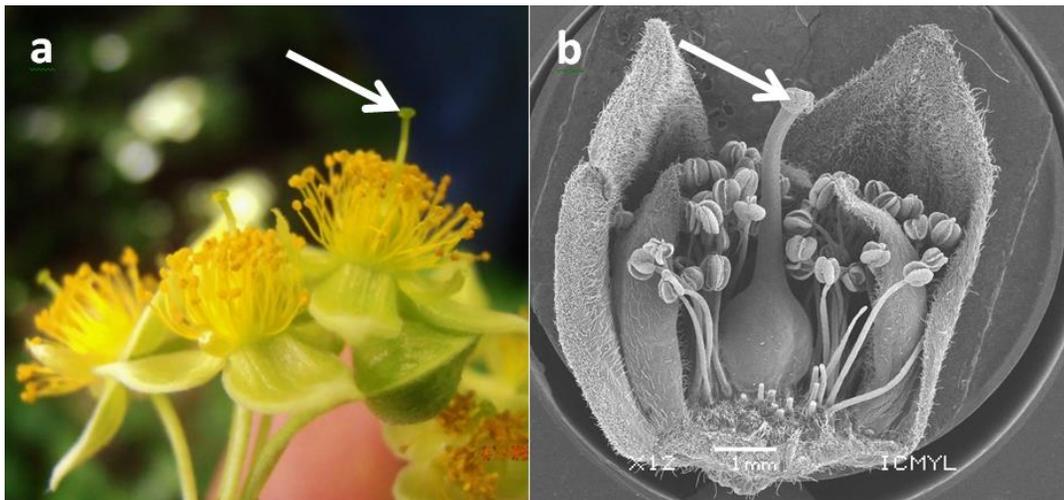


Figura 6. Flor en antesis del morfo hermafrodita de *P.oaxacana*. a) flor en antesis, la flecha señala el gineceo conspicuo. b) flor en antesis al Microscopio Electrónico de Barrido, gineceo conspicuo.

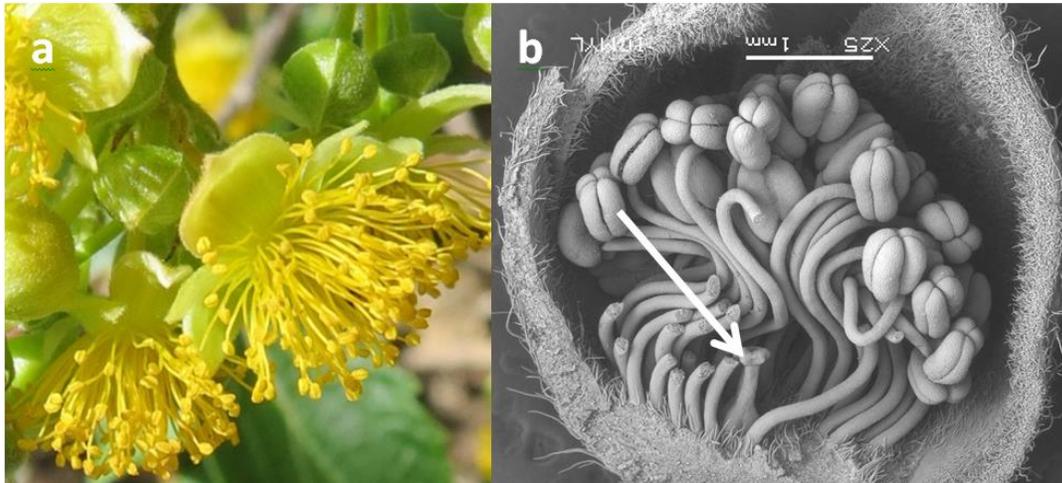


Figura 7. Flor en antesis y en botón del morfo masculino de *P.oaxacana*. a) flor en antesis, no se observa el gineceo. b) botón floral, la flecha señala el gineceo por debajo de la línea de las anteras

### *Observaciones al microscopio estereoscópico*

Se midieron 30 botones de 10 individuos diferentes, 5 del morfo hermafrodita y 5 del morfo masculino, de *P. oaxacana* para formar etapas. Debido a los tamaños encontrados, se consideraron cinco etapas para los botones masculinos y seis etapas de botones hermafroditas. Para los botones masculinos se consideró de 1 a 1.9 mm como etapa uno, 2 a 2.9 mm como etapa dos, de 3 a 3.9 mm como etapa tres, de 4 a 4.9 mm como etapa cuatro, de 5 a 5.9 mm como etapa cinco. Para los botones hermafroditas de 2 a 2.8 mm como etapa uno, 3 a 3.9 como etapa dos, 4 a 4.9 como etapa tres, 5 a 5.9 mm como etapa cuatro, de 6 a 6.9 mm como etapa cinco y de 7 a 7.9 mm como etapa seis.

### *Conteo del número de estambres*

Se contó el número de estambres en cinco flores de doce individuos diferentes, seis del morfo masculino y seis del morfo hermafrodita. El androceo del morfo masculino presenta una mayor cantidad de estambres que el morfo hermafrodita ( $p < 0.0001$ ). El androceo del morfo masculino tiene  $137.6 \pm 24.51$  estambres y el promedio de estambres del morfo hermafrodita es  $106 \pm 24.44$ .

### *Descripción del grano de polen*

Mediante acetólisis y por medio de microfotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido se describieron los distintos morfos polínicos.

Los granos de polen se obtuvieron de anteras pertenecientes a botones florales próximos a la antesis, teniendo cuidado de trabajar las anteras masculinas separadas de las hermafroditas, con el propósito de asegurar que no hubiera una mezcla de polen.

Los granos de polen del morfo masculino se liberan en mónadas (Figs 8a y 8b). Son tricolporados (Figs. 8c, 8d y 9), cada poro está cubierto por un opérculo (Fig. 8f). La ornamentación de la abertura es microverrugada y la exina es microrreticulada, subtectada, heterobrocada en toda su superficie y psilada hacia la abertura (Figs. 8e y 8f).

El porcentaje de formas (radio diámetro polar/diámetro ecuatorial) es: 6% subprolato, 28% prolato-esferoidal, 38% oblato-esferoidal, 19% suboblato y 9% euoblato (Fig. 10). La polaridad es isopolar y la simetría radiosimétrica.

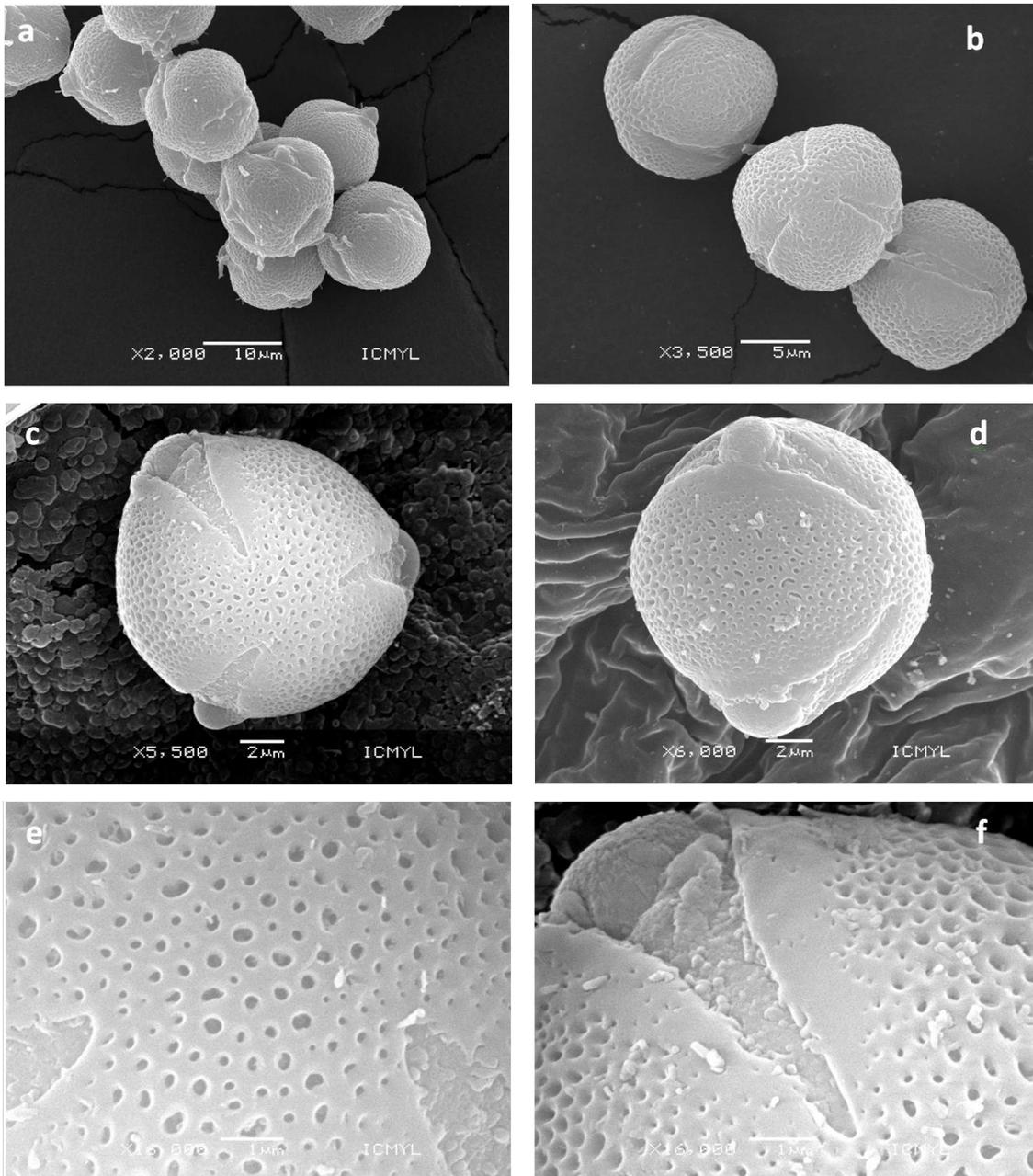


Figura 8. Micromorfología de los granos de polen del morfo masculino de *P. oaxacana*. a) y b) Foto panorámica c) Polen triaperturado en vista polar d) Polen triaperturado en vista meridional e) Acercamiento a la exina microrreticulada f) Acercamiento a la apertura microverrucada y al opérculo.

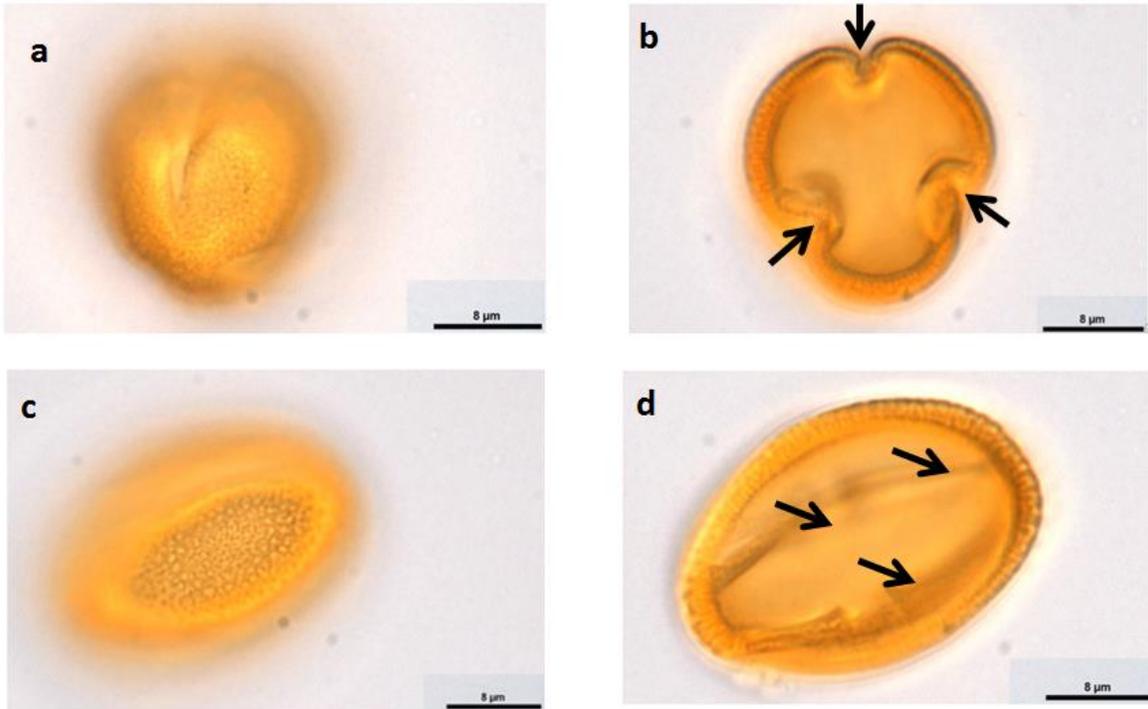


Figura 9. Micromorfología de los granos de polen del morfo masculino de *P. oaxacana*. a) Ornamentación microrreticulada en vista polar y b) Colporos del grano de polen en vista polar c) Ornamentación de grano de polen en vista ecuatorial d) Colporo en vista ecuatorial.

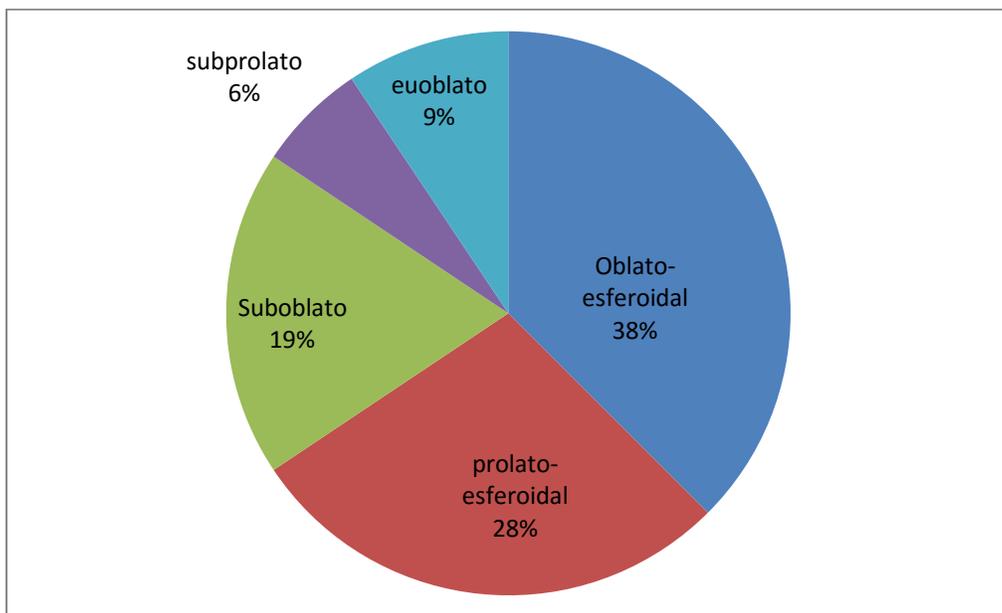


Figura 10. Porcentaje de formas (radio diámetro polar/diámetro ecuatorial).

Los granos de polen del morfo hermafrodita se liberan en mónadas (Fig. 11a). Debido a que los colpos confluyen en distintos puntos de la pared del grano de polen, resultó imposible determinar la cantidad de colpos, los cuales se estimaron entre cinco y nueve (Fig. 11b). Tampoco fue posible determinar las caras polar y ecuatorial. El polen se consideró apolar por que no se puede determinar la orientación espacial de la microspora por medio de las aberturas observadas, por lo mismo los granos de polen del morfo hermafrodita se consideran amorfos. Son policolpados con exina microrreticulada (menor a 1  $\mu\text{m}$ ) (Figs. 11c, 11d y 12).

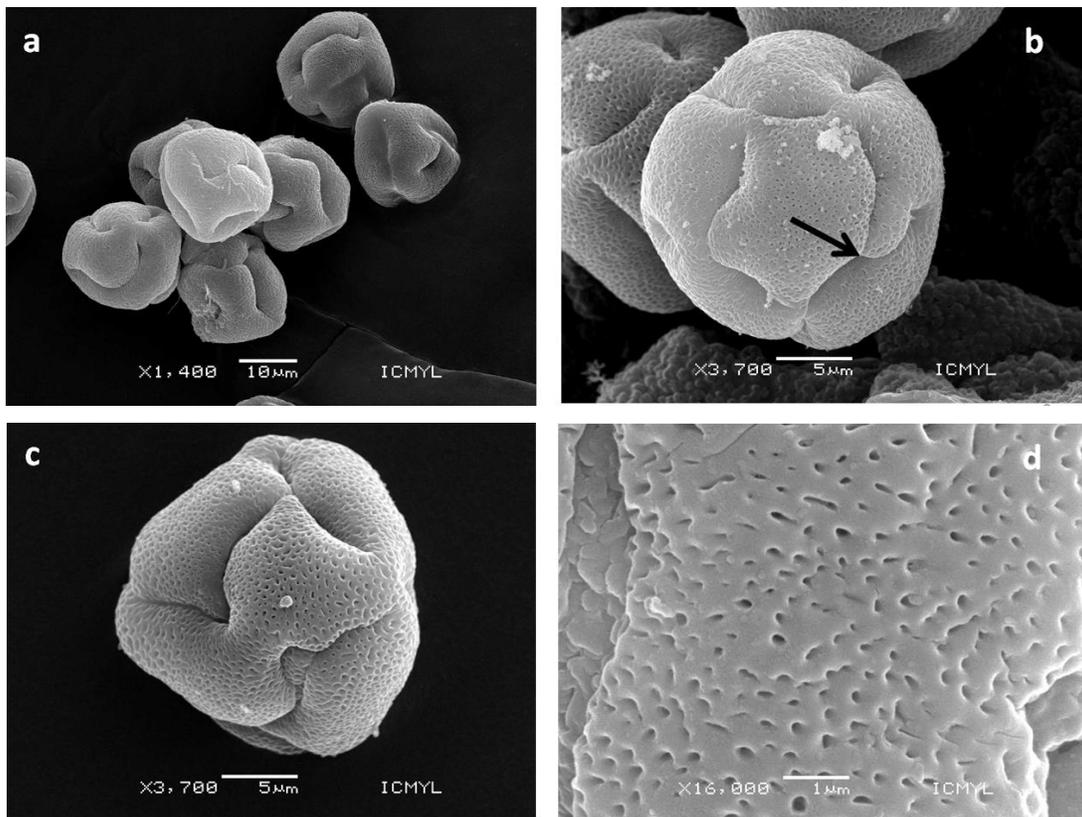


Figura 11. Micromorfología de los granos de polen del morfo hermafrodita de *P. oaxacana*. a) Foto panorámica. b) y c) Polen poliapertura con colpos confluyendo. d) Acercamiento a la exina microrreticulada e) Corte óptico del contorno del grano de polen. f) Colpo y ornamentación microrreticulada.

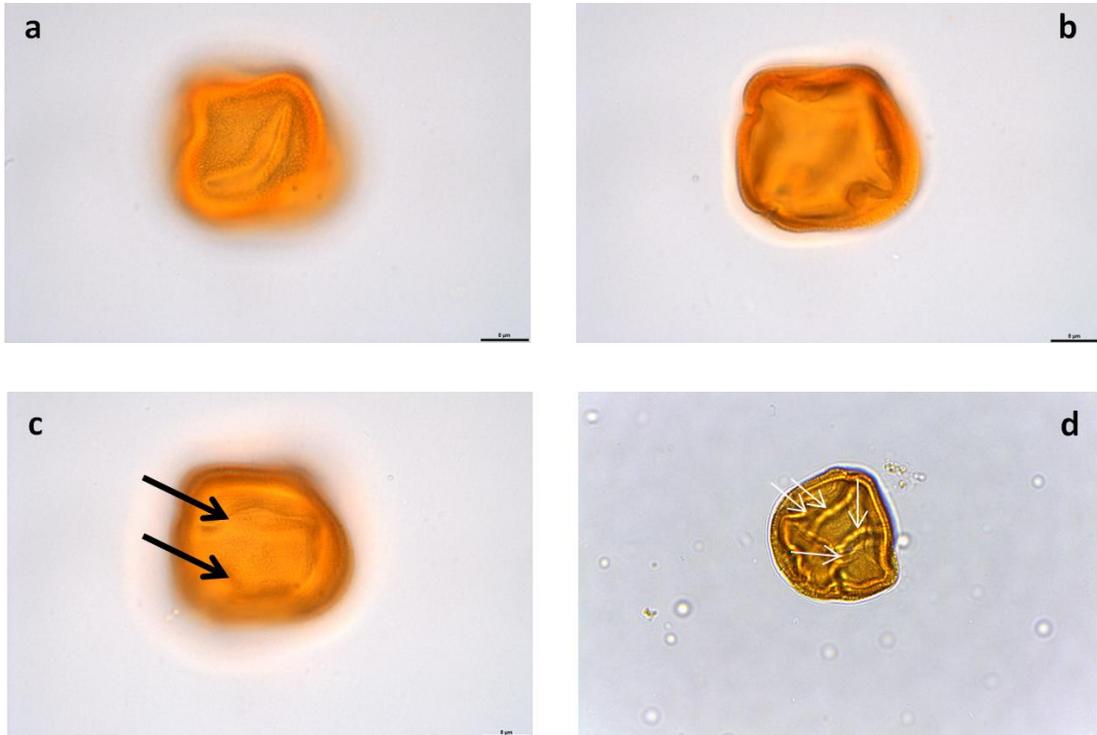


Figura 12. Micromorfología de los granos de polen del morfo hermafrodita de *P. oaxacana*. a) Colpo y ornamentación microrreticulada. b) Corte óptico del contorno del grano de polen. c) y d) granos de polen poliaperturados.

En el estigma de la flor en antesis, del morfo hermafrodita (Fig. 13a), se puede observar una gran cantidad de granos de polen tanto del morfo hermafrodita como del morfo masculino. También se pueden observar tubos polínicos emergiendo de los granos de polen tricolporados del morfo masculino (Figs. 13b y 13c).

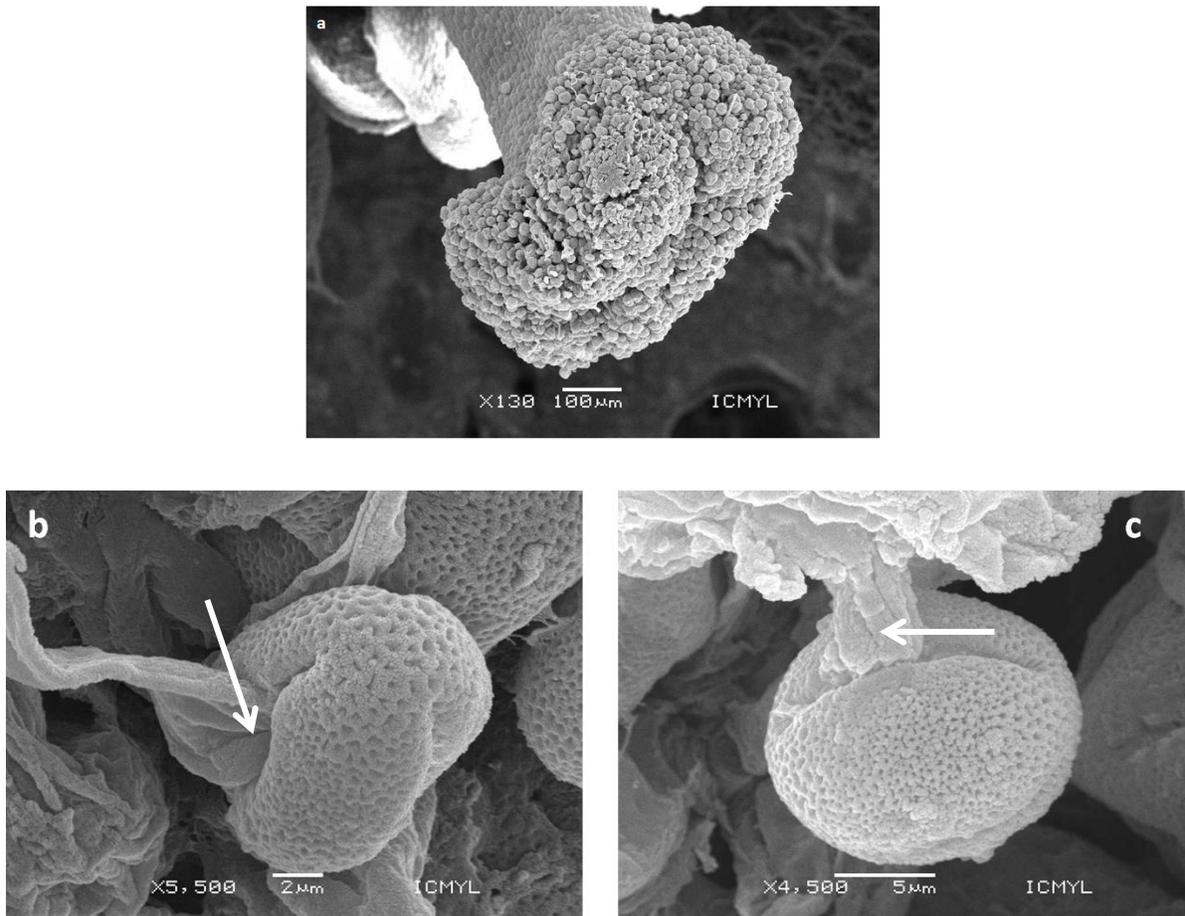


Figura 13. Acercamiento al estigma de la flor en antesis del morfo hermafrodita. a) Estigma lleno de polen b) y c) Tubos polínicos emergiendo de los granos de polen del morfo masculino.

### *Tamaño de los granos de polen*

Se analizaron 33 granos de polen acetolizados por morfo. Los granos de polen del morfo masculino miden  $9.41 \pm 0.72 \mu\text{m}$  en el diámetro polar y  $10.10 \pm 1.07 \mu\text{m}$  de diámetro ecuatorial por lo que se consideran granos de polen muy pequeños (Hesse *et al.*, 2009). La exina en estos granos de polen tiene un grosor de  $0.86 \pm 0.14 \mu\text{m}$ .

Para el morfo hermafrodita los granos de polen se midieron tomando el diámetro mayor, que fue en promedio  $14.86 \pm 1.18 \mu\text{m}$  de diámetro por lo que caben dentro de la categoría de granos de polen pequeños (Hesse *et al.*, 2009). La exina tiene un grosor de  $1.09 \pm 0.24 \mu\text{m}$ .

El diámetro del grano de polen poliaperturado de las flores hermafroditas es mayor que el diámetro de mayor longitud de los granos de polen del morfo masculino  $t=18.05$  (70.29)  $p < 0.0001$  (Fig. 14).

La exina del morfo hermafrodita tiene un mayor espesor que la exina del morfo masculino ( $p < 0.0001$ ).

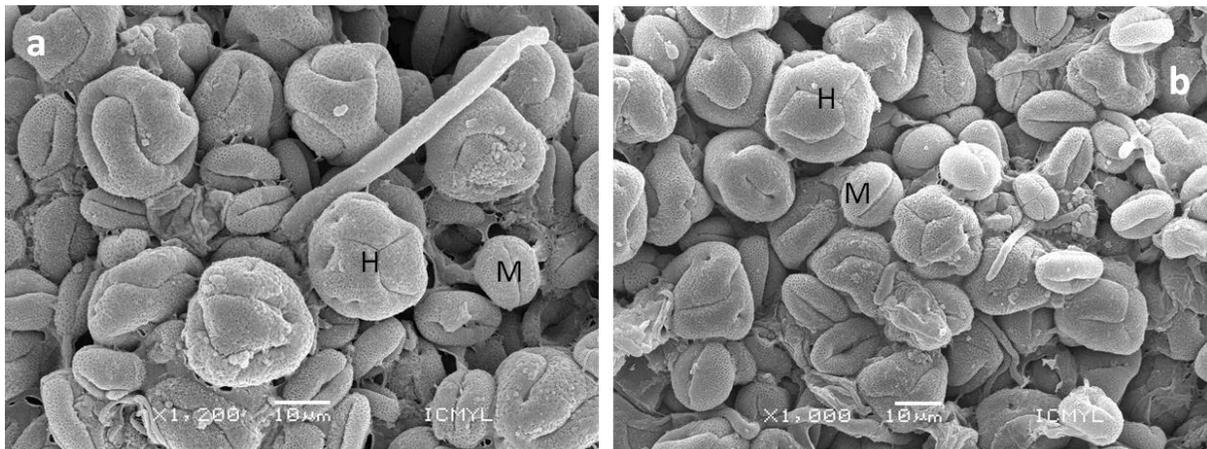


Figura 14. Microfotografía del estigma de flor en anthesis . a) y b) Granos de polen del morfo hermafrodita y del morfo masculino.

#### *Desarrollo de la pared de la antera del morfo masculino*

En los botones florales se encuentran las anteras tetraporangiadas en las que se observa, durante la etapa meiótica de las células madres de las microsporas, cuatro capas celulares concéntricas comenzando desde el exterior al interior con la epidermis (Fig. 15a). Después se encuentran las células del endotecio que tienen el diámetro periclinal mayor que el anticlinal, con núcleo, vacuolas y citoplasma evidentes. La siguiente capa está conformada por la capa media

biestratificada cuyas células son alargadas y aplanadas, con núcleos conspicuos. La última capa es la que está en contacto con los meiocitos, la forman las células tapetales que poseen núcleos conspicuos y citoplasma denso. El tapete es de tipo secretor considerando que su permanencia es hasta etapas tardías del desarrollo (Fig. 15b).

En la etapa de microsporas libres el endotecio se observa con poco contenido. La capa media es efímera y comienza a degenerar. Los núcleos del tapete aumentan de tamaño y número (en promedio 2 núcleos por célula), el citoplasma es mucho más denso (Figs. 15c y 15d), aumenta la síntesis de los precursores de la pared de exina (esporopolenina y pollenkit) lo que genera la secreción de los cuerpos de Ubish que son evidentes en la cara interna de las células tapetales. Estos cuerpos salen al lóculo, rodean y se adosan a las microsporas (Fig. 15c). Hacia el final de esta etapa el tapete comienza a degenerar.

Para la etapa en la que los granos de polen ya están maduros, la pared de la antera presenta tan solo tres capas. El endotecio, al alcanzar la madurez acumula depósitos con los que desarrolla engrosamientos en forma de U que facilitarán la dispersión de los granos de polen. Las células de la capa media han degenerado por completo y ya no se observan. Del tapete tan sólo se observa la membrana tapetal en la periferia del lóculo de la antera (Fig. 15e).

En las flores en anthesis el septo que separa los dos microsporangios de una teca se rompe y une a los dos microsporangios formando uno solo. La zona del estomio, que es la región por la cual se abre la antera, se adelgaza y se rompe. Al final del desarrollo de la antera, su pared sólo está constituida por una capa epidérmica y el endotecio (Fig. 15f).

#### *Microsporogénesis y microgametogénesis del morfo masculino*

En los botones florales de las flores masculinas en la etapa de células madre de la microspora (CMM) la antera presenta drusas de cerca de 8  $\mu\text{m}$  en el tejido

conectivo (Fig. 15a). Durante la microsporogénesis, el tejido esporógeno se convierte en CMM. Las células madre de la microspora atraviesan la meiosis I en la que se puede observar la profase I, en la que se ve claramente el nucléolo y la heterocromatina que se acumula en la periferia (Fig. 15b). En seguida ocurre la meiosis II que da lugar a tétradas rodeadas por una densa capa de calosa. Al final de la meiosis se forman cuatro microsporas haploides rodeadas de calosa. Cuando se desintegra la pared de calosa debido a la acción de la calaza liberada por el tapete, la exina se comienza a sintetizar alrededor de cada microspora para terminar la formación de las microsporas libres y uninucleadas (Figs. 15c y 15d).

En etapas posteriores, se puede observar al grano de polen unicelular y en su interior una gran vacuola que hace que el núcleo migre hacia la periferia (Fig. 16a). Posteriormente, por división mitótica, el núcleo del grano de polen sufre mitosis sin citocinesis y da origen a dos células que se diferencian en la célula vegetativa y la célula generatriz (Fig. 16b). No se observan las células espermáticas.

Los granos de polen maduros tienen tres aberturas colporadas bien formadas, rodeadas por la pared del grano de polen (Fig. 16b).

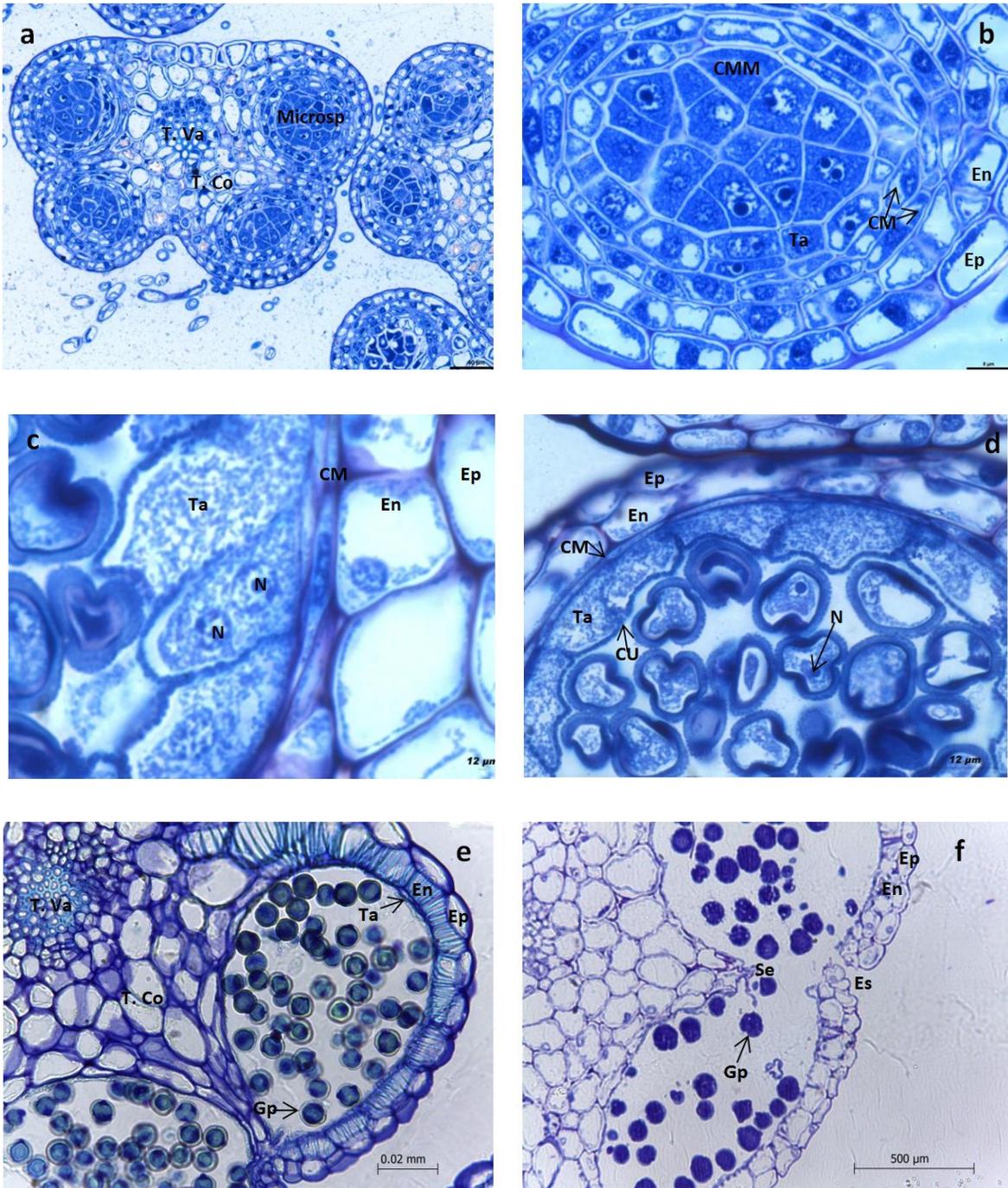


Figura 15. Microsporogénesis y microgametogénesis del morfo masculino de *P. oaxacana*. a) Tejido conectivo rodeando al tejido vascular, antera tetrasporangiada en etapa de células madre de la microspora. b) Pared de la antera joven formada por epidermis, endotecio, capa media biestratificada y tapete secretor. Células madre de la microspora en división meiótica(I) c)Pared de la antera secretando cuerpos de Ubisch, tapete binucleado. d) Pared de la antera con tapete secretando cuerpos de Ubisch con esporopolenina y granos de polen jóvenes, uninucleados. e) Pared de la antera formada por epidermis, endotecio engrosado y membrana tapetal. Granos de polen maduros, con opérculos cubriendo los poros. f) Antera madura con dehiscencia longitudinal. Pared de la antera formada por epidermis y endotecio. CM, Capa media; CMM, célula madre de la microspora; CU, Cuerpos de Ubisch; En, Endotecio; Ep, Epidermis; Es, Estomio; Gp, Grano de polen; Microsp, Microsporangio; N, Núcleo; S, Septo; T. Co., Tejido conectivo; T. Va., Tejido vascular; Ta, Tapete secretor.

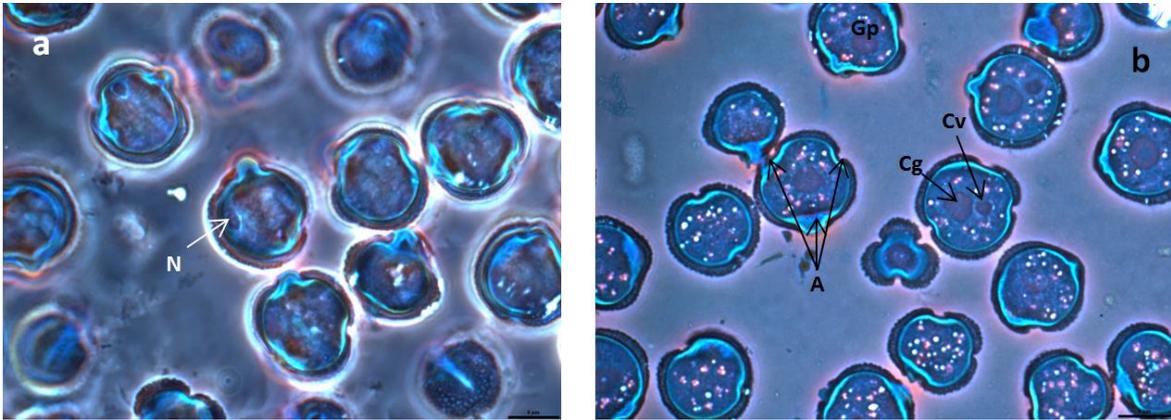


Figura 16. Microgametogénesis del morfo masculino de *P. oaxacana*. a) Grano de polen con un núcleo excéntrico. b) Grano de polen binucleado, triaperturado CF. A, Aperturas; Cg, Célula generatriz; Cv, Célula vegetativa; Gp, Grano de polen; N, Núcleo.

### *Desarrollo de la pared de la antera del morfo hermafrodita*

En los botones florales se encuentran las anteras tetraporangiadas en las que se observa, durante la etapa meiótica de las células madres de las microsporas, cuatro capas celulares concéntricas desde la parte superior de la antera al interior comenzando con la epidermis; a lo largo del desarrollo de la antera las células epidérmicas presentan ornamentación en la cutícula. Después se encuentran las células del endotecio cuyas células son rectangulares, con vacuolas de gran tamaño y núcleos evidentes. La siguiente capa está conformada por la capa media biestratificada, sus células son alargadas y aplanadas, con núcleos conspicuos. La última capa es la que está en contacto con los meiocitos, la forman las células tapetales que poseen núcleos conspicuos, citoplasma denso y vacuolas grandes. El tapete es tipo secretor puesto que su protoplasma se mantiene *in situ*, a pesar de la degeneración de las paredes (Figs. 17a y 17b).

Durante la etapa de microsporas libres, los núcleos del tapete aumentan de tamaño y número (2 núcleos por célula) y el citoplasma es mucho más denso. En esta misma etapa el tapete comienza a degenerar, pero la degradación no es homogénea, aún se pueden apreciar células tapetales binucleadas junto con granos de polen maduros e incluso hay esporangios en los que sólo se observa la membrana tapetal en la periferia del lóculo de la antera (Figs. 18a y 18b).

En la etapa de granos de polen maduros la pared de la antera presenta sólo tres capas. El endotecio al alcanzar la madurez acumula depósitos con los que desarrolla engrosamientos en forma de U que facilitarán la dispersión de los granos de polen. Las células de la capa media han degenerado por completo y ya no se observan en esta etapa. Del tapete se observa sólo la membrana tapetal (Fig. 17e).

En las flores en antesis el septo que separa los dos microsporangios de una teca se rompe y une a los dos microsporangios formando uno solo. La zona del

estomio es la región por la cual se abre la antera, se adelgaza y se rompe (Fig. 17f).

#### *Microgametogénesis y microsporogénesis del morfo hermafrodita*

La antera es tetrasporangiada, presenta tejido vascular rodeado por tejido conectivo y drusas (Figs. 17a).

Durante la microsporogénesis del morfo hermafrodita el tejido esporógeno se convierte en células madre de la microspora (CMM). Las CMM atraviesan la meiosis I, en particular en la profase I en la que se puede observar al nucléolo y la heterocromatina acumulándose en la periferia (Fig. 17b). En seguida ocurre la meiosis II que da lugar a tétradas rodeadas por una densa capa de calosa. Al final de la meiosis se forman cuatro microsporas haploides rodeadas de una capa de calosa y posteriormente se observa otra capa con un grosor anómalo que permanece rodeando a las microsporas. Las microsporas se observan con el citoplasma muy concentrado y reducido. Cabe resaltar que pese al engrosamiento anómalo en torno a los granos de polen el tapete aparece binucleado y funcional (Fig. 17c). Este deterioro de los granos de polen es altamente específico, es decir que los tejidos vasculares y epidérmicos de las anteras no presentan ninguna anomalía visible (Fig. 17d).

En la siguiente etapa se observan las microsporas libres, con una pared de exina gruesa y con poco contenido citoplasmático (Figs. 17e y 17f).

Los granos de polen maduro son policolpados, no tienen el opérculo y presentan el citoplasma colapsado (Fig. 18).

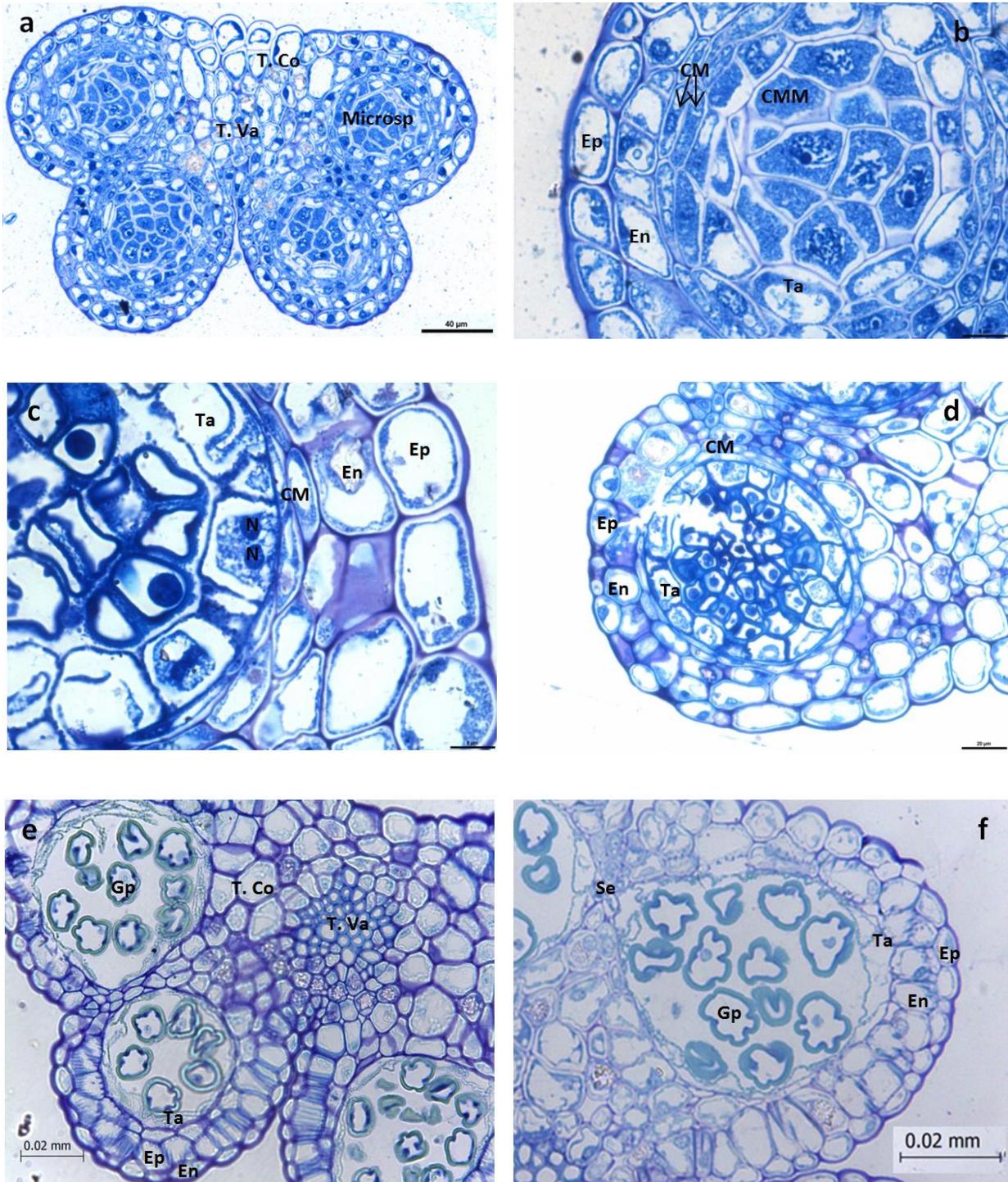


Figura 17. Microsporogénesis y microgametogénesis del morfo hermafrodita de *P. oaxacana*. a) Tejido conectivo rodeando al tejido vascular, antera tetrasporangiada en etapa de células madre de la microspora. b) Pared de la antera joven formada por epidermis, endotecio, capa media biestratificada y tapete secretor. Células madre de la microspora en división meiótica(l) c) Pared de la antera con cuatro capas y tapete binucleado. d) Células madre de la microspora con engrosamientos anómalos. e) Pared de la antera formada por epidermis, endotecio engrosado y membrana tapetal. Granos de polen sin relleno citoplasmático, poliaperturados f) Antera madura con septo degradado. CM, Capa media; CMM, célula madre de la microspora; En, Endotecio; Ep, Epidermis; Gp, Grano de polen; Microsp, Microsporangio; N, Núcleo; S, Septo; T. Co., Tejido conectivo; T. Va., Tejido vascular; Ta, Tapete secretor.

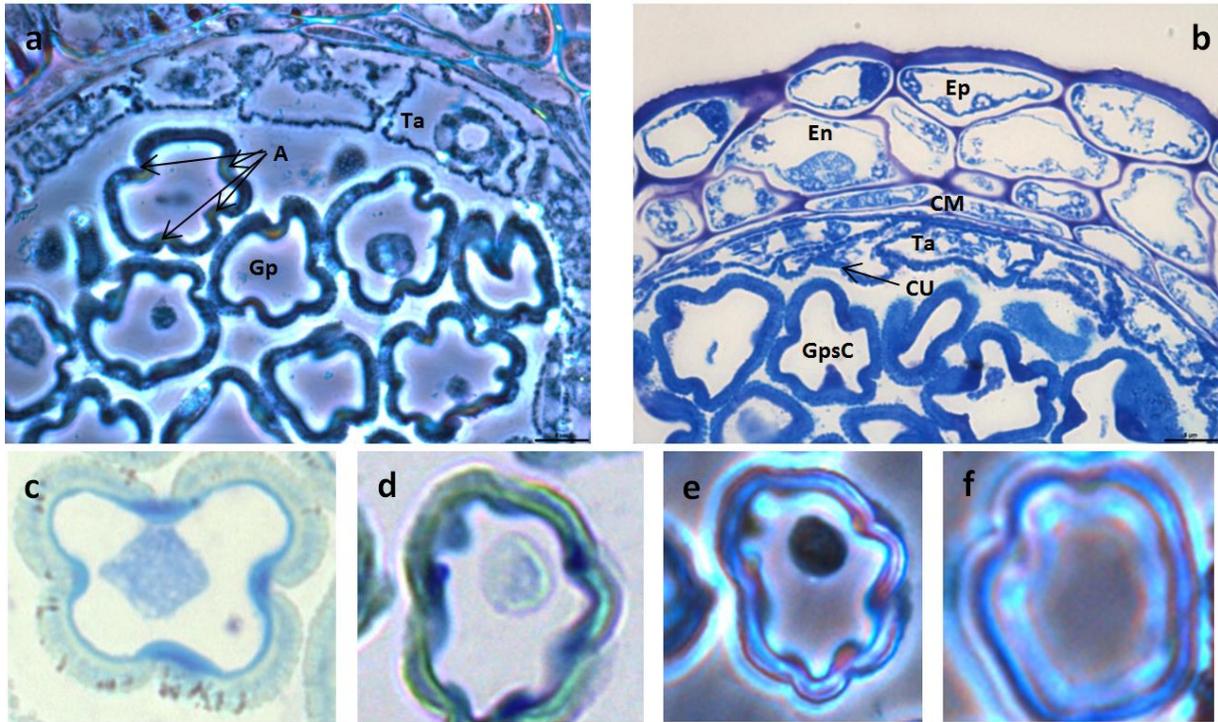


Figura 18. Granos de polen del morfo hermafrodita de *P. oaxacana*. a y b) Grano poliaperturado con citoplasma reducido o ausente. c) grano de polen con pared de exina gruesa. d), e) y f) grano de polen con citoplasma colapsado A, Aperturas; CM, Capa media; CU, Cuerpos de ubish; En, Endotecio; Ep, Epidermis; Gp, Grano de polen; GpsC, Grano de polen sin citoplasma; Ta, Tapete.

### *Microsporangios degenerativos en el morfo hermafrodita*

En algunas anteras del morfo hermafrodita existen algunos microsporangios degenerados. Estos microsporangios siguen un desarrollo normal hasta la aparición de las paredes más engrosadas de lo normal y dentro de una misma antera se pueden encontrar algunos microsporangios con granos de polen abortivos y otros microsporangios con granos de polen sin citoplasma. Morfológicamente, los estambres que contienen estos microsporangios se observan iguales a los estambres del morfo masculino (Fig. 19a).

En la pared de estos microsporangios, en la etapa de granos de polen maduros solo se observó la epidermis y el endotecio que en ningún momento del desarrollo presentó engrosamientos (Fig. 19).

En estos microsporangios, los granos de polen se pueden observar deformados, sin protoplasto y con la pared de exina más gruesa del promedio observado o incluso colapsados conformados tan solo por la pared de exina (Figs. 19b y 19c).

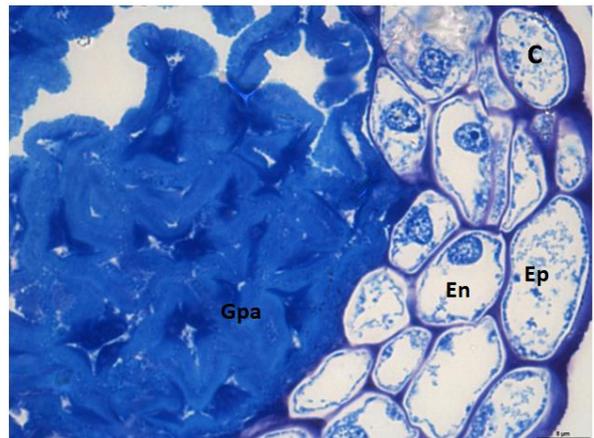
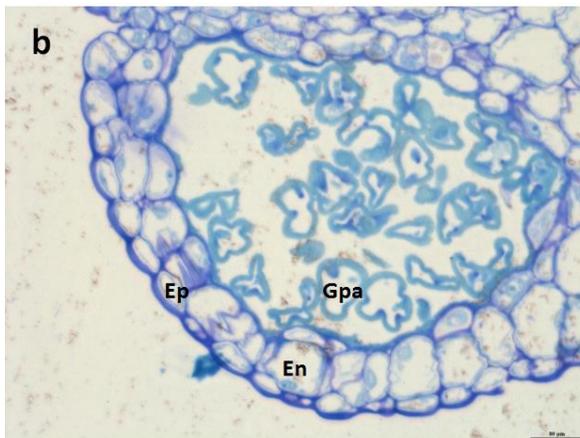
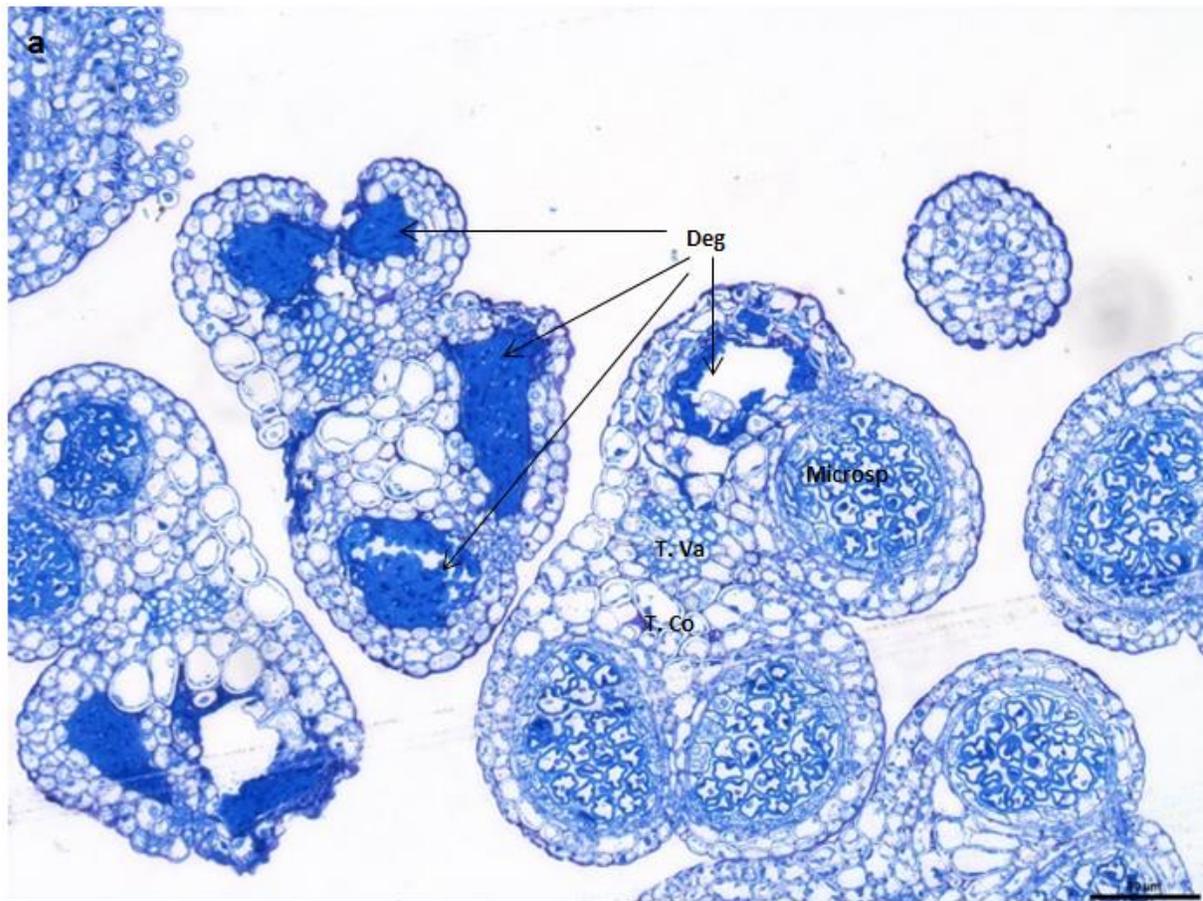


Figura 19. Microsporangios degenerativos de *P. oaxacana*. a) Anteras con microsporangios degenerativos. b) y c) microsporangio con granos de polen en estado abortivo. En, Endotecio; Ep, Epidermis; Gp, Grano de polen; Gpa, Grano de polen abortivo; T. Co, Tejido conectivo; T. Va, Tejido vascular.

## Discusión

Los estudios de microsporogénesis y microgametógenesis realizados en los botones y las flores de *P. oaxacana* revelaron que existe dimorfismo polínico. Los granos de polen tricolporados se encuentran en las anteras de las flores del morfo masculino y granos de polen policolpados en las anteras de las flores del morfo hermafrodita. Los granos de polen policolpados presentan el citoplasma colapsado y engrosamientos anómalos se observan alrededor de los granos de polen jóvenes, recién liberados de la tétrada de microsporas.

El polen en Salicaceae se reporta principalmente como triaberturado. Para el género *Salix* son granos triaperturados, principalmente tricolpados y tricolporados, aunque también se han encontrado reportes de tricolporoidados, la ornamentación reticulada y la forma de esferoidal a subprolata (Núñez y Ludlow-Wiechers, 1998; Qureshi *et al.*, 2007; Babayi *et al.*, 2012; Çelemlı, 2012). En el género *Populus* se han reportado granos de polen inaperturados y microverrugados (Núñez y Ludlow-Wiechers, 1998; Martínez y González, 2002). Los granos de polen poliaperturados no han sido reportados en ningún miembro de esta familia fuera del género *Prockia* (Moar, 1993; Mayorga-Lizaloe, 2013; MOBOT, 2015; Roldán, 2015).

*Prockia krusei* tiene dos morfos florales: uno hermafrodita y uno masculino, habiendo presencia de polen triaperturado en el morfo masculino y granos de polen poliaperturados y triaperturados en el morfo hermafrodita (Mayorga-Lizaloe, 2013; Roldán, 2015). En ambas especies de *Prockia*, la ornamentación de la exina es microrreticulada, los granos de polen son esféricos y se liberan en mónadas. En el morfo masculino, hay opérculos sobre los poros que son una porción engrosada de sexina, más o menos circular, que cubre la apertura de los poros y que está aislada del resto por una estrecha zona en la que está completamente ausente (Walker y Doyle, 1975 y Sáenz, 2004).

Sin embargo, también existen diferencias entre ambas especies, *P. krusei* y *P. oaxacana*. Roldán (2015) describe para el morfo masculino de *P. krusei* tres tipos

de granos de polen: uno tricolpado, otro tricolporado y otro tricolporoidado, mientras en *P. oaxacana* sólo se observan granos de polen tricolpados. Otra diferencia es la forma, para *P. krusei* que es prolata y en *P. oaxacana* de subprolata a euoblata. Para el morfo hermafrodita de *P. krusei* se han descrito granos de polen triaperturados y pericolpados, a diferencia de *P. oaxacana* donde en las anteras del morfo hermafrodita se observaron exclusivamente granos de polen poliaperturados.

La morfología del grano de polen del morfo hermafrodita de *P. oaxacana* resultó difícil de describir, se lo denominó policolpado de acuerdo con los términos establecidos por Hesse *et al.* (2009). Sin embargo, los colpos son poco profundos y convergen unos con otros, por lo que se pensó en denominarlos pseudocolpados. Un pseudocolpo es un colpo que se encuentra en granos de polen heteroaperturados, es poco profundo y se considera no funcional (Scotland *et al.*, 1990). Como los granos de polen del morfo hermafrodita de *P. oaxacana* no son heteroaperturados, no se utilizó este término. Debido a las características de los “colpos”, surge la duda sobre la capacidad de germinación de este tipo de polen.

En el tamaño del polen de *P. oaxacana* también se encontraron diferencias, mientras los granos de polen del morfo masculino pertenecen a la categoría de tamaño de granos de polen muy pequeños (<10 µm) (Núñez y Ludlow-Wiechers, 1998; Hesse *et al.*, 2009), los granos de polen del morfo hermafrodita se encuentran en la categoría de granos de polen pequeños (10-25 µm). En la familia Salicaceae, en particular para los dos géneros más estudiados, *Salix* y *Populus*, el tamaño de los granos de polen suele encontrarse en las categorías de pequeño o mediano (Núñez y Ludlow-Wiechers, 1998; Martínez y González, 2002; Qureshi *et al.*, 2007; Babayi *et al.*, 2012; Çelemlı, 2012) e incluso dentro del género *Prockia* los tamaños reportados para *P. krusei* son mayores que los reportados para *P. oaxacana*, siendo de la categoría de pequeño el polen triaperturado y mediano el polen poliaperturado (Roldán, 2015). Vale la pena resaltar que, al igual que en *P.*

*oaxacana*, los granos de polen poliaperturados pertenecen a una categoría de mayor tamaño que los granos de polen triaperturados.

Para *P. oaxacana* el grosor de la exina en ambos morfos polínicos también resultó significativamente distinto siendo mayor el grosor de la exina en los granos de polen del morfo hermafrodita. Ambas medidas caben dentro de la medida de 1  $\mu\text{m}$  reportada previamente para la familia y el género.

Tabla 4. Comparación del grano de polen del morfo masculino de *P. krusei* (Roldán, 2015) con el de *P. oaxacana*.

	<i>P. krusei</i>	<i>P. oaxacana</i>
Apertura	Tricolpados, tricolporados y tricolporoidados	Tricolpados
Ornamentación	Microrreticulados	Microrreticulados
Forma	Prolato	Subprolato a euoblato
Eje polar	$20.22 \pm 1.87 \mu\text{m}$	$9.41 \pm 0.72 \mu\text{m}$
Eje ecuatorial	$15.28 \pm 1.62 \mu\text{m}$	$10.10 \pm 1.07 \mu\text{m}$
Exina	$1.79 \pm 0.37 \mu\text{m}$	$0.86 \pm 0.14 \mu\text{m}$
Opérculo	Sí (Llamado tapón de pollenkit)	Sí

Tabla 5. Comparación del grano de polen del morfo hermafrodita de *P. krusei* (Roldán, 2015) con el de *P. oaxacana*.

	<i>P. krusei</i>	<i>P. oaxacana</i>
Apertura	Tricolpados y pericolpados	Policolpados
Ornamentación	Microrreticulados	Microrreticulados
Forma	Amorfo	Amorfo
Diámetro	$32.04 \pm 3.62 \mu\text{m}$	$14.86 \pm 1.18 \mu\text{m}$
Exina	$3.28 \pm 0.54 \mu\text{m}$	$1.09 \pm 0.24 \mu\text{m}$
Opérculo	No	No

Nota: No existen medidas de los ejes polar y ecuatorial del grano tricolpado de *P. krusei*

El dimorfismo polínico se ha reportado para otros grupos de plantas como el género dioico *Vitis* (*V. aestivalis*, *V. coignetiae*, *V. riparia*, *V. vinifera*), donde el grano de polen de los individuos femeninos carece de aperturas de germinación,

mientras el polen masculino es tricolporado (Kevan *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 1997; Gallardo *et al.*, 2009).

Otros grupos en los que se observa el dimorfismo polínico son las plantas dioicas crípticas en las que es común un aspecto androdioico, pero muestran diferencias en la estructura del polen entre las flores masculinas y las aparentes hermafroditas. Esto queda ejemplificado en los géneros *Mammea* y *Dombeya* y en la especie *Actinidia polygama* (Humeau *et al.*, 1999; Dunthorn, 2004; Kawagoe y Suzuki, 2004). En *Mammea*, al igual que en *P. oaxacana*, se observa un morfo hermafrodita y un morfo masculino. En el morfo hermafrodita, los granos de polen son inaperturados con indentaciones en la pared del polen y en el morfo masculino los granos de polen son tricolporados (Dunthorn, 2004). En *Dombeya* Humeau *et al.* (1999) se reporta un gradiente de dioecia críptica que va desde granos de polen no viables a anteras no dehiscentes.

Al igual que en *P. oaxacana*, *P. krusei* presenta dimorfismo polínico, pero además presenta heteromorfismo polínico, es decir, la producción en un mismo individuo de más de un morfo viable de polen que se diferencia por las aperturas (Dajoz, 1999) situación que no se observa en la especie estudiada en este trabajo.

En la pared de las anteras de *P. oaxacana*, tanto del morfo masculino como del hermafrodita, se observan las características reportadas previamente para la familia Salicaceae y para el género *Prockia* (Johri *et al.*, 1992; Mayorga-Lizalao, 2013).

La presencia de drusas, ornamentación y cristales en la pared de la antera no han sido reportadas previamente en la especie y podrían ser de importancia taxonómica, como en el caso de *Steganotaenia* (Liu *et al.*, 2007). En cuanto a la presencia de drusas de oxalato de calcio son muy comunes y se han reportado en al menos 215 familias de plantas (McNair, 1932).

En el morfo hermafrodita de *P. oaxacana*, se observan engrosamientos anómalos en torno a las células madres de la microspora, es posible que estos engrosamientos estén formados por calosa (Fig. 17d). Este tipo de estructuras han sido reportadas previamente para especies que presentan esterilidad masculina citoplasmática; (Frankel, 1969; Laser y Lersten, 1972). Izhar y Frankel (1971) realizaron un estudio con granos de polen de *Petunia* en el que demostraron que la sincronización de la actividad de la calasa es crítica durante la microsporogénesis; su liberación temprana (en la esterilidad masculina citoplasmática) o su liberación tardía (tanto en la esterilidad masculina citoplasmática como en la esterilidad masculina genética) pueden resultar fatales para los granos de polen en desarrollo. La degradación de la calosa y la liberación de la calasa dependen del tapete, capa de la antera la cual suele estar relacionada con las anomalías en el desarrollo de los granos de polen (Gillman *et al.*, 2009). Sin embargo, en *P. oaxacana* el comportamiento del tapete es morfológicamente semejante en los morfos masculino y hermafrodita (Figs. 15c y 17c).

Es necesario determinar la naturaleza química de los engrosamientos mediante pruebas específicas, y si éstos fueran de calosa, como se sospecha, la prueba de azul de anilina y microscopía de fluorescencia sería conveniente.

Se ha reportado que los granos de polen pericarpados de *P. krusei*, que de manera semejante a *P. oaxacana* sólo se encuentran presentes en el morfo hermafrodita, presentan un 64% de viabilidad según la prueba de Alexander. Los granos de polen sin citoplasma y la aborción de los mismos en algunas anteras del morfo hermafrodita no se han observado en *P. krusei* ni en otras especies del género *Prockia*.

En el morfo masculino, los granos de polen son binucleados en el momento de la dispersión, como fue descrito previamente para la familia y el género (Johri *et al.*, 1992; Mayorga-Lizaloe, 2013).

Quiroz (2015), demostró que los óvulos del morfo masculino de *P. oaxacana* se encuentran atrofiados o detenidos en las etapas iniciales de la formación de los tegumentos. Esta información, junto con la presencia de anteras bien formadas en el morfo hermafrodita y considerando las semejanzas morfológicas existentes entre *P. oaxacana* y *P. krusei* podrían llevar a pensar que *P. oaxacana* presenta un sistema sexual androdioico. Sin embargo, el citoplasma colapsado y los engrosamientos anómalos que se observaron en los granos de polen del morfo hermafrodita llevaron a que se consideraran no viables. Siendo así, *P. oaxacana* no tendría un sistema reproductivo poligamodioico como fue descrito, ni androdioico como su morfología podría indicar, sino un sistema dioico críptico, como propuso Quiroz (2015) y se confirma en este trabajo.

Muchas especies que han sido descritas como androdioicas en función de su morfología, resultaron ser funcionalmente dioicas crípticas (Charlesworth, 1984). Este sistema reproductivo se caracteriza por que los taxa tienen apariencia androdioica, pero muestran diferencias en la estructura del polen entre las flores masculinas y las aparentemente hermafroditas (Mayer and Charlesworth, 1991).

Las flores morfológicamente hermafroditas son, por lo tanto, funcionalmente femeninas. Esta condición ha sido reportada en numerosos casos como los géneros *Mammea* (Dunthorn, 2004), *Solanum* (Anderson y Symon, 1989), *Dombeya* (Humeau *et al.*, 1999) y el clado "madagasikaroide" de Malpighiaceae (Davis, 2002).

Con respecto a los frutos que se llegan a observar en el morfo masculino, Humeau *et al.* (1999), observaron frutos en individuos masculinos de especies con dioecia críptica del género *Dombeya*. Estos frutos se relacionaron con la presencia de óvulos y estilo remanentes en las flores masculinas, que en ocasiones pueden resultar en frutos.

Para confirmar la dioecia críptica, es necesario hacer diferentes pruebas con los granos de polen. La prueba más directa sería conocer la capacidad de germinación del polen *in vivo* o *in vitro* (Kearns e Inouye, 1993). Esto se intentó en *P. oaxacana*; sin embargo, dadas las condiciones de la especie (dificultad para alcanzar las flores, rápida deshidratación de las mismas, etc.), en las que se realizaron las pruebas no se obtuvieron resultados.

Hay dos posibles motivos para la retención de los estambres y los granos de polen no funcionales en las flores femeninas: a) Existe la hipótesis que la dioecia críptica es un paso intermedio en la evolución de las flores hermafroditas a las flores dioicas convencionales, en las cuales ya no se encuentran los estambres o se encuentran muy reducidos. La retención de los estambres, y por lo tanto de los recursos que se les asigna, en las flores femeninas, tendría su explicación en que no ha pasado suficiente tiempo evolutivo para perder los estambres o porque existen limitaciones genéticas (Dunthorn, 2004).

b) El segundo motivo posible para la retención de los estambres involucra a la polinización y ha sido llamado “la hipótesis del polinizador” (Mayer y Charlesworth, 1991). Esta hipótesis dice que cuando no existen otras recompensas para el polinizador, además del polen, las flores femeninas deben conservar los estambres y los granos de polen para atraer la atención de sus polinizadores (Anderson y Symon, 1989; Willson, 1991).

Otras pruebas sugeridas para demostrar la probable dioecia críptica en *P. oaxacana* son: buscar recompensas distintas al polen, como es el néctar y remover artificialmente los estambres de las flores femeninas. Estas pruebas también permitirán entender el motivo de retención del androceo en el morfo funcionalmente femenino de esta especie y conocer los efectos de los estambres en la atracción de los polinizadores.

## Conclusiones

*Prockia oaxacana* posee dos morfos polínicos diferentes: el morfo tricolporado corresponde exclusivamente a las anteras de las flores masculinas y el policolpado a las anteras de las flores del morfo hermafrodita.

La microsporogénesis y microgametogénesis en el morfo masculino ocurren de manera normal y de manera semejante a la del morfo masculino de *P. krusei*.

La microgametogénesis en el morfo hermafrodita de *P. oaxacana* ocurre de manera normal hasta la meiosis, etapa en la que ocurren engrosamientos anómalos alrededor del grano de polen joven que causan que el citoplasma se colapse.

Dentro de las anteras del morfo hermafrodita de *P. oaxacana* existen microsporangios abortivos.

Considerando los estudios realizados por Quiroz (2015) y el actual, la morfología de *P. oaxacana* indica un sistema dioico críptico.

Es necesario comprobar la viabilidad de los granos de polen por medio de pruebas de germinación y la función de los estambres para atraer polinizadores de *P. oaxacana*, para poder llamarla, con toda seguridad, una especie dioica críptica.

## Referencias

- Alford M. H. 2003. Claves para los géneros Flacourtiaceae de Perú y del nuevo mundo. *Arnaldoa* 10(2): 19-38.
- Anderson G. y D. Symon. 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43: 204–219.
- Babayi F., M. Pakravan, A. A. Maassoumi y A. Tavasoli. 2012. Palynological study of *Salix* L. (Salicaceae). *Iran Journal of Botany* 18: 118-126.
- Barinova I., M. Zhexembekova y E. Barsova. 2002. *Antirrhinum majus* microspore maturation and transient transformation *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 53:1119–1129.
- Barrett S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews* 3: 274-284.
- Barrett S. C. H. y J. Hough. 2013. Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany* 64: 67–82.
- Bawa K. S. y J. H. Beach. 1981. Evolution of Sexual Systems in Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68 (2): 254-274.
- Burke J. M., A. Sanchez, K. Kron y M. Luckow. 2010. Placing the woody tropical genera of polygonaceae: a hypothesis of character evolution and phylogeny. *American Journal of Botany* 97: 1377–1390.
- Çelemlı Ö. G. 2012. Pollen morphology of some *Salix* L., (Salicaceae) taxa used by honey bees as a source of pollen and néctar. *Mellifera*: 30-36.

- Charlesworth B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth D. 1984. Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of the Linnean Society* 23: 333-348
- Dafni A. 1992. Pollination ecology: A practical approach. Oxford university press. p: 77.
- Davis G. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. John Wiley & Sons Inc., New York. 528 p.
- Davis C. C. 2002. *Madagasikaria* (Malpighiaceae): A new genus from Madagascar with implication for floral evolution in Malpighiaceae. *American Journal of Botany* 89: 699–706.
- Davis C. C., C. O. Webb, K. J. Wurdack, C. A. Jaramillo y M. J. Donoghue. 2005. Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-cretaceous origin of modern tropical rain forests. *The American Naturalist* 165(3): E36-E65.
- Delph L. F y D. E. Wolf. 2005. Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist* 166: 119–128.
- Dunthorn M. 2004. Cryptic dioecy in *Mammea* (Clusiaceae). *Plant systematics and evolution* 249: 191–196.
- Durand B. y R. Durand. 1991. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. *Plant Science* 80: 49-65.

- Erdtman G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy taxonomy in angiosperms (An introduction to Palynology I). Hafner Publishing Company. Nueva York. p:553.
- Fahn A. 1982. Plant Anatomy. Pergamon. Oxford. 544 pp.
- Frankel R., S. Izhar y J. Nitsan. 1969. Timing of Callase Activity and Cytoplasmic Male Sterility in *Petunia*. *Biochemical Genetics* 3:451-455.
- Furness C. A., P.J. Rudall, y F. B. Sampson. 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *International journal of plant sciences*. 63(2):235–260.
- Furness C. A. 2011. Comparative Structure and Development of Pollen and Tapetum in Malpighiales, with a Focus on the Parietal Clade. *International Journal of Plant Sciences* 172(8): 980-1011.
- Gallardo A., R. Ocete, M. Ángeles-López, M. Lara y D. Rivera. 2009. Assessment of pollen dimorphism in populations of *Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (Gmelin) Hegi in Spain. *Vitis* 48 (2): 59–62.
- GBIF. 2015. —“Global Biodiversity Information Facility.” Free and Open Access to Biodiversity Data. (<http://gbif.org/>).
- Geber M. A., T. E. Dawson y L. F. Delph (Eds.) 1999. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Gilg, E. 1960. Flacourtiaceae. Die natürlichen Pflanzenfamilien. Berlin : Duncker & Humboldt.

- Gillman J. D., S. Bentolila y M. R. Hanson. 2009. Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration in *Petunia*. En: Gerats T. y J. Strommer. (Eds.) *Petunia*. Nijmegen. p.p. 107-129.
- Glimn-Lacy J y P.B. Kaufman. 2006. *Botany Illustrated*. Springer. Nueva York. p:95-96.
- Hammel B. E. y X. Cornejo. 2009. *Forestiera isabelae* (Oleaceae), una especie nueva para Costa Rica. *A Journal for Botanical Nomenclature*, 19(1):52-55.
- Hesse M., H. Halbritter, R. Zetter, M. Weber, E. Buchner, A. Frosch-Radivo y S. Ulrich. 2009. *Pollen Terminology: An illustrated handbook*. Springer - Verlag/Wien. Austria. 266 p.p.
- Hesse E. y J. R. Pannell. 2011. Sexual dimorphism in a dioecious population of the wind-pollinated herb *Mercurialis annua*: the interactive effects of resource availability and competition. *Annals of Botany* 107: 1039–1045.
- Humeau L., T. Pailler y J. D. Thompson. 1999. Cryptic dioecy and leaky dioecy in endemic species of *Dombeya* (Sterculiaceae) on La Reunion. *American Journal of Botany* 86(10): 1437–1447.
- Izhar S. y R. Frankel. 1971. Mechanism of Male Sterility in *Petunia*: The Relationship between pH, Callase Activity in the Anthers, and the Breakdown of the Microsporogenesis. *Theoretical and Applied Genetics* 41: 104—108.
- Jiang J., Z. Zhang, y J. Cao. 2013. Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. *Plant Biology* 15: 249–263.
- Jiménez J. y R. Cruz. 2005. *Prockia krusei* ( Salicaceae ) una especie nueva del estado de guerrero, México. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* 15(2):297–300.

- Jiménez J., R. Cruz y K. Vega. 2008. *Prockia oaxacana* (Salicaceae), una especie nueva del estado de Oaxaca, México. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* 18(3):351-356.
- Johri B.M., K. B. Ambegaokar y P. S. Srivastava. 1992. *Comparative embryology of angiosperms. Vol. 1*. Springer-Verlag. Nueva York. p: 247-248.
- Kawagoe T. y N. Suzuki. 2004. Cryptic dioecy in *Actinidia polygama*: a test of the pollinator attraction hypothesis. *Canadian Journal of Botany* 82: 214–218.
- Kearns C. A. y D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Niwot. 254 p.p.
- Kevan P., D. Blades, A. Posluszny y J. Ambrose. 1988: Pollen dimorphism and dioecy in *Vitis aestivalis*. *Vitis* 27: 143-146.
- Kimura P. H., G. Okamoto y K. Hirano. 1997. Flower types, pollen morphology and germination, fertilization, and berry set in *Vitis coignetiae*. Pulliat. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 323-327.
- Killeen T. J y Z. E. Rugolo. 1992. Taxonomy and Reproductive Biology of *Digitaria dioica* and *D. neesiana* (Gramineae: Paniceae). *Systematic Botany* 17: 594-606.
- Korotkova N., J. V. Schneider, D. Quandt, A. Worberg, G. Zizka y T. Borsch. 2009. Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of a recalcitrant clade with sequences of the petD group II intron. *Plant Systematics and Evolution* 282:201–228.
- Laser K. D. y N. R. Lersten. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *The Botanical Review* 38: 425-450.

- Leskinen E. y C. Alström-Rapaport. 1999. Molecular phylogeny of *Salicaceae* and closely related *Flacourtiaceae*: evidence from 5.8 S, ITS 1 and ITS 2 of the rDNA. *Plant Systematics and Evolution* 215:209-227.
- Liu M. R., B. E. Van Wyk y P. M. Tilney. 2007. Irregular vittae and druse crystals in *Steganotaenia* fruits support a taxonomic affinity with the subfamily Saniculoideae (Apiaceae). *South African Journal of Botany* 73(2): 252-255.
- Lloyd D.G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325-339.
- Lloyd D. G. 1980. Sexual strategies in plants III. A quantitative method for describing the gender of plants. *New Zealand Journal of Botany* 18:1, 103-108.
- Lloyd D.G. y K. S. Bawa. 1984. Modification of the gender of seed plants in varying conditions. *Evolutionary Biology* 17: 255–338.
- López M. L., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias. México, D.F. 178 pp.
- Ludlow B. 2013. El androceo. En: Márquez, J., M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco Segovia y S. Vázquez-Santana (Eds.). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 158-168.
- Ma H. 2005. Molecular Genetic Analyses of Microsporogenesis and Microgametogenesis in Flowering Plants. *Annual Review of Plant Biology* 56:393–434.

- Machado I. C., A. V. López, A. V. Leite y C. de Brito Nieves. 2006. *Cleome spinosa* (Capparaceae): polygamodioecy and pollination by bats in urban and Caatinga areas, northeastern Brazil. *Botanische Jahrbücher für Systematik* 127(1):69–82.
- Manabe T. 1996. Variations in Sex Expression and the Reproductive Function of an Evergreen Broad-leaf Understorey Species, *Eurya japonica* Thunb. (Theaceae). *Bulletin of the Kitakyushu Museum and Institute of Natural History* 15: 137-144.
- Martínez R. E. y L. M. González. 2002. La familia Salicaceae (*Populus*) en el estado de Jalisco, México. Universidad de Guadalajara. Guadalajara. 23 pp.
- Mayer S. S. y D. Charlesworth. 1991. Cryptic dioecy in flowering plants. *Trends in Ecology & Evolution* 6: 320–325.
- Mayorga-Lizaola K. 2013. Morfología y desarrollo de las estructuras reproductivas masculinas en *Prockia krusei* (Salicaceae): un sistema androdioico. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 60 pp.
- McNair J.B. 1932. The intersection between substances in plants: essential oils and resins, cyanogen and oxalate. *American Journal of Botany* 19: 255-271.
- Missouri botanical garden (MOBOT). 2015. Página en red : [www.mobot.org](http://www.mobot.org). Consultado Marzo 20 de 2015.
- Moar N.T. 1993. *Pollen Grains of New Zealand Dicotyledonous Plants*. Maanaki Whenua Press. Lincoln. 200pp.

- Nadot S., C. A. Furness, J. Sannier, L. Penet, S. Triki-Teurtroy, B. Albert y A. Ressayre. 2008. Phylogenetic comparative analysis of microsporogenesis in angiosperms with a focus on monocots. *American Journal of Botany*, 95 (11): 1426-1436.
- Núñez P. y B. Ludlow-Wiechers. 1998. No. 6. *Salicaceae. Flora palinológica de Guerrero*. Facultad de Ciencias. UNAM 6:2-7.
- Orozco G. y S. Vázquez. 2013. Sistemas de reproducción sexual. En: Márquez, J., M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco Segovia y S. Vázquez-Santana (Eds.). *Biología de angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p: 158-168.
- Pannell J. 1997. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in a metapopulation. *Evolution* 51: 10-20.
- Pannell J. 2000. A hypothesis for the evolution of androdioecy: the joint influence of reproductive assurance and local mate competition in a metapopulation. *Evolutionary Ecology* 14:195-211.
- Pannell J. R. 2002a. What is functional androdioecy? *Functional Ecology* 16, 858–869.
- Pannell J. R. 2002b. The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual review of Ecology and Systematics* 33:397–425.
- Pearsall D. M. 2000. *Paleoethnobotany a Handbook of procedure*. Academic Press. California. 700 pp.

- Punt W., P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson y A. Thomas. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology* 143: 1 – 81.
- Quiroz E. N. 2015. Estructura del gineceo en los morfos florales de *Prockia oaxacana* (Salicaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 72 pp.
- Qureshi R.A., S. A. Gilani, S. J. Gilani, K. N Sultana y M. A. Ghufuran. 2007. Palynological study of the genus *Salix* L. (Salicaceae) from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 39: 2257-2263.
- Renner S.S., L. Beenken, G. W. Grimm, A. Kocyan, y R. E. Ricklefs. 2007. The evolution of dioecy, heterodichogamy, and labile sex expression in *Acer*. *Evolution* 61-11: 2701–2719.
- Renner S. 2014. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany* 101: 1-9
- Roldan G. L. 2015. Adecuación de la función masculina de los morfos florales en la planta androdioica *Prockia krusei* (Salicaceae). Tesis de licenciatura (Biólogo) Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad de México. 92 pp.
- Sáenz C. 1978. Polen y esporas. Blume ediciones. Madrid. 219 pp.
- Sáenz C. 2004. Glosario de términos palinológicos. *Lazaroa* 25: 93-112.
- Sakai A. K. y S. G. Weller. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. En : Geber, M. A., T. E. Dawson,

- y L. F. Delph (Eds.). Sexual and gender dimorphism in flowering plants. Springer-Verlag, Heidelberg. p: 1–31.
- Sakai S. 2001. Thrips pollination of Androdioecious *Castilla elastica* (Moraceae) in a seasonal tropical forest. *American Journal of Botany* 88: 1527-1534.
- Sarkissian T. S., S. C. H. Barrett y L. D. Harder. 2001. Gender variation in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): Is size all that matters? *Ecology* 82: 360–373.
- Scotland R. W., S. H. Barnes y S. Blackmore. 1990. Harmomegathy in the *Acanthaceae*. *Grana* 29(1): 37-45.
- Stevens P. F. (2012). Angiosperm Phylogeny Website. Página en red: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Consultada el 20 de marzo de 2014.
- The Plant List. 2013. *Prockia* – The Plant List.”Kew gardens, Missouri Botanical Garden, The New York Botanical Garden. (<http://theplantlist.org/browse/A/Salicacea/Prockia/>).
- Valencia S., M. Martínez, R. Cruz, J. Jiménez y E. T. Rodríguez. 2012. *Glosario Ilustrado de Embriófitas*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. p: 119.
- Vargas G. 2011. Botánica general, desde los musgos hasta los árboles. Universidad Estatal a Distancia de San José. San José. p: 101-104.
- Vázquez R. 2013. Estructura del gineceo en los morfos florales de *Prockia krusei* (Salicaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 58 p.p.

Vázquez-Nin G. y O. Echeverría. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de cultura económica. México.

Wallander E. 2008. Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. *Plant Systematics and Evolution* 273:25–49.

Walker J. W. y J. A. Doyle. 1975. The Bases of Angiosperm Phylogeny: Palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 664-723.

Willson M. F. 1991. Sexual selection, sexual dimorphism and plant phylogeny. *Evolutionary Ecology* 5: 69–87.

Wolf D. y N. Takebayashi. 2004. Pollen limitation and the evolution of androdioecy from dioecy. *The American Naturalist* 163:122-137

Wurdack K. J y C. C. Davis. 2009. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96(8): 1551–1570.