



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Biología reproductiva de *Opuntia robusta* Wendl
en dos poblaciones del Estado de Hidalgo.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CITLALLI HYPATIA SONYA MENDOZA REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Núñez Farfán

Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez

Instituto de Ecología, UNAM

Dr. Eduardo Cuevas García

Facultad de Biología, Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo

TUTOR INVITADO: Dr. Mariusz Krzysztof Janczur Feret

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma
del Estado de México

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Biología reproductiva de *Opuntia robusta* Wendl
en dos poblaciones del Estado de Hidalgo.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CITLALLI HYPATIA SONYA MENDOZA REYES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Juan Núñez Farfán

Instituto de Ecología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez

Instituto de Ecología, UNAM

Dr. Eduardo Cuevas García

Facultad de Biología, Universidad Michoacana
de San Nicolás de Hidalgo

TUTOR INVITADO: Dr. Mariusz Krzysztof Janczur Feret

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma
del Estado de México

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2019



OFICIO CPCB/523/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


Me en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 11 de junio de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, a la alumna **MENDOZA REYES CITLALLI HYPATIA SONYA** con número de cuenta **515015490** con la tesis titulada: "**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *Opuntia robusta* WENDL EN DOS POBLACIONES DEL ESTADO DE HIDALGO**", bajo la dirección del **DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**:

Presidente:	DR. ALFONSO VALIENTE BANUET
Vocal:	DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
Secretario:	DR. MARIUSZ KRZYSZTOF JANCZUR FERET
Suplente:	DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Suplente	DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a, 2 de mayo de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Deseo agradecer enormemente al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica y la calidad en mis estudios de Posgrado.

Al **CONACyT** (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por haberme otorgado la beca para mis estudios de Maestría con número **565089**.

Todo el apoyo económico para las colectas, las estancias y viáticos en campo, así como la compra de los materiales utilizados y asistencia a congresos y estancias académicas fue proporcionado por el proyecto **CONACyT/180694** cuyo responsable fue el Dr. Mariusz Krzysztof Janczur Feret.

A mi tutor principal, el Dr. Juan Servando Núñez Farfán y a los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez, el Dr. Eduardo Cuevas García y el Dr. Mariusz Krzysztof Janczur Feret, por todo su apoyo, sus valiosos comentarios y aportes a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero agradecer al Biólogo (próximamente Doctor) Adán Miranda Pérez por toda la inmensa ayuda que me brindó para realizar las colectas de campo, los análisis estadísticos y sus valiosos consejos para la realización y presentación de este trabajo.

También quiero agradecer a los Técnicos Laboratoristas, la Dra. Rosalinda Tapia López, al M. en C. José Rubén Pérez Ishiwara por la ayuda y disposición que siempre tuvieron conmigo respecto a la compra y/o disponibilidad de reactivos y materiales, técnicas de laboratorio y asesoría en las técnicas de microscopía electrónica.

También es muy importante para mí agradecerle al Dr. César Mateo Flores Ortiz, al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla y al Biol. Fernando Abiram García García de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM por la valiosa ayuda y el enorme apoyo que siempre dieron en sus instalaciones, y porque sus conocimientos ayudaron a enriquecer bastante mi trabajo, en especial, en todo lo que involucró la recolección, almacenamiento y procesamiento del néctar que obtuvimos de las plantas de *Opuntia robusta*.

De manera muy especial deseo expresar todo mi agradecimiento a los revisores de mi Tesis, el Dr. Alfonso Valiente Banuet, Dr. Luis Eguiarte Fruns, Dr. Pedro Luis Valverde Padilla y el Dr. Ángel Salvador Arias Montes, porque todo el tiempo que dedicaron en sus revisiones, así como los comentarios, consejos y observaciones que realizaron para este trabajo me ayudaron a enriquecerlo enormemente.

Por último, también deseo agradecer a la Lic. Erika Rodríguez Reyes, al M. en I. Alejandro René González Ponce y al M. en I. José Miguel Baltazar Gálvez por todo el apoyo que siempre me dieron, ya sea con algún trámite o cada vez que alguno de mis equipos de cómputo se rebeló ellos siempre estuvieron allí para apoyarme, pero además de eso, porque son personas geniales que me brindaron momentos muy gratos durante todo el tiempo que estuve en el Instituto de Ecología.

DEDICATORIA

A mis amados padres **José Carlos** y **Martha Hilda** por su constante empeño para formarme como una persona de bien y por todo el inmenso apoyo, y amor que siempre me brindaron. Espero con todo mi corazón que este trabajo sea un segundo logro que los haga sentirse orgullosos de mí, y que sientan que todo el trabajo constante, los esfuerzos y numerosos sacrificios que hicieron para sacarme adelante valieron la pena. A mi mamita hermosa deseo poder darte todavía muchos logros más, bienestar y felicidad siempre.

A mis hermanos **Miguel Ángel** y **Rebeca** por ser los mejores hermanos que alguien podría tener (y vaya que soy muy afortunada de tener hermanos como ustedes). Gracias por cuidarme, apoyarme, ser mis confidentes y guiar mi camino desde que nací. Los quiero con toda mi alma y espero poder retribuirles en algún momento todo lo que han hecho por mí.

A mi hermoso compañero de vida **Adán Miranda Pérez**, gracias por tomar muy fuerte mi garrita y acompañarme siempre en todos los momentos, no importa si son buenos o malos, tú los transformas todos y los vuelves únicos y preciosos. Te amo, respeto y valoro en cada segundo que compartes conmigo como la persona especial que ha hecho todos y cada uno de mis días los más bellos de toda mi vida.

A mis traviesos, queridos y muy inteligentes sobrinos **Devyaní**, **Leonel**, **José Carlos** y **Benji**, les dedico este trabajo con mucho cariño y les agradezco por toda la paciencia que me han tenido, reconozco que algunas veces he sido una tía regañona pero espero comprendan que llegar hasta este punto muchas veces fue estresante y difícil. Deseo poder ser partícipe de todos sus logros al igual que ustedes lo han sido de los míos. ¡Los adoro con el alma Chavalitos!

Al **Dr. Mariusz K. Janczur Feret**, porque sin su apoyo, recursos, consejos y disposición para guiar y revisar mi trabajo probablemente este nunca se habría terminado. Además la hermosa amistad y confianza que me brindó a lo largo de todos estos años de trabajo en conjunto hicieron que los momentos difíciles fueran sin duda más llevaderos. ¡Muchas gracias, Mariusz!

Al **Dr. Juan Núñez Farfán**, muchas gracias por recibirme y permitirme ser parte de uno de los mejores laboratorios de México, debido al apoyo que siempre me diste pude cumplir uno de mis más grandes sueños y las experiencias que tuve tanto dentro como fuera del ámbito académico cambiaron completamente mi vida, así como las perspectivas que tenía sobre la ciencia. ¡Muchas gracias, Juan!

A mis preciosas nenitas de muchos colores, tamaños y sabores **Hannah, Pookie, Vilain, Tristán, Goldie, Misha, Pachi, Hanzel, Truffa, Hachi, Marley y Coco**. Con mención especial a **Pelusa, Shipo, Firulais y Pasha** que aunque ya no estén conmigo los recuerdo con mucho amor, tanto o más como el que me dieron. Siempre los llevo en mi corazón y les agradezco inmensamente por toda la alegría, energía, compañía y felicidad que le dan a mi vida.

A la **Familia Butrón**, en especial a los señores **Justino y Lucía**, por recibirnos y darnos toda la confianza para estar en su casa durante los meses en que realizamos el trabajo de campo. Siempre recordaremos con mucho cariño las deliciosas comidas que nos preparaba la Sra. Lucía, las increíbles pláticas que tuvimos con el Sr. Justino y las reuniones familiares a las que ambos nos invitaron. Muchas por acogernos, cuidarnos y hacernos sentir siempre como parte de su familia.

A mi querida amiga **Ángela Aurora Núñez Marqués**, muchas gracias por tantos años de divertidas y largas pláticas, consejos, risas, aventuras y buenos momentos que hemos pasado juntas. Te quiero mucho y espero que podamos compartir muchos años más.

ÍNDICE

Contenido	Página
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La reproducción en las angiospermas.....	1
1.2 Caracteres reproductivos de la flor.....	2
1.2.1 Características de las flores de Opuntia.....	3
1.3 Clasificación de los sistemas reproductivos en las angiospermas.....	5
1.4 Evolución del dioicismo, otras combinaciones sexuales y características florales.....	8
1.5 La antesis floral y los polinizadores como parte fundamental en la reproducción de las angiospermas.....	10
1.6 El néctar como recompensa floral.....	11
1.7 Los sistemas de apareamiento.....	12
1.8 Características ambientales y fisiológicas para la germinación en las cactáceas.....	13
2. OBJETIVOS GENERALES	16
2.1 Objetivos particulares.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Descripción de la especie.....	17

3.2 Descripción de las zonas de estudio.....	20
3.3 Elección, marcado y determinación del sexo de las plantas.....	22
3.4 Determinación del sistema reproductivo de <i>Opuntia robusta</i>	23
3.5 Antesis floral de <i>Opuntia robusta</i> en las poblaciones de Hidalgo.....	26
3.6 Registro de los polinizadores y colecta de datos del néctar como recompensa floral.....	26
3.7 Evaluación del sistema de apareamiento de <i>Opuntia robusta</i> por medio de experimentos de polinización controlada.....	28
3.8 Germinación de semillas de los frutos producidos mediante los experimentos de polinización controlada.....	31
3.9 Análisis estadísticos.....	33
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Descripción de los individuos hermafroditas de SNT y MR, y su sistema reproductivo.....	36
4.2 Fenología floral en las poblaciones de Hidalgo.....	39
4.3 El néctar como recompensa floral en tres poblaciones de <i>Opuntia robusta</i> del centro de México.....	40
4.4 Los polinizadores en las poblaciones de Hidalgo.....	43
4.5 El sistema de apareamiento de <i>Opuntia robusta</i> en SNT y MR.....	45
4.6 Porcentaje de germinación en los experimentos de polinización controlada.....	49
5. DISCUSIÓN.....	50
5.1 El sistema reproductivo de <i>Opuntia robusta</i> en individuos hermafroditas favorece la autogamia.....	51
5.2 El periodo de floración es diferente en las poblaciones de <i>O. robusta</i>	52

5.3 El néctar como recompensa floral favorecería la visita de las abejas como polinizadores efectivos en <i>Opuntia robusta</i>	53
5.4 El sistema de apareamiento mixto está presente en la mayoría de las poblaciones de <i>Opuntia robusta</i>	57
5.5 La eficiencia de la autopolinización en relación con la germinación de las semillas.....	59
6. CONCLUSIONES	61
7. LITERATURA CITADA	65

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	Página
Figura 1. Clasificación de las flores por sus estructuras reproductivas.....	3
Figura 2. Morfología de una flor hermafrodita del género <i>Opuntia</i>	5
Figura 3. Morfología de las flores y frutos de <i>Opuntia robusta</i>	18
Figura 4 Localización de las poblaciones de <i>Opuntia robusta</i> que se utilizaron en este trabajo.....	21
Figura 5. Atributos florales para determinar el sistema reproductivo de <i>Opuntia robusta</i>	24
Figura 6. Número de óvulos y granos de polen por flor en las poblaciones de Hidalgo.....	37
Figura 7. Apertura floral por horas en las poblaciones de Hidalgo.....	39
Figura 8. Volumen y concentración de azúcares en el néctar de <i>O. robusta</i>	41
Figura 9. Contenido energético en el néctar de <i>Opuntia robusta</i> en tres poblaciones del centro de México.....	42
Figura 10. Principales géneros de abejas que polinizan a <i>Opuntia robusta</i> en SNT y MR.....	44
Figura 11. Coleópteros que polinizaron a <i>Opuntia robusta</i> en Hidalgo.....	44
Figura 12. Número de semillas en los frutos de las poblaciones de Hidalgo.....	47
Figura 13. Volumen de los frutos en las poblaciones SNT y MR.....	48
Figura 14. Porcentaje de germinación en las poblaciones SNT y MR.....	49
Figura 15. Porcentaje de germinación de semillas por tratamiento en las poblaciones MR y SNT.....	50

TABLAS	Página
Tabla 1. El cociente entre el número de granos de polen y óvulos (cociente P/O) refleja el sistema de apareamiento (Cruden, 1977).....	13
Tabla 2. Coordenadas geográficas y vegetación asociada de las poblaciones de <i>Opuntia robusta</i> incluidas en este estudio.....	21
Tabla 3. Medidas de los caracteres morfológicos en los brotes florales de <i>Opuntia robusta</i> en las poblaciones MR y SNT.....	38
Tabla 4. Relación de los experimentos de polinizaciones controladas por población, réplicas de cada experimento, número de frutos colectados y número de frutos perdidos.....	45

RESUMEN

Se han encontrado vestigios de que el morfo hermafrodita en las plantas fue la condición ancestral, por lo que se piensa que existen rutas evolutivas hacia el dioicismo. *Opuntia robusta* es un buen sistema de estudio ya que tiene poblaciones dioicas, ginodioicas, hermafroditas y trioicas. En este trabajo se describen los visitantes florales y el néctar como recompensa floral en la población del Jardín Botánico Regional de Cadereyta, Querétaro (JBRC) y en dos poblaciones de Hidalgo San Nicolás Teacoaco (SNT) y Matías Rodríguez (MR), además se describe el sistema de apareamiento en las poblaciones de Hidalgo. El néctar se evaluó conforme a su contenido energético, el cual fue mayor en las flores femeninas, después en hermafroditas y menor en las masculinas. Tanto en MR y SNT los principales polinizadores fueron abejas del género *Macrotera*, las cuales también se encuentran en el JBRC, en esta última población también hay abejas del género *Diadasia*. Se analizó el número de granos de polen y de óvulos, y de acuerdo con el cociente polen/óvulos propuesto por Cruden, en la población MR se obtuvo un logaritmo de 2.44 que correspondería al sistema de apareamiento autógeno facultativo y en la población SNT fue de 2.62, lo cual sugiere un sistema de apareamiento xenógeno facultativo. Después de realizar experimentos de polinizaciones controladas se germinaron las semillas de los frutos resultantes de cada tipo de tratamiento. En la población SNT hubo mayor germinación en los tratamientos de autopolinización en comparación con los demás tratamientos. Los resultados de los experimentos sugieren que las abejas del género *Diadasia* actúan como un agente de selección para mantener el dioicismo en la población JBRC. Mientras que SNT podría ser la población que se encuentra más cercana en la ruta evolutiva hacia el dioicismo en comparación con MR.

ABSTRACT

Vestiges have been found that the hermaphrodite morpho in plants was the ancestral condition, so it is thought that there are evolutionary routes towards dioecism. *Opuntia robusta* is a good system of study since it has dioecious, ginodioic, hermaphroditic and trioecious populations. In this work, floral visitors and nectar are described as floral rewards in the population of the Regional Botanical Garden of Cadereyta, Querétaro (JBRC) and in two populations of Hidalgo San Nicolás Tecoco (SNT) and Matías Rodríguez (MR), as well as the mating system in the populations of Hidalgo. Nectar was evaluated according to its energetic content, which was higher in female flowers, then in hermaphrodites and lower in male flowers. Both in MR and SNT the main pollinators were bees of the genus *Macrotera*, which are also found in the JBRC, in the latter population there are also bees of the genus *Diadasia*. The number of pollen grains and ovules was analyzed, and according to the pollen/ovules ratio proposed by Cruden, in the MR population a logarithm of 2.44 was obtained that would correspond to facultative autogamous mating and in the SNT population it was 2.62, which suggests an facultative xenogamous mating system. After controlled pollination experiments, the seeds of the fruits resulting from each type of treatment were germinated. In the SNT population there was more germination in the self-pollination treatments compared to the other treatments. The results of the experiments suggest that bees of the genus *Diadasia* act as a selection agent to maintain dioecism in the JBRC population. While SNT may be the closest population on the evolutionary path to dioecism in comparison to MR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La reproducción en las angiospermas

Las angiospermas o plantas con flores constituyen el grupo vegetal más diverso del planeta, con más de 250,000 especies presentes en todos los ecosistemas terrestres y muchos acuáticos (Wikström *et al.*, 2001). Este grupo taxonómico se reproduce mediante órganos especializados que incluyen diversos sistemas de apareamiento, en contraste con las gimnospermas las cuales no poseen un ovario con estilo y estigma, y presentan polinización cruzada dependiente del viento (Davies *et al.*, 2004; Barret y Harder, 2006; Bell *et al.*, 2010) aunque existen algunas excepciones como *Ephedra foeminea* la cual puede ser polinizada por dípteros y lepidópteros nocturnos (Rydin y Bolinder, 2015). En la mayoría de las especies del género *Ephedra* los insectos no son necesarios para la polinización y no funcionarían como un agente de selección (Rydin y Bolinder, 2015). Además, las plantas con flor pueden reproducirse tanto por la vía sexual como la asexual (propagación vegetativa y apomixis).

La flor es el órgano reproductivo de las angiospermas. Estas estructuras contienen a su vez los verticilos especializados sexuales femeninos y masculinos o ambos (ovario, estigma y estilo para el verticilo floral femenino y estambres para el verticilo floral masculino), cuya función tiene como fin la reproducción, la cual generalmente depende de los polinizadores. Las flores incluyen entre sus rasgos florales “la atracción y la recompensa” para los polinizadores mediante sustancias como los azúcares del néctar, aceites, esencias, polen y coloraciones especiales en sus corolas (Passarelli y Bruzzone, 2004). Dichos rasgos florales propician que los polinizadores depositen el polen dentro y entre las flores de un mismo individuo o en las flores de otros individuos (Chittka *et al.*, 1999; Abarca y López, 2007). La reproducción sexual implica la meiosis y la fusión de las células reproductivas (gametos). La unión de gametos masculinos y femeninos, fecundación, es un proceso que ocurre dentro de la flor. La reproducción sexual de las angiospermas promueve la variabilidad genética en la descendencia (Gillespie, 2004), generando nuevas combinaciones genéticas que no están presentes en ninguno de los progenitores. Las

nuevas combinaciones de genes podrían promover la adaptación en ambientes heterogéneos.

La reproducción puede producirse por autofecundación, donde los gametos masculinos y femeninos son de la misma planta. Por otra parte, la propagación vegetativa es un tipo de reproducción asexual que no implica la formación de flores, semillas ni frutos, sino que la descendencia se forma a partir de una parte vegetativa que se separa del resto de la planta como tallos, rizomas, tubérculos, bulbos, cormos y estolones, los cuales pueden crecer hasta formar una planta completa.

La apomixis es un tipo de reproducción asexual (Richards, 2003) donde hay producción de semillas, aunque no ocurran ni la meiosis ni la fecundación. Existen dos tipos de apomixis, la primera es la gametofítica en la cual un saco embrionario da origen a un embrión, y la segunda es la embrionaria adventicia o agamosperma esporofítica, en la que se produce un embrión a partir de las células de la nucela (Koltunow, 1993; Bicknell *et al.*, 2000; Richards, 2003).

1.2 Caracteres reproductivos de la flor

Se considera que el incremento en la complejidad estructural de los órganos reproductivos en las angiospermas representó una ventaja evolutiva, en comparación con los grupos más antiguos de plantas que habitaron la Tierra (Dreni y Zhang, 2016).

La flor es el carácter distintivo de este grupo de plantas; las flores son estructuras complejas que contienen a los órganos reproductivos. Cuando las flores poseen tanto órganos sexuales masculinos (androceo) y femeninos (gineceo) se les denomina como perfectas (bisexuales) o hermafroditas. Por otra parte, si carecen de alguna de las estructuras reproductivas se les llama flores imperfectas (Dafni, 1992). Si las plantas presentan flores con los verticilos femeninos y masculinos independientes, pero en el mismo individuo, se denominan monoicas. Si los sexos están separados en diferentes individuos se denominan plantas dioicas (Figura 1; Dafni, 1992; Raven *et al.*, 2005).

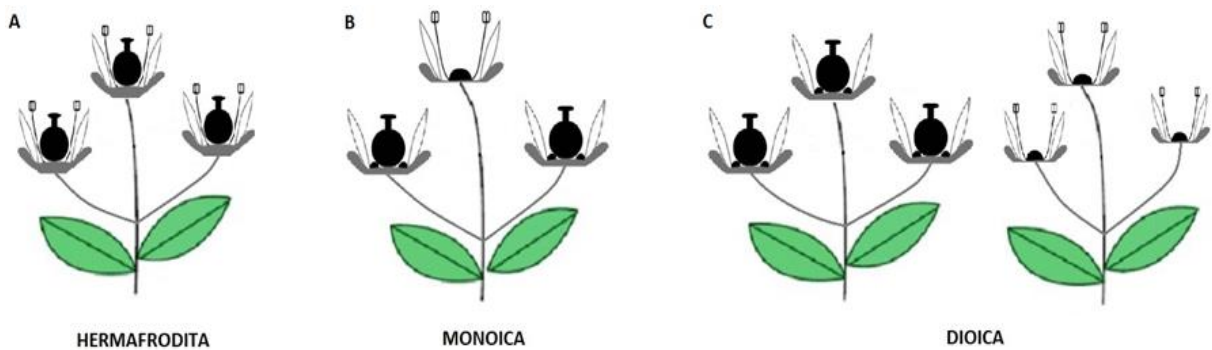


Figura 1. Clasificación de las flores por sus estructuras reproductivas. A) Plantas hermafroditas cuyas flores tienen tanto androceo (verticilo floral masculino) como gineceo (verticilo floral femenino) en la misma flor, B) Plantas monoicas que tienen flores masculinas y femeninas en distintas flores, en la misma planta, y C) Plantas dioicas, donde hay tanto flores masculinas como femeninas separadas en distintos individuos. La figura se tomó y modificó de Karasawa M., 2015.

Durante el ciclo reproductivo sexual de las angiospermas, la fase gametofítica (producción de células haploides que poseen un conjunto de cromosomas) alterna con la fase esporofítica. Esta última se caracteriza porque sus células poseen dos conjuntos haploides de cromosomas. Casi la totalidad del ciclo de vida de las angiospermas representa su fase esporofítica; la fase gametofítica tiene un periodo de tiempo corto, en el que viven las células haploides denominadas gametos (Raven *et al.*, 2005).

Los gametos femeninos se denominan óvulos y los masculinos son el polen. Las anteras son los órganos reproductivos masculinos en los que se produce el polen. El órgano reproductivo femenino es el ovario el cual rodea y protege a los óvulos en el centro de la flor. Después de que el saco embrionario es fertilizado, el óvulo se transforma en una semilla y los tejidos circundantes del ovario se convierten en los tejidos que darán origen al fruto (Raven *et al.*, 2005).

1.2.1 Características de las flores de Opuntia

En México se encuentran 83 especies de las 190 nativas del género *Opuntia* (Guzmán *et al.* 2003). La mayoría de las flores de *Opuntia* se caracterizan porque despliegan una estructura hermafrodita, además existen las morfologías unisexuales (machos y

hembras) las cuales quizás deriven de esta estructura y se presentan por la atrofia de los estambres o del pistilo (Del Castillo y González-Espinosa, 1988; Diaz y Cocucci, 2003, Camacho-Velázquez *et al.*, 2016).

En general, las flores se desarrollan a partir de yemas (Airoldi y Davies, 2012; Dreni y Zhang, 2016). Las flores casi siempre están formadas por cuatro tipos de verticilos florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos, dispuestos de afuera hacia adentro de la flor. El extremo del pedúnculo se amplía, para formar un receptáculo que contiene algunas o todas las partes florales. Las cuatro partes florales son importantes en el proceso reproductivo, pero solo las anteras (los órganos masculinos) y los carpelos (los órganos femeninos) participan de modo directo en la reproducción sexual. Los sépalos y los pétalos son estériles. Los pétalos tienen la importante función de atraer a los polinizadores para que ocurra la reproducción sexual. En conjunto, los pétalos de una flor constituyen la corola. A veces los pétalos están fusionados entre sí en un tubo o en otra forma floral. En las angiospermas, a lo largo de 130 millones de años de historia de este grupo, evolucionaron un gran número de variaciones en esta fórmula floral (Wikström *et al.*, 2001).

Desde los verticilos florales externos hasta los internos, las flores de *Opuntia* (Figura 2) se caracterizan por tener tépalos, los cuales son hojas modificadas o brácteas que son extensiones del tallo y forman la corola. Son sésiles y solitarias, por lo general, una única flor se produce de cada yema axilar (por ejemplo, de la aréola; Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001). También, cuentan con numerosos estambres que se insertan en la parte interior del tubo floral, de los que se desprenden grandes cantidades de polen. Poseen un estigma, que en la parte superior se divide en varios lóbulos cuyo número puede variar entre las especies y cuando está maduro puede ser tanto húmedo (secreta una sustancia de textura pegajosa que fluye libremente en su interior) o seco (con una capa o película proteica pero que no fluye libremente en su interior), estas secreciones son importantes porque permiten la captura de polen o su germinación (Mandujano *et al.*, 2010). Las aréolas son zonas meristemáticas con la capacidad de dar origen a tallos, hojas o flores (Camacho-Velázquez *et al.*, 2016). Otra característica importante de las flores del género *Opuntia* es que el nectario se encuentra debajo de la unión de los verticilos florales internos (verticilos femenino y

masculino). Por último, las flores de *Opuntia* se caracterizan por tener un pericarpelo, el cual es el tejido que rodea al ovario. La epidermis del pericarpelo de las *Opuntias* es simple y tiene múltiples meristemos activos en la aréola, los cuales producen espinas, cerdas y otros tipos de células epidérmicas que pueden diferenciarse en tricomas. El pericarpelo se delimita del tejido que forma el ovario por haces vasculares de crecimiento secundario (Fuentes-Pérez *et al.* 2009).

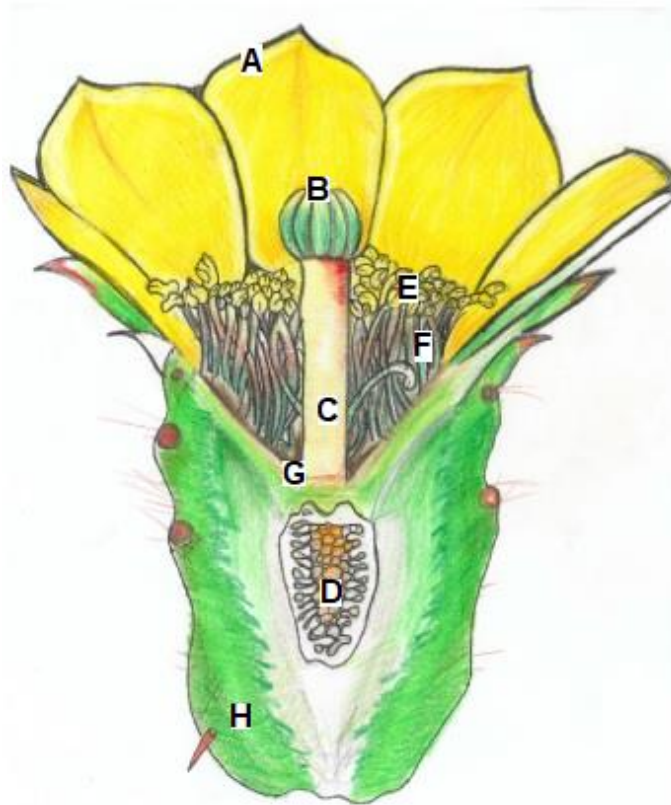


Figura 2. Morfología de una flor hermafrodita del género *Opuntia*. A) Perianto, B) Estigma, C) Estilo, D) Ovario con óvulos rodeado de un pericarpelo, E) Anteras, F) Filamentos, G) Nectario, H) Receptáculo. Imagen modificada de Arqueología Mexicana, 2015. Volumen 62 por J. Benjamín Méndez-Mayer.

1.3 Clasificación de los sistemas reproductivos en las angiospermas

La reproducción en plantas se puede dividir en el sistema reproductivo y en el sistema de apareamiento (*mating system*). El sistema de apareamiento se refiere a los patrones de cómo y con quién se aparean los individuos en una especie (Holsinger,

2000), mientras que los sistemas reproductivos se determinan por la forma en que ubican espacial y temporalmente las estructuras reproductivas en los individuos de una población (Barret y Eckert, 2012). La gran mayoría de las especies de plantas presentan flores donde las estructuras femeninas y masculinas están juntas en una flor (por ejemplo, plantas monoicas o hermafroditas). Existen sistemas reproductivos donde los órganos reproductivos están completamente separados en plantas individuales (por ejemplo, plantas dioicas), y también surgieron mecanismos como la separación temporal (dicogamia) y espacial (hercogamia) de las estructuras reproductivas y los sistemas de incompatibilidad (Abarca y López, 2007). De acuerdo con Dafni (1992), la clasificación de los arreglos espaciales en los sistemas reproductivos de las plantas es:

A. Arreglo espacial de los órganos masculinos y femeninos:

I. Clasificación de los sistemas reproductivos a nivel de individuo

1. Hermafroditas: individuos que solamente producen plantas con flores bisexuales.
2. Monoicas: individuos que producen flores con órganos masculinos y/o femeninos (flores bisexuales o unisexuales) en la misma planta.
3. Andromonoicas: plantas que producen flores bisexuales y masculinas (dominan las flores del género masculino).
4. Ginomonoicas: individuos que producen flores bisexuales y femeninas (dominan las flores del género femenino).
5. Poligamonoicas: plantas que producen flores bisexuales, masculinas y/o femeninas.

II. Clasificación de los sistemas reproductivos en las plantas a nivel de grupo

1. Dioicas: individuos que producen flores masculinas o femeninas.
2. Androdioicas: plantas que producen flores bisexuales y masculinas.
3. Ginodioicas: individuos que producen flores bisexuales y femeninas.
4. Poligamodioicas (trioicas): individuos que producen flores bisexuales, femeninas o masculinas.

B. Al aislamiento temporal de los órganos en flores hermafroditas o la existencia de flores unisexuales en un mismo individuo (especies monoicas) se denomina dicogamia.

La dicogamia es la separación temporal de las funciones masculinas y femeninas que influyen en la liberación y recepción del polen. En observaciones *in situ*, la deposición del polen puede observarse a simple vista o con una lupa a 10x. La receptividad del estigma puede verificarse experimentalmente o con un método químico. La receptividad del estigma es crucial para el éxito en la polinización, ya que el estigma debe estar receptivo para que los granos de polen puedan germinar y se produzca el tubo polínico después de la polinización. En caso contrario no ocurrirá la fertilización (Shivanna y Tandon, 2014). La dicogamia se clasifica en:

- I. Protandria: el polen se libera de las anteras antes de que el estigma sea receptivo.
 - II. Protoginia: el estigma se vuelve receptivo antes de que el polen se libere de las anteras.
- C. Rechazo o reconocimiento bioquímico por autoincompatibilidad de alelos durante la receptividad del estigma:
- I. Autoincompatibilidad: la presencia de alelos de incompatibilidad en el estigma impide la fertilización debido a que los individuos tienen genes que no son compatibles con los que reciben del polen.
 - II. Autocompatibilidad: todas las polinizaciones, incluso las autopolinizaciones resultan en la producción de frutos.
- D. Los sistemas de aislamiento reproductivo basados en el dimorfismo y la variación en el largo del estilo y de los estambres se denominan hercogamia.

La hercogamia es la separación espacial de los verticilos florales compatibles masculinos y femeninos. Para estudiarla, es necesario un análisis de algunos caracteres morfológicos de la flor y de la conducta de forrajeo de los visitantes florales, además de la importancia que tienen los visitantes florales para que se realice exitosamente la fecundación (Lloyd y Webb, 1992). La hercogamia se puede dividir en:

I. Heterostilia

1. Distilia: los individuos poseen flores con un estilo largo y estambres cortos (morfo *pin*) o flores con estilo corto y estambres largos (morfo *thrum*).
2. Tristilia: es un polimorfismo floral, en el cual, los individuos tienen flores cuyo estilo es muy corto, medio o largo, y tienen su contraparte con el largo de los estambres.

II. Enantiomorfa o Enantiostilia: se caracteriza porque los individuos poseen anteras con dos morfos (varias anteras que le proporcionan polen a los visitantes florales y una antera polinizadora) y dos tipos de flores que se desvían del estilo hacia la derecha o a la izquierda del eje floral, como si fueran un espejo la una de la otra. Dicha asimetría favorece la polinización cruzada y previene la geitonogamia (Dafni, 1992).

1.4 Evolución del dioicismo, otras combinaciones sexuales y características florales

En las Angiospermas, el hermafroditismo es considerado la condición ancestral, de la cual han evolucionado varios sistemas reproductivos, que podrían ser estados intermedios en la ruta hacia el dioicismo (Mandujano *et al.*, 2013; Dufay *et al.*, 2014). Los estudios de biología reproductiva son sumamente importantes pues la reproducción es una característica inherente a los seres vivos y mediante la cual los individuos logran la perpetuación de sus genes hacia generaciones posteriores. En particular, para lograr el éxito reproductivo, las plantas han adoptado diferentes estrategias que les permiten adaptarse y colonizar una vasta cantidad de ambientes y lidiar con los desafíos que ello implica (Peterson y Kay, 2014).

Otro aspecto importante en la biología floral es la proporción de los sexos en una población, la cual se ha planteado como una estrategia evolutivamente estable, es decir, es una estrategia que no puede ser invadida o sustituida por otra en una población (Maynard-Smith y Price, 1973). Por ejemplo, puede decirse que una de las ventajas del dioicismo es que la recombinación aporta mayor variabilidad genética respecto a los sistemas autógamos obligados, y por lo tanto es más complicado que

esta estrategia sea sustituida por otra (Maynard-Smith, 1979; Gillespie, 2004; Wright *et al.*, 2013).

En la hipótesis de la transición del hermafroditismo hacia el dioicismo en las poblaciones de plantas, la primera transición implica la invasión de los individuos femeninos en una población hermafrodita. La ventaja de las plantas hembra es que generalmente tienen mayor viabilidad en sus semillas respecto a los individuos hermafroditas cuando los dos morfos sexuales coexisten (Spigler y Ashman, 2011). Las desventajas de las hembras se deben a que presentan un mayor esfuerzo reproductivo que las hermafroditas, lo que se refleja en una menor tasa de crecimiento, retraso en la floración y/o menor supervivencia (Jing y Coley, 1990; Allen y Antos, 1993). Posteriormente, si las hembras son exitosas y se establecen, la población se vuelve ginodioica (poblaciones conformadas por plantas hembra que son estériles para la función masculina y hermafroditas; Cuevas-García y Abarca-García, 2006). En la siguiente transición, es posible que los machos invadan las poblaciones ginodioicas y se formen poblaciones dioicas o trioicas. Igualmente, la ventaja de los machos es que su polen despliega mayor viabilidad en sus semillas que los individuos hermafroditas. Al final de la transición los machos suplantán a los hermafroditas y como consecuencia se establece el sistema dioico en las poblaciones (Dufaÿ *et al.*, 2014). Estos cambios ocurren y deben estudiarse más a fondo a nivel intraespecífico ya que con los análisis filogenéticos, a nivel de especie, no se ha esclarecido con certeza cuáles son los caracteres que favorecen las transiciones hacia el dioicismo en las angiospermas (Spigler y Ashman, 2011; Vamosi *et al.*, 2003).

El ginodioicismo ha evolucionado de manera independiente entre aproximadamente el 0.4% y 2% de las especies de angiospermas y se considera una ruta evolutiva importante hacia el dioicismo (Spigler y Ashman, 2011). En estas poblaciones, debido a que las hembras no producen polen deben recibirlo de las plantas hermafroditas, mientras que estas pueden autofecundarse o recibir el polen de otras hermafroditas. Además, en estas poblaciones la expresión fenotípica de la esterilidad masculina también puede manifestarse de distintas maneras, por ejemplo, las flores femeninas pueden tener órganos masculinos aparentemente bien desarrollados, reminiscentes (filamentos cortos y/o anteras contraídas) o totalmente

ausentes. Otra característica es que las flores femeninas en estas poblaciones suelen ser más pequeñas que las flores hermafroditas (Cuevas García y Abarca García, 2006)

1.5 La antesis floral y los polinizadores como parte fundamental en la reproducción de las angiospermas

La antesis es el periodo en el que una flor permanece abierta y oferta sus estructuras para la fertilización. En el inicio de la antesis los tépalos están visibles, pero parcialmente cerrados, lo cual no permite que sean visibles los verticilos reproductivos. Generalmente, las plantas florecen una vez al año o en algunas especies más de una vez durante el año. Durante este periodo existe un pico o momento en el cual producen el mayor número de flores (Griffin, 1980). Las flores fertilizadas pueden presentar un menor tiempo de apertura con respecto a las no fertilizadas (Meagher y Delph, 2001). Debido a que las plantas dependen de agentes externos que actúen como vectores de polen entre los individuos, la eficiencia reproductiva de la planta dependerá en gran parte de la correcta sincronización entre el tiempo de apertura floral, la receptividad de los órganos reproductivos y la disponibilidad de polinizadores (Badano y Schlumpberger, 2001).

Por otra parte, la radiación de las angiospermas se debió en gran parte a la coevolución con otras especies, que interactúan entre sí (Ehrlich y Raven, 1964). La conducta de los polinizadores moldea en gran medida la diversidad de los sistemas sexuales, el flujo genético entre poblaciones y su morfología floral (Chittka *et al.*, 1999; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Recientemente se han propuesto análisis cuyo propósito es describir las interacciones entre especies por medio de redes, las cuales describen a las interacciones mutualistas como la polinización (Bascompte *et al.*, 2003; Bastolla *et al.*, 2009; Rezende *et al.*, 2007). El patrón más conocido entre las redes mutualistas de plantas e insectos es la anidación, donde hay especies que interactúan con varias especies (generalistas) y especies que interactúan con pocas especies (especialistas; Bascompte *et al.*, 2003). Se ha visto que existen especies sumamente importantes

(hubs) que, si llegan a faltar, pueden desencadenar la extinción de otras (Anderson *et al.* 2011; Galletti y Dirzo, 2013; Rezende *et al.*, 2007).

Los visitantes florales que se asocian con mayor frecuencia a las cactáceas son principalmente las abejas e inclusive se consideran los polinizadores efectivos para muchas especies (Mandujano *et al.*, 1996; Oaxaca-Villa *et al.*, 2006). Los murciélagos son importantes para los cactus columnares (Valiente-Banuet *et al.*, 1996) y en algunos casos, los polinizadores pueden ser los colibríes (Nassar y Ramírez, 2004). Ciertas especies de escarabajos también pueden promover la autopolinización (del Castillo y González-Espinosa, 1988).

1.6 El néctar como recompensa floral

El polen y el néctar son las principales recompensas florales que ofrecen las plantas para propiciar las visitas de los animales. Dichas recompensas sirven como moneda de cambio para adquirir sus servicios como agentes de polinización (Simpson y Neff, 1983; Cruden, 2000). Las recompensas no nutritivas (como las resinas, las ceras y los tejidos que sirven como refugios y lugares de descanso) consisten en materiales que producen las plantas para interactuar con otras especies (Simpson y Neff, 1983).

El néctar es una mezcla que se secreta por una glándula llamada “nectario” y cuyos componentes principales son azúcares. Los nectarios se encuentran principalmente en las flores, pero pueden presentarse en las partes vegetativas de las plantas (Galletti y Bernardello, 1992; Rico-Gray y Oliveira, 2007). Los componentes energéticos principales que conforman dicha mezcla son los monosacáridos fructosa y glucosa, y el disacárido sacarosa (Percival, 1961). La heterogeneidad en la distribución espacial y temporal, el volumen y la concentración del néctar, se han estudiado por su relación con la conducta de forrajeo óptimo (Pyke, 1978).

El néctar forma parte del sistema de reproducción sexual de las plantas, es un producto que se ofrece a modo de recompensa a un agente de forrajeo para ayudar a las plantas con su reproducción. Además, puede tener un papel importante en las interacciones planta-polinizador, reflejando la coevolución y las relaciones estrechas entre las plantas y sus polinizadores (Shapiro *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2013).

1.7 Los sistemas de apareamiento

Los sistemas de apareamiento influyen en las relaciones de parentesco entre el grano de polen y el óvulo que se fusionan para originar una semilla (Holsinger, 2000). Las polinizaciones se pueden dividir principalmente en autocruzas y entrecruzas. En la autocruza existe transferencia de polen al estigma de la misma flor o de una flor que pertenezca al mismo genet, mientras que en la entrecruza existe transferencia de polen de una flor al estigma de otra que pertenece a un genet diferente (Barrett y Harder, 2006).

Es importante estimar experimentalmente la cantidad y la calidad del polen porque cuando éste es de baja calidad, o llega muy poco o nada de polen al estigma, es posible que disminuya significativamente el éxito reproductivo de la planta, ya que puede haber muy poca cantidad de semillas o éstas podrían no ser de buena calidad o viables como para generar plántulas, a lo que se le conoce como limitación de polen (Ashman et al., 2004).

Por lo general, la limitación de polen ocurre cuando las plantas reciben menor cantidad de granos de polen de la que se necesita para fertilizar todos los óvulos. Como consecuencia, producen menor cantidad de frutos o de semillas, en comparación a las que producirían si tuvieran un aporte de polen suficiente. Adicionalmente, una polinización inadecuada afecta a las plantas a nivel poblacional, lo que tiene repercusiones en su abundancia y en el mantenimiento de los individuos dentro de la comunidad vegetal. La limitación por polen puede evolutivamente originar modificaciones en los rasgos florales y en el sistema de apareamiento de las plantas (Knight *et al.*, 2005). Un ejemplo es cuando los polinizadores no discriminan entre el tipo, ni en la cantidad de polen que transportan de una flor a otra. Además, es muy frecuente que las flores reciban polen interespecífico, lo cual puede afectar el desempeño de la flor después de la polinización y originar hibridaciones, un fenómeno muy común en las cactáceas (Aizen y Harder, 2007).

El sistema de apareamiento mixto, es decir, que combina las características de la autocruza y la entrecruza es muy frecuente en las cactáceas y las especies que poseen este sistema promueven la recombinación al mismo tiempo que aseguran la

reproducción (Camacho-Velázquez *et al.*, 2016). Algunos ejemplos de especies con sistema de apareamiento mixto son *Opuntia macrocentra*, *Opuntia rastrera*, *Lophophora diffusa* y *Polaskia chende* (Mandujano *et al.*, 1996; Mandujano *et al.*, 2013; Cruz y Casas, 2002; Briseño, 2016). También existen cactáceas cuyo sistema de apareamiento es la entrecruza (xenogamia) estricta como en el caso de *Ariocarpus fissuratus*, *Escontria chiotilla* y *Opuntia cantabrigensis* (Oaxaca-Villa *et al.*, 2006; Martínez-Peralta *et al.*, 2014; Hernández, 2016).

Los sistemas de apareamiento generalmente se describen utilizando marcadores genéticos, pero una manera sencilla de aproximarse a su descripción es el cociente de polen/óvulos (P/O) propuesto por Cruden (1977). Este cociente toma en cuenta la relación que existe en la producción de estos dos caracteres. Cruden (1977) encontró un patrón donde las plantas con bajo P/O presentan autocruza, y las que tienen un valor alto en el cociente de polen/óvulos son plantas cuyo sistema de apareamiento tiende a favorecer la entrecruza (Tabla 1).

Tabla 1. El cociente entre el número de granos de polen y óvulos (cociente P/O) refleja el sistema de apareamiento (Cruden, 1977).

Tipo de sistema de apareamiento	Cociente P/O (promedio y SE)	Log del cociente P/O (promedio y SE)
Cleistogamia	4.7 ± 0.7	0.65 ± 0.07
Autogamia obligada	27.7 ± 3.1	1.43 ± 0.05
Autogamia facultativa	168.5 ± 22.1	2.15 ± 0.06
Xenogamia facultativa	796.6 ± 87.7	2.81 ± 0.05
Xenogamia obligada	5859.2 ± 936.5	3.65 ± 0.06

1.8 Características ambientales y fisiológicas para la germinación en las cactáceas

Para que una semilla cumpla sus funciones, es necesario que el embrión germine y se transforme en una plántula, la cual pueda subsistir por sí misma y posteriormente se transforme en una planta adulta. Por otra parte, las semillas de muchas especies pueden experimentar un periodo llamado latencia o dormancia en el cual no germinarán hasta que tengan las condiciones adecuadas que dependen de las

necesidades y de las historias de vida específicas de cada especie (Mandujano *et al.*, 1997; Doria, 2010).

La latencia ocurre cuando la semilla es viable y capaz de germinar, sin embargo, las condiciones ambientales en las que ésta se encuentra no son propicias para que ocurra la germinación (por ejemplo, no haya suficiente agua o no se cumplan los requerimientos de luz y temperatura; Mandujano *et al.*, 1997; Doria, 2010). Por otra parte, la dormancia se presenta cuando las condiciones ambientales son adecuadas, pero la semilla no puede germinar por circunstancias fisiológicas internas. Una de las causas más frecuentes de la dormancia es la existencia de inhibidores de la germinación en la semilla (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000).

Las características fisiológicas que debe reunir la semilla para que ocurra la germinación son: a) el embrión debe estar vivo y ser viable para germinar, b) la semilla debe estar madura y c) la testa de la semilla debe permitir el paso de agua y oxígeno (de la Cuadra, 1993). Además, existen cactáceas con altas tasas de depredación, como *Opuntia rastrera* la cual supera el 90% de las semillas en menos de un mes. En el caso de los frutos de la cactácea cilíndrica *Melocactus violaceus*, estos son consumidos por las lagartijas *Tropidurus torquatus* y el proceso de germinación comienza cuando las semillas pasan a través del tracto digestivo de las lagartijas. Esto se probó ya que las semillas defecadas por las lagartijas germinaron rápidamente en condiciones de laboratorio, mientras que las semillas recogidas directamente de los frutos maduros no germinaron bajo las mismas condiciones. Esta interacción podría ser una adaptación para la dispersión de semillas en esta cactácea (Cortes Figueira *et al.*, 1994). Algunas de las semillas que son tragadas también interactúan con microorganismos para desencadenar los procesos subsecuentes de maduración y germinación de las semillas (Rojas-Aréchiga y Batis, 2001).

La viabilidad en las semillas de las cactáceas es muy variable entre especies y también puede tener relación con el tiempo que se conservan las semillas fuera del fruto. Por ejemplo, en *Opuntia joconostle*, *O. stricta* y *O. máxima* la viabilidad de las semillas varía entre 94% y 97% y en el caso de *O. stricta* las semillas conservan la capacidad de germinar hasta por 15 años (Reyes-Agüero *et al.*, 2006). También es variable el tiempo que pueden almacenarse las semillas y continuar siendo viables

después de colectarse; por ejemplo, las semillas de *O. leucotricha* pueden almacenarse hasta 14 meses, las de *O. stricta* aún son viables si se almacenan durante un año (Reyes-Agüero *et al.*, 2006). Se ha reportado en *O. rastrera* que sus semillas no germinan durante el año en que se colectaron, aun cuando 80% de éstas sean viables, pero las que se colectaron de heces de animales después de un año o dos de separarse del fruto, son capaces de germinar con una tasa de germinación de 37.8% después del primer año de almacenamiento y 57% después del segundo año en que se colectaron (Reyes-Agüero *et al.*, 2006). En otros tipos de cactáceas también existen diferentes periodos de viabilidad en sus semillas, por ejemplo, las semillas de *Stenocereus griseus* pueden permanecer en el suelo durante 4 meses con la capacidad de germinar (Silvius, 1995). En algunas especies de mamilarias, las semillas pueden permanecer dentro de la planta por más de 1 año antes de germinar, en el caso de *Mammillaria napina* el 70 % de sus semillas permanecen viables después de 8 años (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2006).

El presente trabajo tiene la finalidad de estudiar los sistemas de apareamiento de *Opuntia robusta* Wendl en dos ambientes muy cercanos geográficamente, pero muy contrastantes entre sí (Bosque de Pino-Encino y Matorral Xerófilo). También, se realizó un análisis de la producción de néctar como recompensa floral entre las poblaciones de Hidalgo y la del Jardín Botánico de Cadereyta de Montes, Querétaro, con la finalidad de contrastar una población dioica contra individuos hermafroditas. Por último, se quiere saber si los sistemas de apareamiento y la producción de néctar como recompensa floral son parte de procesos evolutivos que pueden conducir a la transición entre el hermafroditismo y el dioicismo.

2. OBJETIVOS GENERALES

1. Describir la biología reproductiva de *Opuntia robusta* en las poblaciones San Nicolás Tecocoaco y Matías Rodríguez de Hidalgo.
2. Evaluar si existen diferencias en la producción de néctar como recompensa floral entre los diferentes sexos (hermafroditas, machos y hembras) en las poblaciones de *O. robusta* en San Nicolás Tecocoaco, Matías Rodríguez y en el Jardín Botánico Regional de Cadereyta, y su posible relación con los visitantes florales.

2.1 Objetivos particulares

1. Cuantificar la cantidad de óvulos y granos de polen de las plantas hermafroditas en las poblaciones de *Opuntia robusta* en San Nicolás Tecocoaco y Matías Rodríguez, y comparar estos resultados con los obtenidos por del Castillo y Trujillo- Argüeta (2009) para las plantas hermafroditas en la población trioica de Santa Rosa, San Luis Potosí.
2. Evaluar la dinámica de producción de néctar (hora del día y entre diferentes días) en las poblaciones de Hidalgo y en la población de Querétaro.
3. Realizar un análisis comparativo del néctar de *O. robusta* como recompensa floral (volumen, concentración de azúcares y contenido energético) en las tres poblaciones y entre los diferentes sexos.
4. Identificar a los visitantes florales, registrar su comportamiento en las flores de *O. robusta*, e identificar al polinizador efectivo para las poblaciones de Hidalgo.
5. Determinar el sistema de apareamiento de *O. robusta* en las poblaciones de Hidalgo por medio del cociente polen/óvulos (Cruden, 1977).
6. Evaluar el sistema de apareamiento en las poblaciones de *O. robusta* en Hidalgo mediante experimentos de polinizaciones controladas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción de la especie

Opuntia robusta (Opuntioideae: Cactaceae) es una cactácea endémica del centro de México (Bravo-Hollis, 1978), la cual se reproduce clonalmente y por la vía sexual. Esta especie hibrida con frecuencia con *Opuntia streptacantha*, *O. hypthiacantha* y *O. cantrabrigiensis* (Bravo-Hollis, 1978; Trujillo–Argueta y González–Espinosa, 1991). De estas especies en solo de dos de ellas se sabe que son octaploides, *Opuntia streptacantha*, *O. hypthiacantha*. Las especies con las que está emparentada *O. robusta* son *Opuntia carstenii* y *O. depressa*, las cuales también son un grupo octaploide (Majure *et al.* 2012). Mientras que no tenemos certeza de cuál es la ploidía de *O. robusta*, ya que se tienen registros de que podría ser diploide o tetraploide (Segura *et al.* 2007).

Opuntia robusta es una planta arbustiva, muy ramificada, de 1 a 2 metros de altura, con ramas de 1.5 metros de largo y constituidas por artículos orbiculares, oblongos u obovados de 15 a más de 50 cm de longitud, los cuales son muy gruesos presentando un ancho de 1.5 a 2.5 cm. Generalmente son de color verde azulado claro o glauco. Sus areolas presentan espinas amarillas en conjuntos que van de 2 a más de 12 y en algunos casos tienen base castaña o amarillenta (Janczur *et al.*, 2014). Los frutos de *O. robusta* son carnosos, de color rojo a púrpura de 4 a 8 cm de longitud, globosos o elípticos, tienen areolas con abundantes glóquidas amarillas grandes, y gran cantidad de semillas con forma redondeada, testa dura y color café oscuro (Figura 3; Bravo-Hollis, 1978).

Las flores son diurnas, grandes, amarillas, de 5 a 7 cm de longitud y en el centro cuentan con lóbulos del estigma verdes (Bravo-Hollis, 1978). Las flores masculinas tienen un estilo largo, estigma y ovario atrofiados. Las flores femeninas presentan anteras atrofiadas, blancas y vacías, un estilo corto, un estigma lobular bien desarrollado y un ovario unilocular con sus cámaras completamente cubiertas con óvulos de tamaño variable (del Castillo y González-Espinoza, 1988). El tamaño del estilo de las flores hermafroditas es intermedio entre el estilo largo de las flores masculinas y el estilo corto de las flores femeninas. El ovario es similar al de las flores

femeninas. Las anteras están bien desarrolladas, similares a las de las flores masculinas (Figura 3), son tetraloculares y de color amarillo por la gran cantidad de polen que poseen (del Castillo y González-Espinoza, 1988).

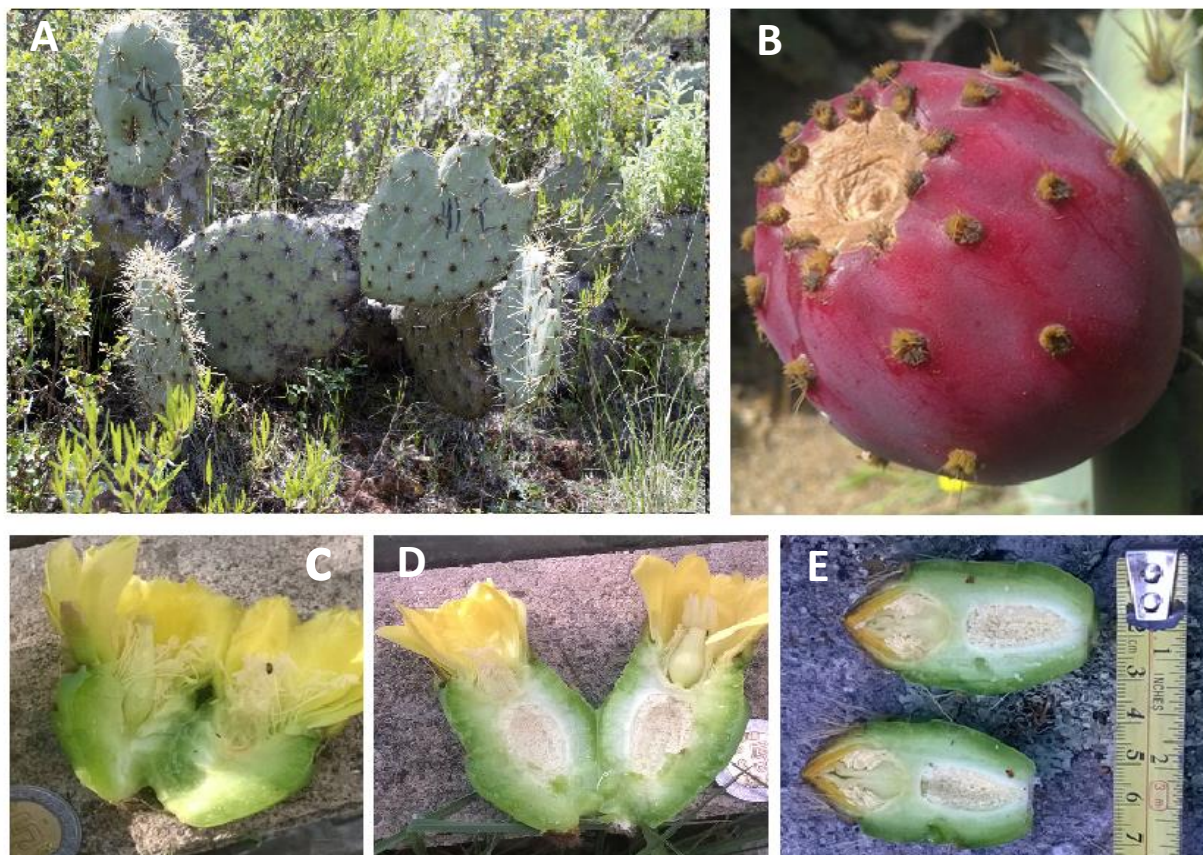


Figura. 3. Morfología de las flores y frutos de *Opuntia robusta*. A) Planta de *O. robusta* con flor y brotes reproductivos. B) Fruto de color rojo a púrpura con abundantes glóquidas en sus areolas. C) Flor con morfo sexual masculino; se observa el estigma reducido, las anteras bien desarrolladas y el ovario atrofiado. D) Flor con morfo sexual femenino; se aprecia el estigma bien desarrollado con varios lóbulos bien definidos, anteras reducidas y ovario grande con gran cantidad de óvulos de tamaño variable en su interior. E) Brote reproductivo con morfo sexual hermafrodita; se observa el estigma bien desarrollado con lóbulos bien definidos, anteras grandes y ovario con abundantes óvulos de tamaño variable en su interior. A, B y E corresponden a la población Matías Rodríguez, Hidalgo, mientras que C y D corresponden a una población dentro del parque Tangamanga en la ciudad de San Luis Potosí. Fotos: Miranda-Pérez, A., Mendoza-Reyes, C., Sandoval-Molina, M.

En esta especie se han observado poblaciones con diferentes proporciones sexuales. Por ejemplo: las poblaciones de la Sierra Fría (Aguascalientes), Cerro del Chivo y Rancho El Carrizal, cerca del Río Grande (Zacatecas) son hermafroditas; las localidades en la Sierra San Miguelito, Villa de Arriaga (San Luis Potosí) y de Huayacocotla (Veracruz) son dioicas, mientras que las poblaciones en Santa Rosa y Tecomate (San Luis Potosí) y las cercanas a la Sierra de los Pinos (Zacatecas) son trioicas (Rodríguez-Zapata, 1981).

Las abejas principalmente polinizan a *O. robusta*, el principal polinizador reportado es la especie es *Diadasia rinconis* (Mandujano *et al.*, 1996; Oaxaca-Villa *et al.*, 2006; Sánchez–Echeverría *et al.*, 2017). Además, se ha descrito la presencia de nectarios extraflorales en *O. robusta* e interacciones ecológicas con diferentes especies de hormigas (*Liometopum apiculatum*, *Camponotus atriceps*, *Camponotus andrei* y *Formica altipetens*) las cuales se alimentan del néctar extrafloral que produce esta planta (Sandoval-Molina *et al.*, 2018; Sandoval-Molina, 2019).

La población de *O. robusta* en Santa Rosa, SLP posee un sistema de apareamiento mixto (del Castillo y Trujillo- Argüeta, 2009). El sistema de apareamiento mixto quiere decir que las plantas pueden autopolinizarse o presentar xenogamia ya que poseen individuos hermafroditas, machos y hembras. Esta especie no presenta autoincompatibilidad y puede autopolinizarse, además hibridaría con otras especies del género, como *O. streptacantha* (Trujillo–Argueta y González–Espinosa, 1991) la cual es una especie octaploide (Segura *et al.* 2007). También se sabe que en las plantas de *O. robusta* los cladodios que caen al suelo producen raíces y posteriormente dan lugar una planta nueva, esta planta será genéticamente idéntica a la planta madre de la que derivó el cladodio (*Observación personal del Dr. Rafael del Castillo*). Este tipo de reproducción es común en el género *Opuntia* (Piña *et al.*, 2007).

A *Opuntia robusta*, también se le conoce como nopal tapón, camueso o cardón y tuna taponá (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Este nopal tiene diversos usos, por ejemplo, en la construcción de cercas “vivas”, forraje para el ganado caprino, bovino y ovino en épocas de sequía extrema o cuando no existen fuentes de alimento alternas (Majure *et al.*, 2012). El mucílago se puede utilizar en la fabricación de pinturas similares a las vinílicas. También se siembran junto con piedras para fijar el suelo y así

evitar la erosión (Alanís-Flores y Velazco-Macías, 2008). En el ámbito culinario *O. robusta* tiene diversos usos. El fruto conocido como tuna es poco dulce pero grande, de sabor agradable y aunque tiene gran cantidad de semillas es apreciado para consumo humano. Los cladodios jóvenes son degustados como verdura (se les conoce comúnmente como “nopalitos”; Alanís-Flores y Velazco-Macías, 2008), y los cladodios maduros, una vez que se les ha separado la epidermis y/o cutícula, también son fuente de alimento y se emplean para la fabricación de mayonesa, dulces, mermeladas, jaleas, caramelos masticables, jarabes, jugos y fermentados para producción de bebidas alcohólicas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Ángeles-Martínez *et al.*, 2007; Romero-López *et al.*, 2006).

3.2 Descripción de las zonas de estudio

El municipio de Singuilucan se localiza en el Estado de Hidalgo. Su vegetación es muy variada e incluye bosques de pino, de encino, de sabinos, además de bosques mixtos de pino-encino y encino-pino, pastizales, matorrales, nopaleras y chaparrales; esta variación en la composición vegetal de la zona se debe principalmente a la topografía y a los diferentes climas que presenta la región, los cuáles son: semiseco templado, templado subhúmedo con lluvias en verano y semifrío subhúmedo con abundantes lluvias en verano (Ávila Ramírez, 2006; INEGI, 1992; Tabla 2).

El municipio de Cadereyta de Montes pertenece a la provincia florística Queretana-Hidalguense (Rzedowski, 2006). La vegetación es de tipo matorral xerófilo (Zamudio, 1984; Rzedowski, 2006) y su clima es semicálido templado (Villers-Ruiz y Trejo-Vázquez, 2000; Tabla 2).

Las zonas de estudio comprendieron dos poblaciones en el municipio de Singuilucan, en el estado de Hidalgo y una población en el Jardín Botánico Regional de Cadereyta (en adelante JBRC), en el municipio de Cadereyta de Montes, Querétaro (Figura 4).

Tabla 2. Coordenadas geográficas y vegetación asociada de las poblaciones de *Opuntia robusta* incluidas en este estudio.

	Matías Rodríguez (MR)	San Nicolás Tecoaco (SNT)	Cadereyta de Montes
Estado	Hidalgo	Hidalgo	Querétaro
Latitud	20°2'05.56"N	20°2'38.2"N	20°41'15.8"N
Longitud	98°31'54.95"W	98°35'16"W	99°48'17.7"W
Altitud (ms. n. m.)	2573	2600	2046
Precipitación media anual (mm)	De 50 a 150	De 50 a 150	De 400 a 450
Temperatura (°C)	De 18 a 22	De 18 a 22	De 16 a 18
Vegetación	Bosque de Pino-Encino	Matorral xerófito	Matorral xerófito

Los datos del clima para las poblaciones MR y SNT se tomaron de la información disponible en línea sobre el municipio de Singuilucan, Hidalgo en: <https://es.weatherspark.com/y/6606/Clima-promedio-en-Singuilucan-México-durante-todo-el-año>. Los datos del clima para la población de Cadereyta de Montes se tomaron de la página oficial del Jardín Botánico en: <http://www.concyteq.edu.mx/JB/inicio.html>

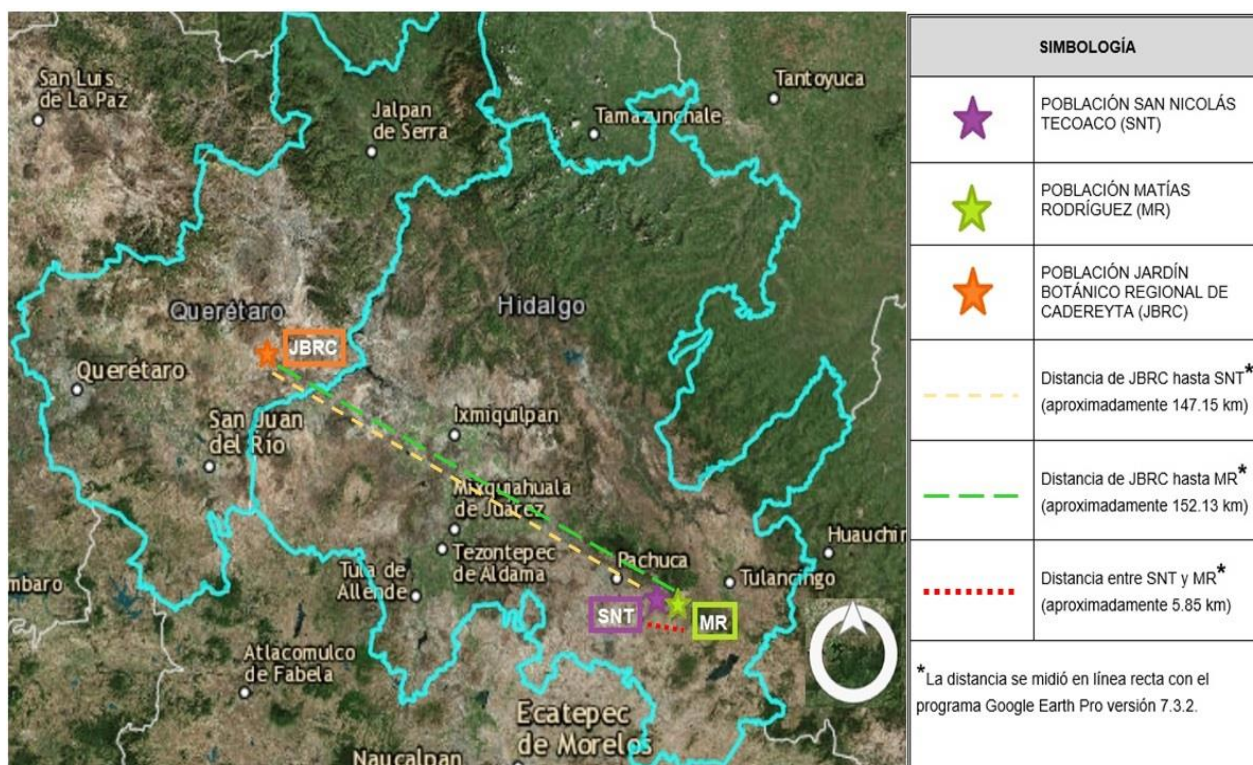


Figura 4. Localización de las poblaciones de *Opuntia robusta* que se utilizaron en este trabajo. Se muestra la localización de las tres poblaciones (SNT, MR y JBRC) en los estados de Hidalgo y Querétaro respectivamente. El mapa se realizó por Miranda Pérez, A. y Mendoza Reyes, C. con el programa ARCGIS Pro, 2018.

La primera población se localiza en la localidad de San Nicolás Tecoco (en adelante SNT), una zona semiárida con vegetación representativa de matorral xerófilo, donde es posible encontrar *Agave spp.*, *Yucca spp.*, *Mammillaria magnimamma*, plantas del género *Tillandsia*, *Coryphantha spp.*, y otras especies de *Opuntia*, entre las cuales se ha identificado a *O. streptacantha*, *O. spinulifera*, *O. megacantha* y *O. engelmannii*, las cuales coexisten y posiblemente hibridan con *O. robusta* (Trujillo–Argueta y González–Espinosa 1991). La población SNT se describió como ginodioica para *O. robusta* en trabajos previos (Janczur *et al.*, 2014) pero en los muestreos sucesivos que se realizaron desde principios del 2015 y durante el 2016 no se encontraron individuos femeninos en esta población, por lo tanto, solamente se pudieron estudiar individuos hermafroditas. En esta población también se utilizó un menor número de plantas ya que en el año 2015 cuando comenzaba la temporada de floración ocurrieron fuertes granizadas, las cuales afectaron la supervivencia de los brotes florales.

La segunda población se encuentra en la localidad de Matías Rodríguez (en adelante MR). En esta población el tipo de vegetación es bosque de pino-encino y la única especie de cactácea que se identificó durante el trabajo de campo fue *Opuntia robusta*. La población MR se compone únicamente de individuos hermafroditas.

3.3 Elección, marcado y determinación del sexo de las plantas

En las tres poblaciones se seleccionaron individuos con brotes reproductivos visibles los cuales durante todo el periodo de floración (mediados de abril hasta finales de junio de 2015 para las poblaciones del estado de Hidalgo y marzo de 2017 para la población de Cadereyta) se marcaron con un plumón indeleble (Figura 3A) y geoposicionados con un GPS (Garmin modelo eTrex 10), a cada individuo se le asignó un número consecutivo. Durante la elección de las plantas se cuidó que éstas no se encontraran muy cercanas unas de otras (de 5 a 10 metros o más de distancia entre cada individuo) con la finalidad de que no pertenecieran al mismo genet, es decir, que fueran individuos genéticamente diferentes.

El sexo de los individuos de las poblaciones MR y SNT se determinó preliminarmente mediante la inspección visual de las flores durante la antesis, de

acuerdo con la descripción realizada por del Castillo y González-Espinosa (1988). Se observó si las anteras se encontraban bien desarrolladas y de color amarillo o más bien atrofiadas, reducidas y blanquecinas por ausencia de polen, en este caso se trataría de una planta de sexo femenino. Por otra parte, cuando se encontraron las anteras desarrolladas y de color amarillo se buscó que los lóbulos del estigma fueran más de 10 y que estuvieran desarrollados; si cumplían con estas dos características se consideró que los individuos eran hermafroditas. Los sexos de las plantas de la población dioica del Jardín Botánico Regional de Cadereyta fueron determinados por la Dra. María del Carmen Mandujano del Instituto de Ecología, UNAM y corroborados con los caracteres específicos que se mencionaron anteriormente para cada sexo.

Posteriormente, en el laboratorio se hicieron observaciones más precisas con la finalidad de determinar y corroborar el sexo de las plantas de Hidalgo; para ello se utilizó un brote floral colectado en campo, correspondiente a cada planta. Dichos brotes se guardaron en alcohol al 70% para su preservación. Las medidas y los datos que se tomaron de estos brotes reproductivos se describen más adelante.

3.4 Determinación del sistema reproductivo de *Opuntia robusta*

Para determinar el sistema reproductivo en las dos poblaciones de *O. robusta* estudiadas en el estado de Hidalgo se tomaron diversas medidas y observaciones de las flores, *in situ* y en el laboratorio. Por ejemplo, debido a que la observación de las anteras es sencilla con la ayuda de una lupa, se registró el momento en que las anteras estuvieron dehiscentes (cuando tuvieron aspecto granuloso producto de la liberación de polen) y se observó si existía la presencia de polen en el perianto de la flor (Figura 4, A, B y C).

También se registró el momento en el que el estigma de las flores observadas estuvo receptivo para aceptar el polen. El estigma de las flores se consideró receptivo según el grado de apertura de sus lóbulos y el recubrimiento de mucílago o viscosidad de éste. Se consideró que el estigma no estaba receptivo cuando los lóbulos estaban totalmente cerrados y no existía presencia de mucílago o viscosidad en su interior

(Figura 4 B y C). Estas observaciones fueron importantes para evaluar la posible existencia de dicogamia *in situ* en las flores.

En las poblaciones de *O. robusta* en Hidalgo se colectaron brotes florales maduros a punto de realizar la antesis (68 plantas de la población MR y 20 plantas de la población SNT). Estos brotes se colocaron en un frasco con alcohol al 70% para conservarlos. En el laboratorio, a cada brote se le realizó un corte longitudinal para dejar expuestas sus estructuras reproductivas. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica modelo MZ 125 objetivo 3X), se contabilizó el número total de anteras y el número total de óvulos dentro del ovario (Figura 4 D y E).

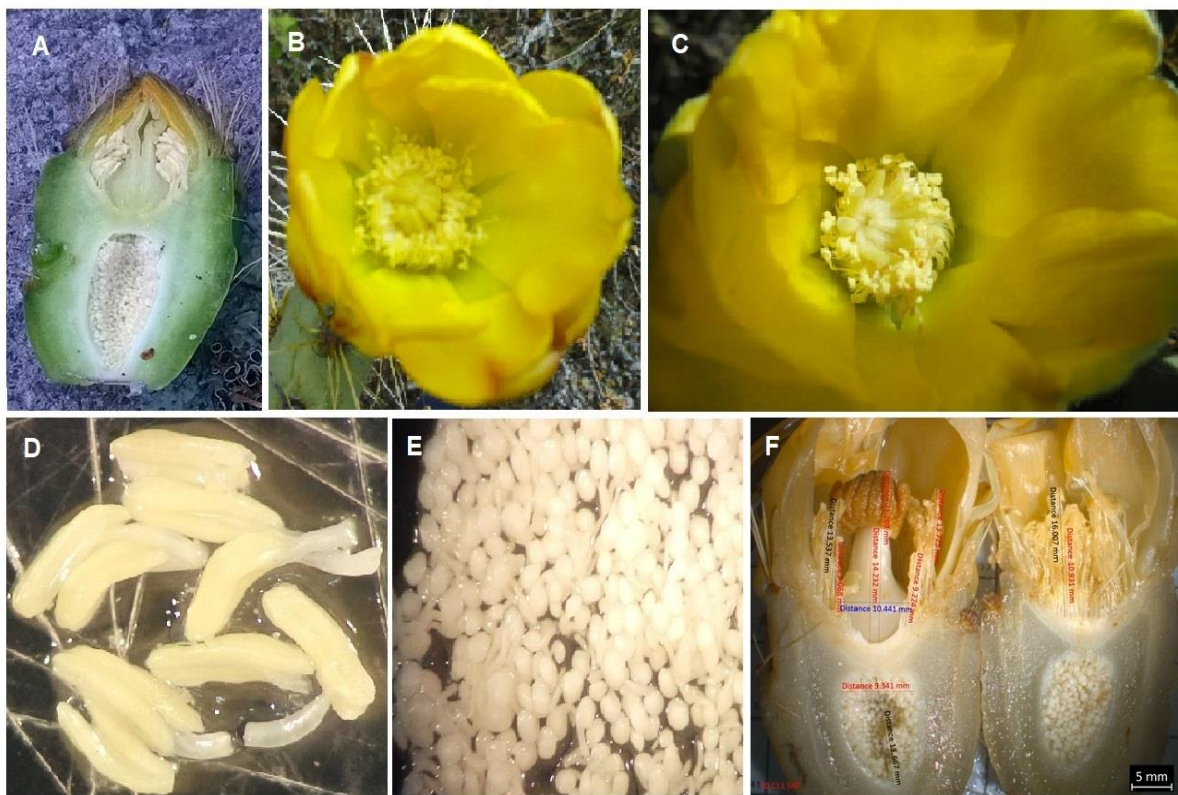


Figura 5. Atributos florales para determinar el sistema reproductivo de *Opuntia robusta*.

A) Corte longitudinal del brote floral antes de la dehiscencia de las anteras y de la receptividad del estigma, también pueden apreciarse los óvulos en el interior del ovario. B) Flor con anteras dehiscentes y estigma aún no receptivo. C) Flor donde se observa la dehiscencia de las anteras y el estigma receptivo. D) y E) Imágenes de las anteras y los óvulos obtenidos de las flores preservadas, microscopio estereoscópico objetivo 3X. y F) Brote floral y características morfológicas que se midieron de las flores preservadas en alcohol al 70%.

Del mismo brote floral se extrajeron dos anteras que no estuvieran dehiscentes y cada antera se almacenó en un tubo Eppendorf abierto. Dichos tubos se rotularon para identificar a cada individuo, se colocaron en una gradilla y se introdujeron en una bolsa Ziploc la cual se cerró herméticamente durante 12 horas. La bolsa Ziploc en la que se introdujeron los tubos contenía arena sílica gel para absorber la humedad de las anteras, evitar la aparición de hongos y almacenar los granos de polen hasta que pudieran contarse (Kearns e Inouye, 1993).

En el laboratorio se contó el número de granos de polen de cada antera que fue preservada dentro de los tubos Eppendorf. Cada antera se extrajo cuidadosamente con unas pinzas entomológicas, se colocó en un portaobjetos con un acetato cuadrado (1 x 1 mm) en la parte de abajo, para emular una cámara de Neubauer. A cada antera se le agregó 1 ml de agua destilada y se presionó con un agitador de vidrio para liberar los granos de polen de su interior. En caso de que no fuera posible sacar la antera del interior del tubo, se agregó 1 ml de agua destilada y el tubo se sometió a vibración con un Vortex, lo que permitió la liberación de los granos de polen. Posteriormente el contenido del tubo se vertió en el portaobjetos. Cuando los granos de polen estuvieron aglutinados y no era posible contarlos, se les agregó una solución de etanol al 70% para separarlos.

Para estimar el número de granos de polen por flor se contaron los granos de polen en dos anteras por cada brote floral y posteriormente se multiplicó el número de granos de polen promedio que se obtuvo de las dos anteras, por el número total de anteras de la flor.

Se tomaron fotografías de cada brote floral conservado en alcohol al 70% con un microscopio Carl Zeiss y una cámara digital de microscopía modelo AxioCam ICc 5 (Figura 4F). Las fotografías se calibraron con una regla digital en milímetros. En cada flor se midió la longitud total de los estambres, el largo y el ancho de la cavidad del ovario para calcular su área, ya que las flores femeninas y hermafroditas presentan una cavidad más grande que las flores masculinas (del Castillo, 1986), la longitud total del estilo con el estigma y el ancho del estilo, asimismo se contó el número de lóbulos del estigma (Figura 4F). Estos datos se utilizaron para determinar las características

morfológicas de los individuos, evaluar la presencia de heterostilia u homostilia, y probar si existen diferencias morfológicas florales entre las poblaciones.

3.5 Antesis floral de *Opuntia robusta* en las poblaciones de Hidalgo

Con la finalidad de conocer todo el desarrollo floral de *O. robusta* y su posible variación entre las poblaciones MR y SNT, se cubrieron brotes florales (MR = 124 brotes y SNT = 41 brotes) con bolsas de papel encerado (glassine). Dichas bolsas se horadaron con un alfiler y se sujetaron en la base de la yema floral con un clip una semana antes de la apertura de la flor. El día en que emergieron los tépalos, pero no abrió el perianto completo se consideró como día 0, el primer día en que abrió el perianto completo se consideró como día 1 y así sucesivamente (día 2, día 3) durante los días en los que la flor permaneció turgente y hubo apertura floral.

Los brotes florales que fueron embolsados se revisaron diariamente y con un vernier electrónico se registró la medida de la apertura floral a diferentes horas durante todos los días de vida de la flor. También se registró el primer día de apertura floral, si las flores volvieron a abrir en días sucesivos y cuántos días abrieron, las horas desde que la flor abrió hasta que cerró, el punto máximo de apertura del perianto, el pico y el término de la floración (considerados como el momento en el que floreció la mayor y la menor cantidad de las flores respectivamente) por planta y por población (Cruden, 1977; Dafni, 1992).

3.6 Registro de los polinizadores y colecta de datos del néctar como recompensa floral

En los estudios de biología floral, es importante registrar el comportamiento de los visitantes florales y tomar en cuenta el tipo de polinizador, su conducta y el tiempo que invierte en ella (Altmann, 1974).

Las conductas de los visitantes florales que se registraron fueron las siguientes: el forrajeo de recompensas florales (néctar o polen), si hubo contacto con el estigma, o la simple visita a la flor. En las poblaciones MR y SNT las observaciones se realizaron

en las plantas a las que se les midió la apertura floral y que estuvieron lo suficientemente alejadas entre sí (al menos 50 metros de distancia), para tener una muestra al azar y representativa de la población de los visitantes florales. En promedio, los registros tuvieron una duración de 2 minutos y medio en cada planta.

Con una cámara digital (Sony Dsc-w70 de 7.2 Megapíxeles), se realizaron grabaciones en algunas plantas. Estas grabaciones se realizaron durante el tiempo en el que estuvieron activos los visitantes florales (de 0900 a 1500) horas en que la actividad de los visitantes florales inició y disminuyó, respectivamente. También se colectaron algunos ejemplares de los visitantes florales los cuales fueron conservados en alcohol al 70%. Las capturas se realizaron cuando los insectos se encontraban activos sobre la flor. Los ejemplares de abejas preservados para su identificación fueron fotografiados con un microscopio de cámara modelo AxioCam ICc5 y posteriormente fueron identificados por el Dr. Ismael Alejandro Hinojosa Díaz, especialista en sistemática del grupo Hymenoptera: Apoidea del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De las recompensas florales que *O. robusta* ofertó a sus visitantes florales (principalmente abejas), se estudió principalmente el néctar. El néctar se extrajo a partir de flores de las tres poblaciones que se estudiaron con la finalidad de medir la cantidad producida por cada flor. Para ello, se eligieron flores de plantas al azar las cuales fueron embolsadas con bolsas de papel encerado y se cerraron con un clip en la base de la flor para evitar que el néctar fuera extraído por los visitantes florales. La extracción del néctar se realizó con jeringas para insulina y se almacenó en microtubos Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se mantuvieron congelados en un refrigerador convencional hasta que pudieron analizarse en el laboratorio.

Para la cuantificación del volumen del néctar, cada una de las muestras se sometió a centrifugación para purificarlas, ya que en algunas de ellas se observaban solutos en su interior (por ejemplo, polen) producto del momento en que se extrajo el néctar de la flor. Otra razón para centrifugarlas fue para que las gotas de néctar que se encontraban en las paredes del tubo se unieran y se mantuvieran como un líquido uniforme y fácil de manejar. Para este procedimiento se utilizó una centrífuga (Eppendorf 5415 C) durante 2 minutos a una velocidad de 14,000 revoluciones por

minuto. Al finalizar este procedimiento los sólidos se precipitaron en un pellet en el fondo del microtubo, lo que facilitó la extracción de la muestra del tubo. El volumen de cada muestra se cuantificó con la ayuda de micropipetas de 10 y 20 microlitros (μl). Siempre se cambió la punta de la micropipeta entre cada muestra para evitar que se contaminara.

La concentración de los azúcares del néctar se estimó al colocar 10 μl de cada muestra en un refractómetro (Atago MASTER), el cual mide los grados Brix de 0 a 33% de concentración de solutos. Debido a que el refractómetro funciona con la incidencia de la luz, todas las observaciones se realizaron en un laboratorio con iluminación adecuada. Para estimar el contenido energético de las muestras de néctar se utilizaron las lecturas en grados Brix que se obtuvieron con el refractómetro y el volumen en microlitros de cada muestra de néctar. Estos datos permitieron expresar dichos resultados en calorías. Primero se utilizó la siguiente ecuación para estimar los miligramos del disacárido sacarosa en la muestra:

$$\text{Miligramos de sacarosa en la muestra} = \frac{\text{grados Brix}}{100} \times \frac{\text{Volúmen de la muestra en } \mu\text{l}}{\text{Volúmen de la muestra en } \mu\text{l}} \times \frac{\text{Densidad de la sacarosa}}{\text{Densidad de la sacarosa}}$$

donde el valor estándar de la densidad de la sacarosa es de 1.59 g/cm^3 . Después para estimar el contenido energético, cada muestra se multiplicó por 4, ya que este es el valor de 1 mg de sacarosa equivalente en calorías (Dafni, 1992).

3.7 Evaluación del sistema de apareamiento de *Opuntia robusta* por medio de experimentos de polinización controlada

Para determinar el sistema de apareamiento de *O. robusta* se utilizaron los datos del número de granos de polen y el número de óvulos por brote floral que se obtuvieron con la técnica descrita anteriormente. Con estos datos se determinó el cociente polen/óvulos propuesto por Cruden (1977) en el cual se divide el promedio de granos de polen entre el promedio de óvulos de las plantas de cada población. Estos resultados se compararon con la Tabla 1, para determinar el sistema de apareamiento en las poblaciones MR y SNT. Para comprobar que se cumplen los sistemas de

apareamiento predichos por la hipótesis de Cruden (1977) se realizaron experimentos de polinización controlada.

Los experimentos de polinización controlada en las plantas de *O. robusta* se realizaron entre los meses de abril y julio del 2015 y solamente se utilizaron plantas hermafroditas debido a que, como ya se dijo anteriormente, no fue posible encontrar otros morfos florales en las flores de las plantas de las poblaciones en Hidalgo. De acuerdo con la metodología propuesta por Kearns e Inouye, (1993) el experimento de polinizaciones controladas consistió en cinco tratamientos y un grupo control. Al elegir una planta se le realizaron diferentes tratamientos al azar. Además, se trató de aplicar el mayor número de tratamientos a la misma planta, dependiendo del número de flores que tuviera disponible. Los tratamientos que se realizaron fueron:

- **Autopolinización automática:** Las flores se cubrieron con bolsas de papel encerado antes de la antesis. Las bolsas fueron horadadas con un alfiler y se cerraron con un clip en la base de la flor para aislarlas de los visitantes florales. Estas flores se dejaron embolsadas sin otro tipo de manipulación hasta que la flor cerró de manera natural.
- **Autopolinización manual:** En este tratamiento también se cubrieron las flores antes de la antesis para evitar algún tipo de manipulación de los visitantes florales. Posteriormente, durante la antesis se les cortaron las anteras a las flores. Luego con ayuda de un pincel y unas pinzas entomológicas se les depositó polen de la misma flor en el estigma receptivo (cuando los lóbulos del estigma estuvieron totalmente abiertos y había mucílago en su interior). Luego de aplicar el polen dentro del estigma, la flor se cubrió nuevamente con una bolsa nueva y limpia.
- **Entrecruza manual:** Antes de la apertura floral, en cada brote floral se aisló el estigma con un popote de plástico, se emasculó y se embolsó hasta que el estigma estuvo receptivo. Posteriormente, se hizo una mezcla con polen de 5 plantas diferentes, alejadas al menos 500 metros de la flor que se utilizó para este tratamiento. Esto se realizó con la finalidad de que el polen procediera de plantas de diferente genet. Cuando el estigma estuvo receptivo, la mezcla de polen se

depositó en el estigma con un pincel y la flor se cubrió con bolsas de papel encerado nuevas para evitar la contaminación del estigma con polen diferente de la mezcla que se describió previamente, o incluso polen de la misma flor.

- **Suplemento de polen:** Las flores de este tratamiento estuvieron expuestas a los visitantes florales durante todo su tiempo de vida, sin ningún tipo de aislamiento o manipulación, pero en el estigma receptivo se colocó una mezcla de polen de al menos 5 plantas diferentes, que estuvieron alejadas al menos 500 metros de la planta en la que se aplicó el tratamiento para evitar que fueran individuos del mismo genet. Este tratamiento se realizó con la finalidad de compararlo con el tratamiento control para evaluar la limitación de polen (Kearns e Inouye, 1993; Martínez-Peralta, 2007).
- **Apomixis:** A las flores se les cortaron manualmente las anteras y se les aisló el estigma antes de que maduraran. Este tratamiento se realizó para observar si las plantas de *O. robusta* en las poblaciones de Hidalgo tienen la posibilidad de producir semillas sin que el polen fecunde a los óvulos. Debido a la poca disponibilidad de flores para realizar experimentos en la población de San Nicolás Tecocoaco, las flores que se utilizaron para probar la existencia de apomixis fueron únicamente de la población Matías Rodríguez.
- **Control:** A este experimento también se le llama polinización abierta. A estas flores no se les aplicó ningún tratamiento en específico, es decir, las flores del tratamiento control abrieron normalmente y estuvieron expuestas a los visitantes florales sin ningún tipo de manipulación o aislamiento durante todo su tiempo de vida.

Durante el periodo de fructificación (de agosto hasta noviembre de 2015), se colectaron los frutos maduros de las flores a las que se les aplicó algún tratamiento de polinización controlada y al grupo control. Todos los frutos se midieron con un vernier digital (Mitutoyo) para estimar su volumen. Las variables que se midieron se definieron como: A = diámetro central, B = largo y C = altura.

El volumen de los frutos se estimó por medio de la siguiente ecuación para una elipse en revolución (Moreno, 2016):

$$V = \left(\frac{4}{3}\right) \pi X A X B X C$$

Posteriormente se contaron las semillas de todos los frutos colectados de cada tratamiento. El volumen del fruto y el número de semillas se utilizaron como variables para medir la efectividad de los tratamientos de polinización controlada.

3.8 Germinación de semillas de los frutos producidos mediante los experimentos de polinización controlada

Una vez colectados los frutos, las semillas se separaron de la pulpa mediante lavados sucesivos con abundante agua y friccionando las semillas dentro de una bolsa de tul. La eliminación del mucílago es importante para la preservación o el almacenamiento de las semillas, ya que de no eliminarse totalmente el mucílago se favorecería la aparición de hongos, los cuales degradarían la testa o incluso el embrión; además la aparición de hongos dificultaría de manera significativa la germinación de las semillas en el laboratorio (Dra. Mariana Rojas-Aréchiga, *comunicación personal*).

Las semillas limpias se esparcieron sobre toallas de papel absorbente y se almacenaron en un estante con buena ventilación de 2 a 3 días hasta que estuvieron completamente secas. Posteriormente se colocaron en bolsas de papel estraza y se rotularon con el nombre de cada brote floral, planta y población.

Para la germinación de las semillas solamente se consideraron las plantas que tuvieron el mayor número de tratamientos realizados. En la población SNT, se eligieron 65 frutos al azar y en la población MR se eligieron 89 frutos al azar correspondientes a 29 plantas en ambas poblaciones, en la mayoría de estos frutos se utilizaron 40 semillas por fruto, ya que únicamente en 7 frutos no se logró obtener este número de semillas para la germinación. Las semillas se germinaron en el laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, UNAM mediante el protocolo

específico para germinar semillas de cactáceas (Shishkova *et al.* 2013). El procedimiento completo se detalla a continuación.

Las semillas se sometieron a un proceso de escarificación química con la finalidad de acelerar el proceso natural de la eliminación de la testa. Las semillas se introdujeron en ácido sulfúrico concentrado (95% - 98%) durante 90 minutos, luego se lavaron tres veces con agua destilada y se sumergieron en etanol al 70% por 10 minutos. Después de este procedimiento, las semillas nuevamente se lavaron con agua destilada y se sumergieron en NaCl (Cloro comercial o Cloralex) al 60% durante 15 minutos. Por último, se les hicieron cuatro lavados con agua destilada estéril para remover todos los químicos utilizados y los desechos de la testa de las semillas. Al finalizar la escarificación, las semillas estuvieron listas para sembrarse en el medio de cultivo.

El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: en 3 litros de agua destilada se disolvieron 45 gramos de sacarosa (al 99.5%; Sigma Aldrich), 2.25 gramos de reactivo para cultivo de tejidos MES o sales de Sodio (al 99%; Sigma Aldrich) y 3.96 gramos de medio de cultivo MS al 0.2X (Murashige and Skoog Basal Medium; Sigma Aldrich). Cada reactivo se añadió lentamente en el agua destilada y se aplicó agitación continua para que todos los reactivos se disolvieran perfectamente. La solución resultante se calibró con KOH 1M hasta que llegara a un pH de 5.6. Toda la mezcla se aforó nuevamente hasta 4.5 litros y se vertió en 6 matraces de vidrio con capacidad de 1L. En el interior de cada matraz también se agregaron 6 gramos de agar bacteriológico (Bacteriological agar; Molecular Sigma Biology). Los matraces con el medio de cultivo se esterilizaron en una autoclave durante 25 minutos.

Después de la esterilización, el medio de cultivo se vertió en cajas Petri desechables en condiciones estériles. Las 40 semillas, que sirvieron como réplicas, se sembraron en dos cajas Petri por fruto (20 semillas en cada caja Petri a modo de repeticiones del experimento de germinación) y se les asignó un número consecutivo.

Para facilitar la siembra y la revisión de la germinación de cada semilla, se utilizó un acetato transparente marcado con puntos de plumón indeleble. Cada punto tuvo una distancia de separación de 0.5 centímetros entre sí. Dicho acetato se colocó debajo de la caja Petri mientras se sembraban las semillas y cada caja se marcó en

cuatro puntos, con cuatro marcas diferentes, las cuales siempre debían coincidir durante la revisión de la germinación de las semillas. Esto se hizo con la finalidad de preservar siempre la misma orientación durante la revisión de las cajas en las que se sembraron las semillas y no confundir el orden en que germinaron.

Todas las cajas Petri se colocaron en cámaras de germinación, dichas cámaras se calibraron a una temperatura de 28 °C con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Las semillas se revisaron diariamente durante 90 días y se registró el día en el que germinó cada semilla. Cada vez que se terminó el agar dentro de las cajas Petri, las semillas se resembraron en cajas nuevas, preservando siempre el número y la ubicación de las semillas. De esta manera se obtuvo una medida de la tasa de germinación de las semillas y del éxito reproductivo de cada población por tratamiento de polinización controlada.

En la población MR se contaron 120,897 semillas y en la población SNT 38,283 semillas, para un total de 159,270 semillas recolectadas entre ambas poblaciones. Del total de semillas se emplearon 6,097 semillas pertenecientes a las dos poblaciones de Hidalgo, 3,514 semillas de la población MR y 2,583 de SNT.

3.9 Análisis estadísticos

Para el número de óvulos y el número de granos de polen, por separado y como variables de respuesta, se puso a prueba la hipótesis de que no existen diferencias entre las dos poblaciones del estado de Hidalgo (SNT y MR). Para esto se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) para cada variable de respuesta, en donde se asumió que las poblaciones son factores fijos, una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo ya que fue el modelo que mejor se ajustó a los datos.

Para efectuar comparaciones entre las poblaciones MR y SNT sobre las características morfológicas de los brotes florales (número de lóbulos del estigma, número de anteras, largo total del estilo y el estigma y el ancho del estilo, área de la cavidad del ovario y largo de los estambres), se utilizó un modelo lineal generalizado (GLM) donde, en la mayoría de los casos, se asumió una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo. Específicamente para el largo de los estambres y el ancho

del estilo se utilizó una distribución Gauss inversa con una función de enlace identidad. En cada una de las características morfológicas, por separado, se probó la hipótesis de que éstas no difieren entre las poblaciones (por ejemplo, que el número de lóbulos del estigma en la población SNT y MR son iguales).

Se realizó un análisis GLM donde se asumió una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo para evaluar la hipótesis de que las flores de las poblaciones SNT y MR tienen un promedio de apertura similar, en este análisis la variable de respuesta fue el tamaño promedio de la apertura floral entre las dos poblaciones de Hidalgo.

En el caso del néctar, se probó la hipótesis de que el volumen, la concentración de los azúcares en grados Brix y el contenido energético fueron similares entre los sexos de las tres poblaciones. Para ello, se realizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) para estas variables de respuesta, por separado, donde se utilizaron los sexos como el efecto fijo y las poblaciones fueron el factor aleatorio, con una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo. Solo en el caso del néctar, se analizaron las tres poblaciones MR, SNT y Cadereyta. Asimismo, se evaluó el contenido energético del néctar de las hembras de la población de Cadereyta con respecto al néctar de las plantas de la población MR para probar si las plantas producen el mismo contenido energético en el néctar. Con la finalidad de probar esta hipótesis se realizó un GLM del contenido energético, como variable de respuesta, con una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo.

En cuanto a los experimentos de polinización controlada, se probó la hipótesis de que las variables de respuesta del número de semillas y el volumen de los frutos, por separado, no difieren para los experimentos de polinización controlada en las dos poblaciones de Hidalgo. Se realizaron GLMM para el número de semillas y el volumen, por separado, los experimentos fueron el factor fijo y las poblaciones el factor aleatorio, con una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo. Para determinar si existen diferencias intrapoblacionales se realizaron cuatro GLM, por separado, para las dos variables de respuesta y para las dos poblaciones MR y SNT con una distribución Gamma y una función de enlace logaritmo como factores fijos.

En los análisis anteriores de GLM y GLMM para las variables de respuesta volumen del néctar, concentración de azúcares en grados Brix, contenido energético del néctar, número de semillas y volumen de los frutos, se asumió que los datos de estas variables de respuesta se ajustaron a una distribución gamma con un enlace logaritmo.

Para determinar si había diferencia en la tasa de germinación de las semillas que se extrajeron de los frutos producto de los experimentos de polinizaciones controladas se realizó un análisis mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con una distribución Binomial y una función de enlace logaritmo. En este caso se utilizó una distribución binomial porque la variable de respuesta tuvo dos valores diferentes, germinó o no germinó. Respecto a la evaluación de la tasa de germinación para los experimentos de polinización controlada se realizó un GLMM, donde la variable de respuesta fue el porcentaje de germinación, los experimentos de polinización fueron el factor fijo y las poblaciones el factor aleatorio. Se utilizó una distribución Binomial y una función de enlace logaritmo. Las germinaciones intrapoblacionales se evaluaron por separado para las poblaciones MR y SNT con un GLM para cada población y una distribución Binomial con una función de enlace logaritmo.

El criterio que se utilizó para determinar cuál era el mejor modelo, fue seleccionar aquel modelo que tuviera el menor valor de AIC corregido (AIC_c), ya que este valor explica mejor las variables y considera una corrección en el tamaño de la muestra (Akaike, 1974; SPSS, 2015). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS v23.0 (SPSS, 2015).

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de los individuos hermafroditas de SNT y MR, y su sistema reproductivo

En la población MR se marcaron 142 individuos. En la población SNT se registraron lluvias y granizadas muy fuertes a finales de abril del 2015 (datos corroborados con reportes del Servicio Meteorológico Nacional), lo cual probablemente causó que la mayoría de los brotes murieran. Por esta razón, desde finales de abril y durante todo mayo se buscaron individuos que tuvieran yemas reproductivas, al final se marcaron 106 individuos. En la población dioica del JRBC se marcaron 85 individuos, de los cuales 49 fueron hembras y 36 machos. En la población de Cadereyta solamente se hizo el análisis del néctar como recompensa floral, para compararlo con el néctar producido en las dos poblaciones de Hidalgo.

Para determinar el sexo de las plantas en cada población de Hidalgo se analizaron 88 brotes florales, los cuales fueron preservados en alcohol al 70%. De estos brotes 20 correspondieron a la población SNT y 68 a la población MR.

En la población MR el promedio de óvulos por flor fue de 670.44 (± 64.79) óvulos y para la población SNT un promedio por flor de 448.75 (± 67.63) óvulos. Estos promedios entre poblaciones fueron significativamente diferentes ($n = 88$, $gl = 1$, $\chi^2 = 16.743$, $P < 0.0001$, $AICc = 1208.629$; Figura 6).

En la población MR, el número promedio de granos de polen fue de 187,116.05 por flor, mientras en la población SNT, el número promedio fue de 190,452.75 granos de polen por flor. No se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones ($n = 88$, $gl = 1$, $\chi^2 = 0.023$, $P = 0.878$, $AICc = 2226.169$; Figura 6).

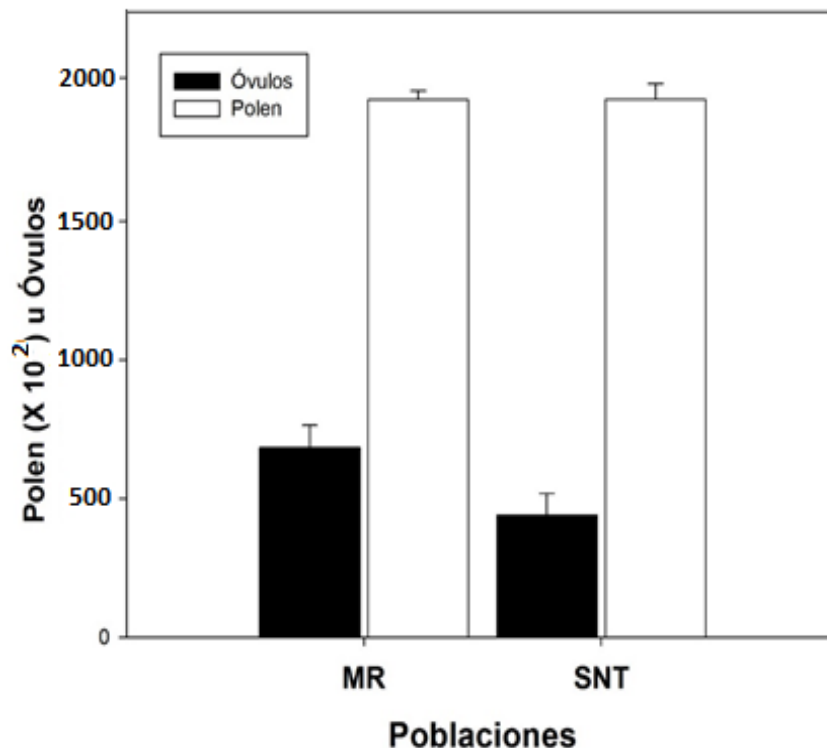


Figura 6. Número de óvulos y granos de polen por flor en las poblaciones de Hidalgo. El número de óvulos fue significativamente menor en la población SNT ($n = 20$, barras de error con IC $\pm 95\%$) en comparación con la población MR ($n = 68$, barras de error con IC $\pm 95\%$) y el número de granos de polen fue similar en las dos poblaciones.

De acuerdo con el análisis GLM para los caracteres morfológicos que se analizaron en los brotes (número de lóbulos del estigma, largo total del estilo y el estigma, y ancho del estilo, número de anteras, largo de los estambres y área de la cavidad del ovario) no se encontraron diferencias entre poblaciones en el número de lóbulos del estigma ($n = 88$, $gl = 1$, $\chi^2 = 0.009$, $P = 0.925$, $AICc = 384.131$; Tabla 3).

Respecto al número total de anteras, su número en promedio no fue significativamente diferente entre poblaciones ($n = 88$, $gl = 1$, $\chi^2 = 1.205$, $P = 0.272$, $AICc = 1104.344$; Tabla 3). La longitud promedio en el largo de los estambres tampoco fue significativamente diferente entre las dos poblaciones estudiadas en Hidalgo ($n = 87$, $gl = 1$, $\chi^2 = 0.169$, $P = 0.681$, $AICc = 347.69$; Tabla 3).

En la población SNT, el largo total del estilo más el estigma fue mayor y marginalmente significativo ($n = 87$, $gl = 1$, $\chi^2 = 3.747$, $P = 0.053$, $AICc = 447.977$; Tabla

3) en comparación con el largo promedio en la población MR. El ancho promedio del estigma no fue significativamente diferente entre las poblaciones ($n = 87$, $gl = 1$, $\chi^2 = 1.328$, $P = 0.249$, $AICc = 299.449$; Tabla 3). El área promedio de la cavidad del ovario en la población MR fue significativamente mayor ($n = 87$, $gl = 1$, $\chi^2 = 9.527$, $P = 0.002$, $AICc = 1088.676$) en comparación al área promedio de la cavidad del ovario en la población SNT (Tabla 3).

Debido a que en las dos poblaciones de Hidalgo se encontró abundante polen amarillo, anteras grandes y bien desarrolladas, gran cantidad de óvulos y ovarios bien desarrollados en todos los brotes florales que se analizaron, se puede concluir que todas las plantas con las que se realizó el estudio en estas poblaciones corresponden a plantas hermafroditas.

Tabla 3. Medidas de los caracteres morfológicos en los brotes florales de *Opuntia robusta* en las poblaciones MR y SNT.

Carácter morfológico	Población MR	Población SNT
	Promedio (IC 95%)	Promedio (IC 95%)
Número de lóbulos del estigma	11.25 (0.23)	11.2 (0.51)
Largo total del estilo más el estigma (mm)	13.42 (0.87)	15.23 (1.23)
Ancho del estilo (mm)	7.98 (0.35)	8.39 (0.49)
Número de anteras	451.25 (13.6)	416.4 (28.4)
Largo de los estambres (mm)	5.40 (0.53)	5.60 (0.86)
Área de la cavidad del ovario (mm ²)	341.98 (34.25)	248.60 (43.87)

4.2 Fenología floral en las poblaciones de Hidalgo

La floración en la población MR inició en abril, tuvo su pico de floración durante la mayor parte de mayo y terminó en la primera semana de julio. La floración para la población SNT pudo haberse retrasado por las lluvias y por este motivo inició a finales de mayo, tuvo su pico de floración a la mitad de junio y terminó durante la primera semana de julio. La floración en la población del JBRC inició a principios de marzo y terminó a mediados de abril.

En la población SNT el inicio de la apertura de las flores fue entre las 9 y 10 horas, el pico máximo de apertura floral fue entre las 13 y las 14 horas, y el cierre fue entre las 20 y 21 horas (Figura 7). En la población MR el inicio de la apertura de las flores fue entre las 9 y las 10 horas, hubo un pico máximo muy bien definido en la apertura floral entre las 12 y 13 horas, y el cierre de las flores fue entre las 19 y las 20 horas (Figura 7).

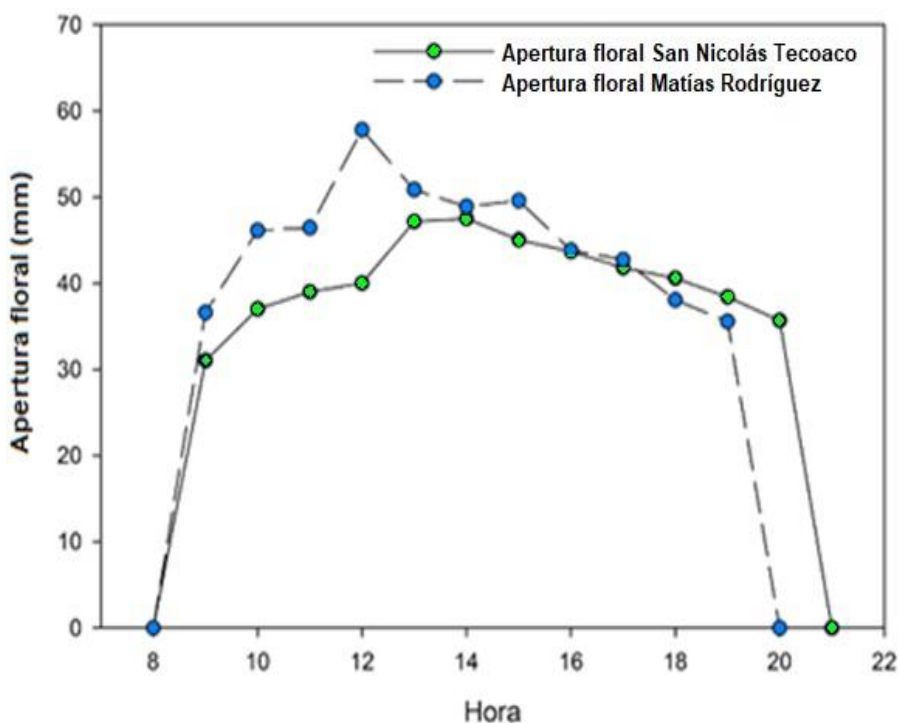


Figura 7. Apertura floral por horas en las poblaciones de Hidalgo. En las dos poblaciones la apertura floral tuvo su punto máximo entre las 12 y las 14 horas. La apertura floral fue mayor en la población MR (~60 mm) en comparación con la población SNT (~45 mm).

La duración del tiempo de la vida de las flores en ambas poblaciones se estimó de entre 1 a 3 días. El tamaño máximo del perianto fue de 60 mm para la población MR, el cual fue mayor, en comparación con los 45 mm en el tamaño máximo del perianto que se observó en la población SNT. La población MR tuvo un promedio general de 50.45 mm de apertura floral a lo largo del día, el cual no fue significativamente diferente ($n = 295$, $\chi^2 = 1.663$, $P = 0.197$, $AICc = 2373.305$) a los 47.73 mm de apertura floral promedio a lo largo del día para las flores de la población SNT.

4.3 El néctar como recompensa floral en tres poblaciones de *Opuntia robusta* del centro de México

En total se obtuvieron 133 muestras de néctar, de las cuales 32 muestras fueron de plantas hermafroditas de la población SNT, 59 muestras de plantas hermafroditas de la población MR y 42 muestras de Cadereyta, de las cuales 19 muestras se obtuvieron de plantas con morfo sexual femenino y 23 muestras se obtuvieron de plantas con morfo sexual masculino. Como se mencionó anteriormente, las flores abrieron de 1 a 3 días y únicamente el primer día de apertura floral se produjeron grandes cantidades de néctar.

En la población SNT, el volumen promedio del néctar fue de 38.1 μ l, en la población MR se obtuvo una cantidad promedio de 40.9 μ l y en la población Cadereyta la cantidad promedio fue de 22 μ l (29.08 μ l procedente de las plantas con morfo sexual femenino y 16.24 μ l de las plantas con morfo sexual masculino; Figura 8A).

El volumen del néctar fue significativamente mayor en ambas poblaciones hermafroditas, en comparación con la población dioica de Cadereyta, sin importar que las plantas fueran hembras o machos, sin embargo, el volumen del néctar no fue diferente entre las dos poblaciones hermafroditas de Hidalgo ($n = 133$, $F = 13.758$, $gl = 2$, $P < 0.001$, $AICc = 305.872$; Figura 8A).

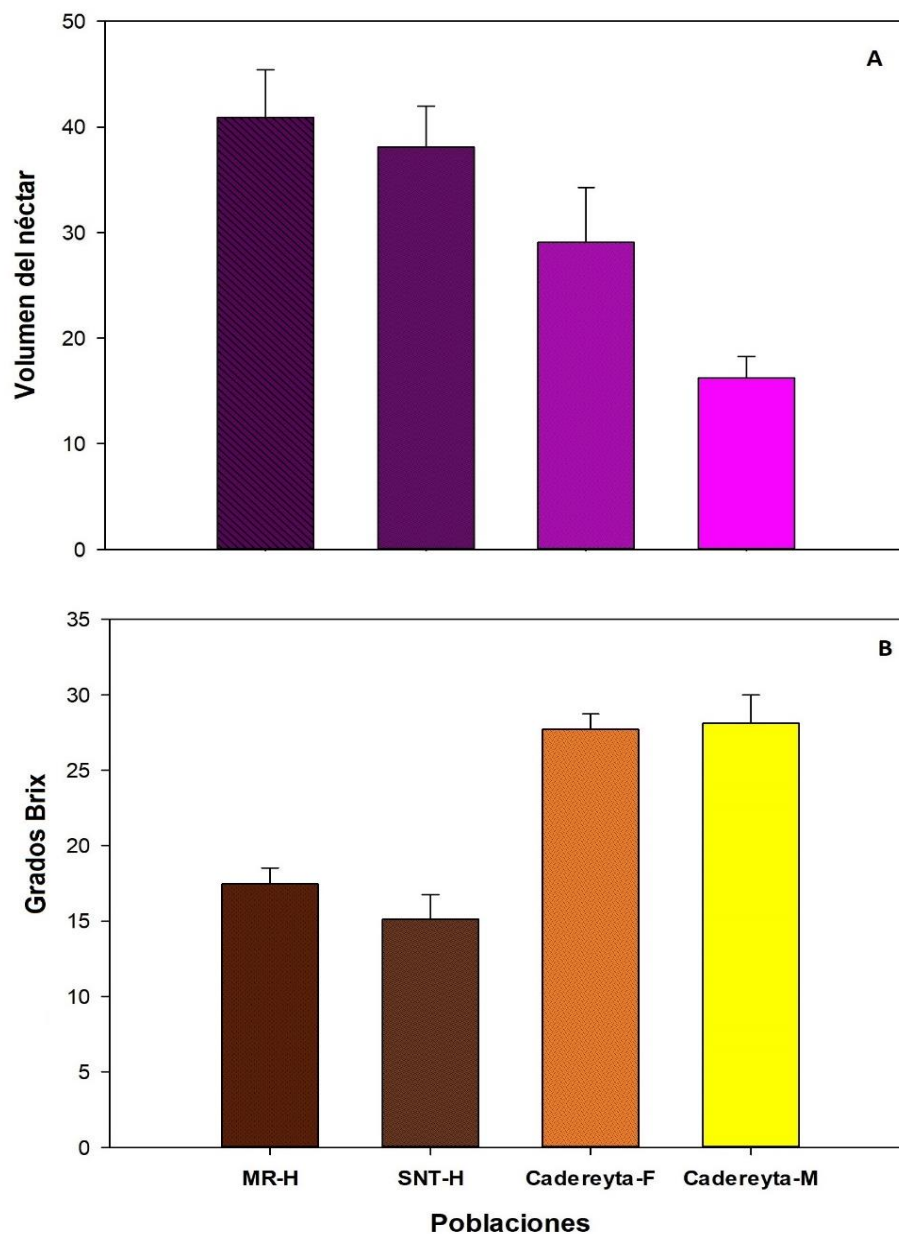


Figura 8. Volumen y concentración de azúcares en el néctar de *Opuntia robusta*. Se representa la cantidad de grados brix en el néctar de individuos H (hermafroditas), F (hembras) y M (machos) de las poblaciones MR (Matías Rodríguez), SNT (San Nicolás Teacoaco) y Cadereyta. A) Promedio del volumen del néctar \pm 1 IC 95% y B) Porcentaje de concentración de azúcares medido en grados Brix \pm 1 IC 95%.

En la población SNT la concentración de azúcares en el néctar estimada en grados Brix tuvo un promedio de 15.12 grados, en la población MR el promedio fue de 17.47 grados y en la población Cadereyta la concentración promedio fue de 27.94 grados (27.72 grados en el morfo sexual femenino y 28.13 en el morfo sexual masculino;

Figura 8B). La concentración de azúcares en el néctar fue menor entre las poblaciones hermafroditas de Hidalgo, es decir, no hubo diferencias significativas entre estas dos poblaciones con respecto a las plantas masculinas y femeninas en la población dioica de Cadereyta ($n = 133$, $F = 10.447$, $gl = 2$, $P < 0.001$, $AICc = 164.622$; Figura 8B).

El promedio del contenido energético del néctar en la población SNT fue de 38.61 calorías, en la población MR fue de 49.49 calorías y en la población Cadereyta fue de 37.9 calorías (51.63 calorías en promedio para las hembras y 26.56 en el caso de los machos; Figura 9).

El contenido energético del néctar es mayor en las flores hembra y en las hermafroditas, en comparación con las flores macho ($n = 133$, $F = 3.581$, $gl = 2$, $P = 0.031$, $AICc = 356.969$). Los resultados también mostraron que el contenido energético es mayor en las flores hembra, en comparación con las flores hermafroditas de la población MR ($n = 78$, $gl = 1$, $\chi^2 = 1389.091$, $P < 0.001$, $AICc = 777.482$; Figura 9).

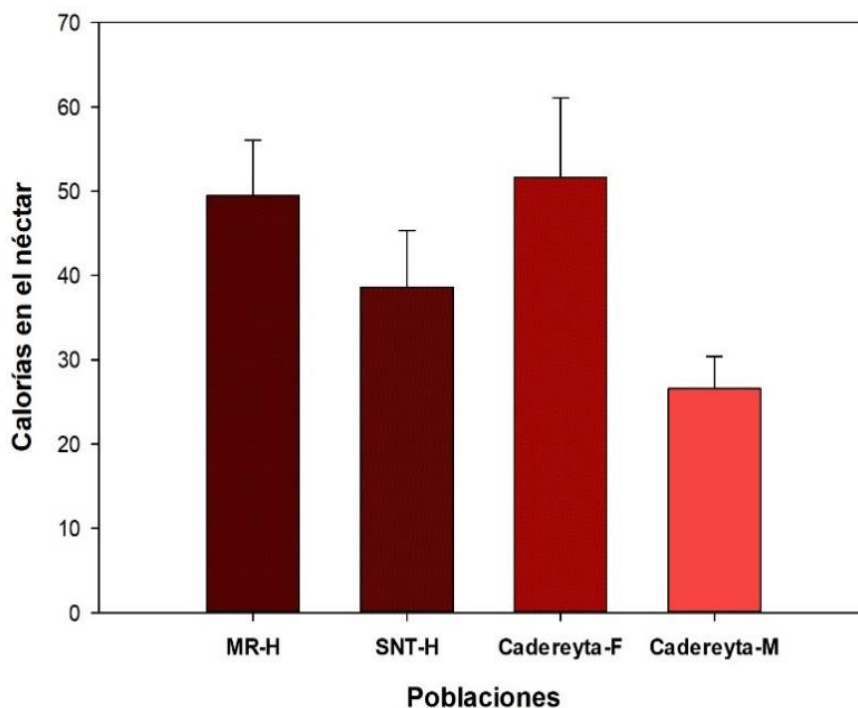


Figura 9. Contenido energético en el néctar de *Opuntia robusta* en tres poblaciones del centro de México. Las poblaciones MR, SNT y Cadereyta se dividieron en individuos H (hermafroditas), F (hembras) y M (machos). En las gráficas se muestra el promedio del contenido energético en calorías del néctar ± 1 IC 95%.

4.4 Los polinizadores en las poblaciones de Hidalgo

De acuerdo con las observaciones *in situ* y la identificación en el laboratorio, los principales polinizadores en las dos poblaciones de Hidalgo fueron primero una especie de abejas pequeñas de color negro, del género *Macrotera* sp. (aproximadamente 11.6 mm) y en segundo lugar fue una especie de abejas con mayor tamaño (aproximadamente 17.1 mm) del género *Tetraloniella* sp. (Figura 10).

En ambas poblaciones se observó una muestra de flores repartidas a lo largo de diferentes regiones. Las observaciones de los visitantes florales se realizaron desde las 9 hasta las 20 horas en cada población. En la población MR se observaron 25 flores, a las que acudieron 61 abejas de los dos géneros mencionados anteriormente. Igualmente, en la población SNT también se observaron 25 flores, a las que acudieron 13 abejas. Mediante las conductas registradas *in situ* se observó que los himenópteros del género *Macrotera* se sumergen en las flores para buscar el néctar, colectan el polen y en el proceso frecuentemente tocan varias veces el estigma, que en caso de estar receptivo hace posible la fertilización, pues particularmente en las cactáceas toda la superficie del estigma y del estilo puede ser receptiva (*Comunicación personal con la Dra. María del Carmen Mandujano*).

Mediante los registros en video se observó que el número de veces que las abejas del género *Macrotera* tocaron el estigma receptivo de *O. robusta* (16) fue mayor al número de veces que lo hicieron las abejas del género *Tetraloniella* (9).

También hubo registros de otros polinizadores, dos especies de pequeños coleópteros de los géneros *Trichochrous* sp. (aproximadamente 5.22 mm) y *Camptodes* sp. (aproximadamente 4.85 mm), los cuales se alimentan de las recompensas florales, como el néctar y el polen (Figura 11). Los coleópteros podrían favorecer la autopolinización en estas poblaciones de *O. robusta* ya que están presentes en grandes cantidades (de 15 a 30 individuos por flor) y se desplazan libremente dentro de las flores y conforme forrajejan las recompensas se impregnan de polen y hacen contacto con el estigma receptivo de la planta. En *O. robusta* ocasionalmente se registraron visitantes florales, tales como mariposas y hormigas.



Figura 10. Principales géneros de abejas que polinizan a *Opuntia robusta* en SNT y MR.
 A) Abeja del género *Macrotera* vista dorsal, B) Abeja del género *Macrotera* vista frontal. C) Abeja del género *Tetraloniella* vista dorsal, D) Abeja del género *Tetraloniella* vista frontal.

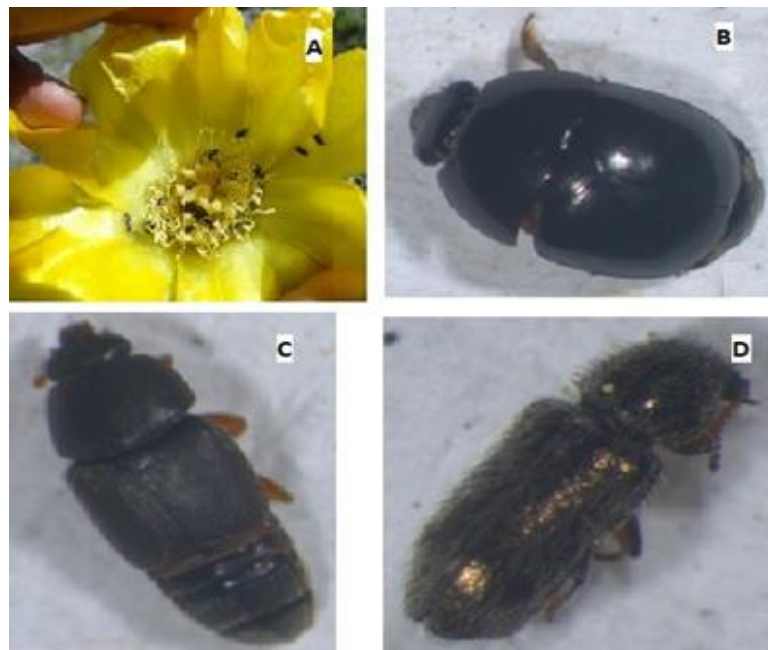


Figura 11. Coleópteros que polinizaron a *Opuntia robusta* en Hidalgo. A) Flor de *O. robusta* con varios coleópteros en su interior, B) Coleóptero del género *Camptodes* vista dorsal, C y D) Coleópteros del género *Trichochoerus* vista dorsal.

4.5 El sistema de apareamiento de *Opuntia robusta* en SNT y MR

Los resultados del cociente polen/óvulos (P/O) el resultado del logaritmo propuesto por Cruden (1977) para la población MR fue de 2.44, lo que sugiere un sistema de apareamiento autógeno facultativo, mientras que en la población SNT fue de 2.62, el cual sugiere un sistema de apareamiento xenógamo facultativo.

Para realizar los experimentos de polinización controlada en la población MR se utilizaron 104 plantas y en la población SNT se utilizaron 55 plantas, las cuales corresponden al 73% y al 52% del número total de plantas que se marcaron en cada población respectivamente.

En la población MR se utilizaron 554 flores para los tratamientos de polinizaciones controladas y 38 flores para el experimento de apomixis, de las cuales se colectaron 505 frutos. En la población SNT se utilizaron 189 flores, de las cuales se colectaron 169 frutos. El número total de frutos colectados fue de 674 frutos entre ambas poblaciones.

En la Tabla 4 se muestra la frecuencia, es decir el número de réplicas con la que se realizó cada tratamiento de polinización controlada por población y el número de frutos que se colectaron.

Tabla 4. Relación de los experimentos de polinizaciones controladas por población, réplicas de cada experimento, número de frutos colectados y número de frutos perdidos.

Matías Rodríguez n = 554 flores		San Nicolás Tecoco n = 189 flores	
Experimento	Frecuencia	Experimento	Frecuencia
Autopolinización automática	95	Autopolinización automática	37
Autopolinización manual	53	Autopolinización manual	22
Entrecruza	39	Entrecruza	17
Suplemento de polen	39	Suplemento de polen	16
Apomixis	38	Apomixis	0
Control	290	Control	97
Total de frutos colectados	505	Total de frutos colectados	169
Total de frutos perdidos	49	Total de frutos perdidos	20

En la población SNT no fue posible obtener los frutos de 20 experimentos, a su vez, en la población MR no fue posible obtener los frutos de 49 tratamientos de polinizaciones controladas. Es importante mencionar que 35 de estos frutos “perdidos” corresponden al experimento que se realizó para probar la apomixis en MR, en los cuales no se produjo ningún fruto y hubo 3 apomixis que se consideraron falsos positivos ya que posiblemente se contaminó el estigma con el polen de la flor durante la emasculación. Los frutos que se perdieron posiblemente fueron depredados por aves e insectos que consumieron la totalidad o gran parte de los frutos. Otra posibilidad es que el fruto se cayó de la planta y se perdió.

En los tratamientos que se realizaron en las dos poblaciones de Hidalgo, se encontró que el número de semillas fue diferente entre ellos con respecto al grupo control, además la entrecruza tuvo menor número de semillas con respecto a todos los demás experimentos ($n = 671$, $F = 6.625$, $gl = 4$, $P < 0.001$, $AICc = 1100.975$; Figura 12). La misma tendencia se encontró para el volumen de los frutos en el experimento de entrecruza ($n = 671$, $F = 2.524$, $gl = 4$, $P = 0.04$, $AICc = 978.345$; Figura 12).

En la población MR, se contó el número total de semillas para estimar el éxito de cada tratamiento con respecto al grupo control. En estos análisis no se tomaron en cuenta los datos del tratamiento de apomixis ya que se necesitan experimentos más detallados para probar su existencia. El grupo control de esta población tuvo un número de semillas estadísticamente igual al de los tratamientos de autopolinización manual y de suplemento de polen.

Los tratamientos de autopolinización automática y de entrecruza tuvieron un menor número de semillas con respecto al tratamiento control ($n = 502$, $gl = 4$, $\chi^2 = 42.699$, $P < 0.001$, $AICc = 6316.284$; Figura 12). En el tratamiento de entrecruza el volumen de frutos fue menor, mientras que todos los demás tratamientos tuvieron un volumen similar ($n = 502$, $gl = 4$, $\chi^2 = 14.41$, $P = 0.006$, $AICc = 13721.458$; Figura 12).

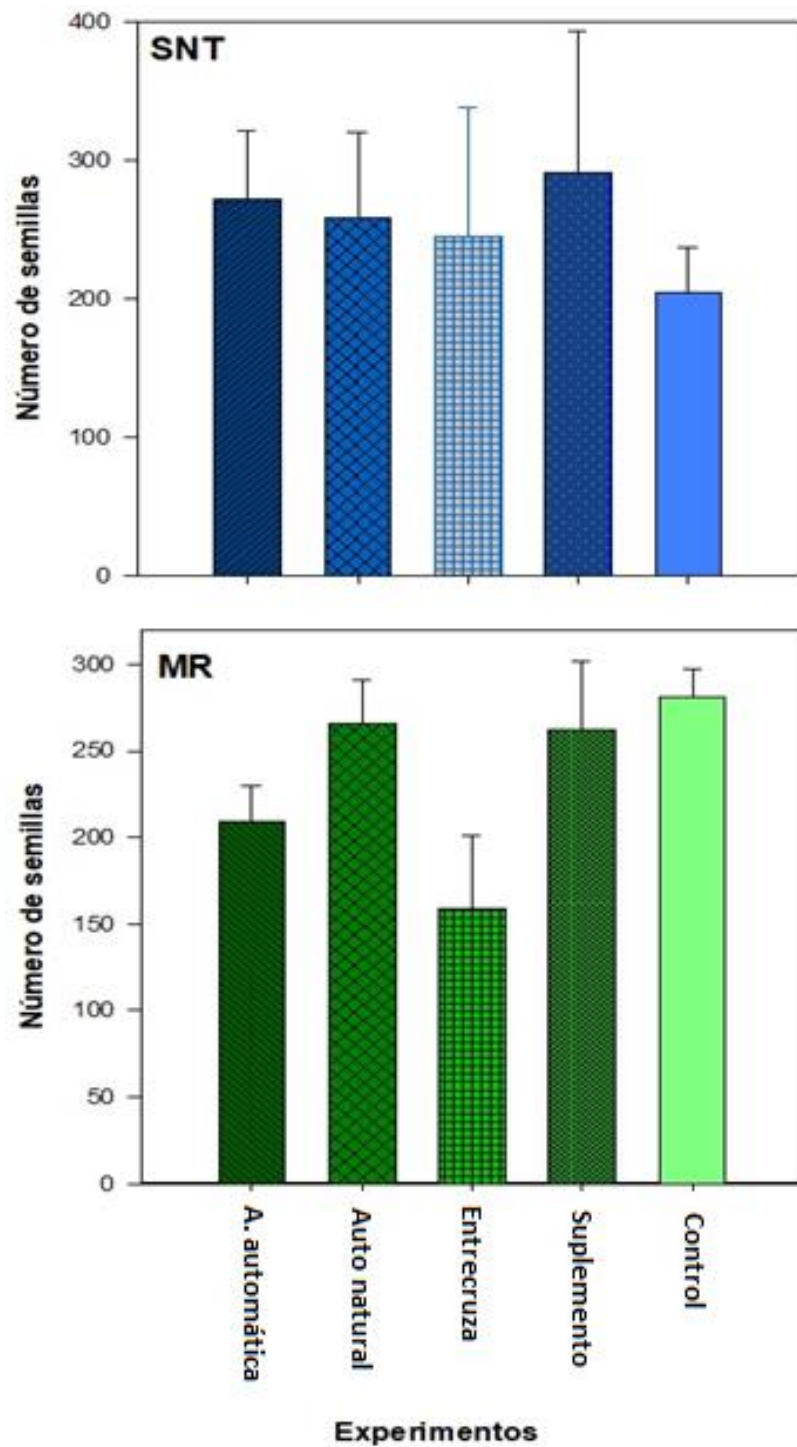


Figura 12. Número de semillas en los frutos de las poblaciones de Hidalgo. A) Número de semillas por tratamiento para la población SNT \pm 1 IC 95%, B) Número de semillas por tratamiento para la población MR \pm 1 IC 95%.

En la población SNT el grupo control tuvo menor número de semillas con respecto a todos los demás tratamientos ($n = 169$, $gl = 4$, $\chi^2 = 4.9$, $P = 0.298$, $AICc = 2141.864$; Figura 13). Por otra parte, los experimentos de control y de entrecruza produjeron un volumen de los frutos menor con respecto a todos los demás experimentos ($n = 169$, $gl = 4$, $\chi^2 = 23.826$, $P < 0.001$, $AICc = 4596.446$; Figura 13).

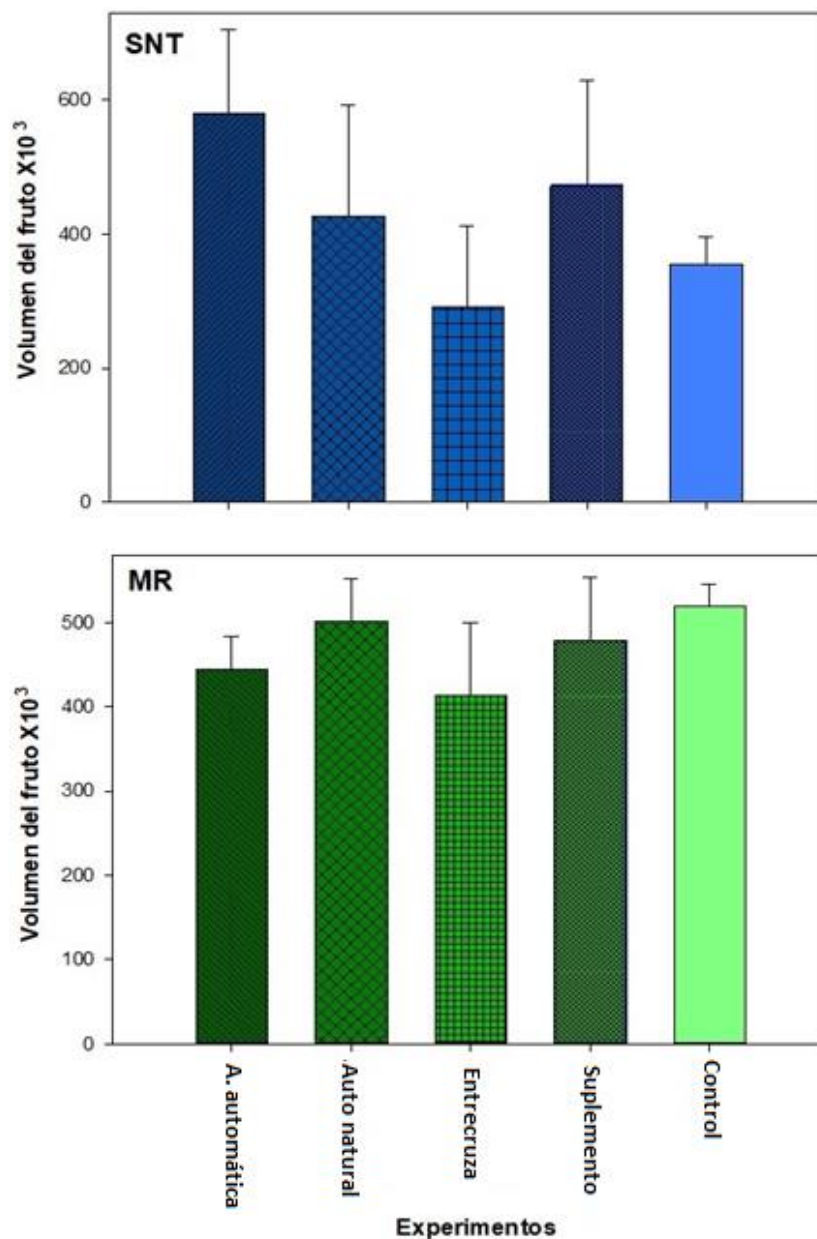


Figura 13. Volumen de los frutos en las poblaciones SNT y MR. A) Número de semillas por tratamiento para la población MR ± 1 SE, B) Número de semillas por tratamiento para la población SNT ± 1 SE.

4.6 Porcentaje de germinación en los experimentos de polinización controlada

En total, germinaron 1,769 semillas de las dos poblaciones (o el 29.01%). La población SNT tuvo el 32.66 % de germinación el cual fue mayor ($n = 6,097$, $gl = 1$, $\chi^2 = 28.78$, $P < 0.001$, $AICc = 20.545$; Figura 14) al 26.32 % de germinación de la población MR.

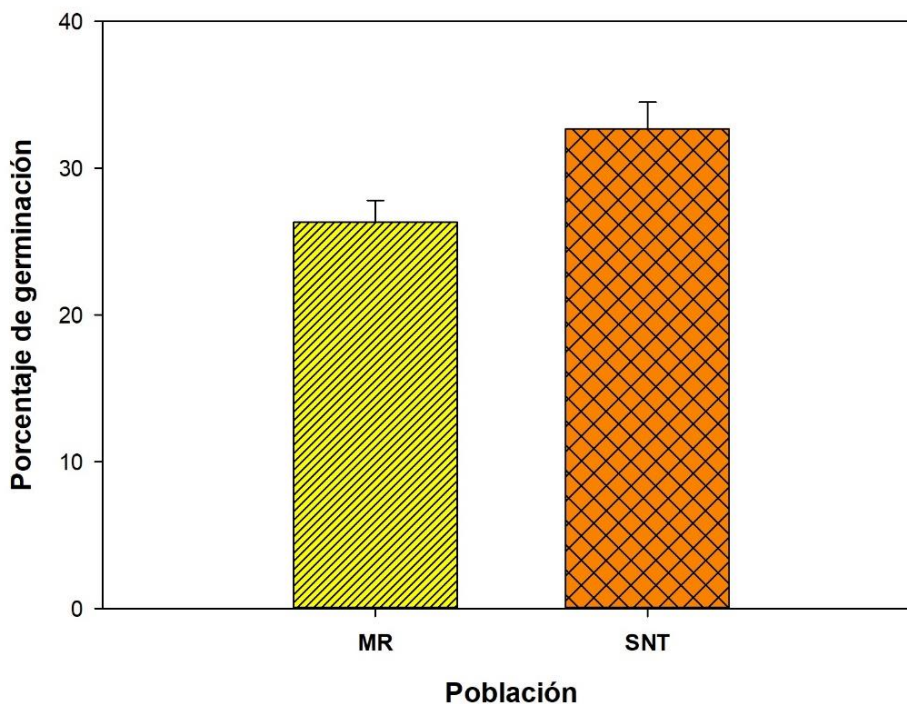


Figura 14. Porcentaje de germinación en las poblaciones SNT y MR. El porcentaje de germinación fue mayor en la población SNT. Cada barra representa el porcentaje de germinación por población ± 1 IC 95%.

En el caso de las germinaciones en conjunto de las poblaciones MR y SNT se encontró que los experimentos de autopolinización automática y manual tuvieron mayor porcentaje de germinación con respecto a los demás tratamientos ($n = 6,097$, $F = 20.794$, $P < 0.001$, $AICc = 7,561.691$; Figura 15).

En la población SNT se encontró que los tratamientos de autopolinización, tanto manual como automática, tuvieron mayor tasa de germinación ($n = 2,583$, $gl = 4$, $\chi^2 = 95.779$, $P < 0.001$, $AICc = 42.465$; Figura 15) con respecto a los demás tratamientos. En la población MR el tratamiento de autopolinización manual tuvo mayor tasa de germinación con respecto a los demás tratamientos ($n = 3,514$, $gl = 4$, $\chi^2 = 12.452$, $P = 0.014$, $AICc = 43.648$; Figura 15).

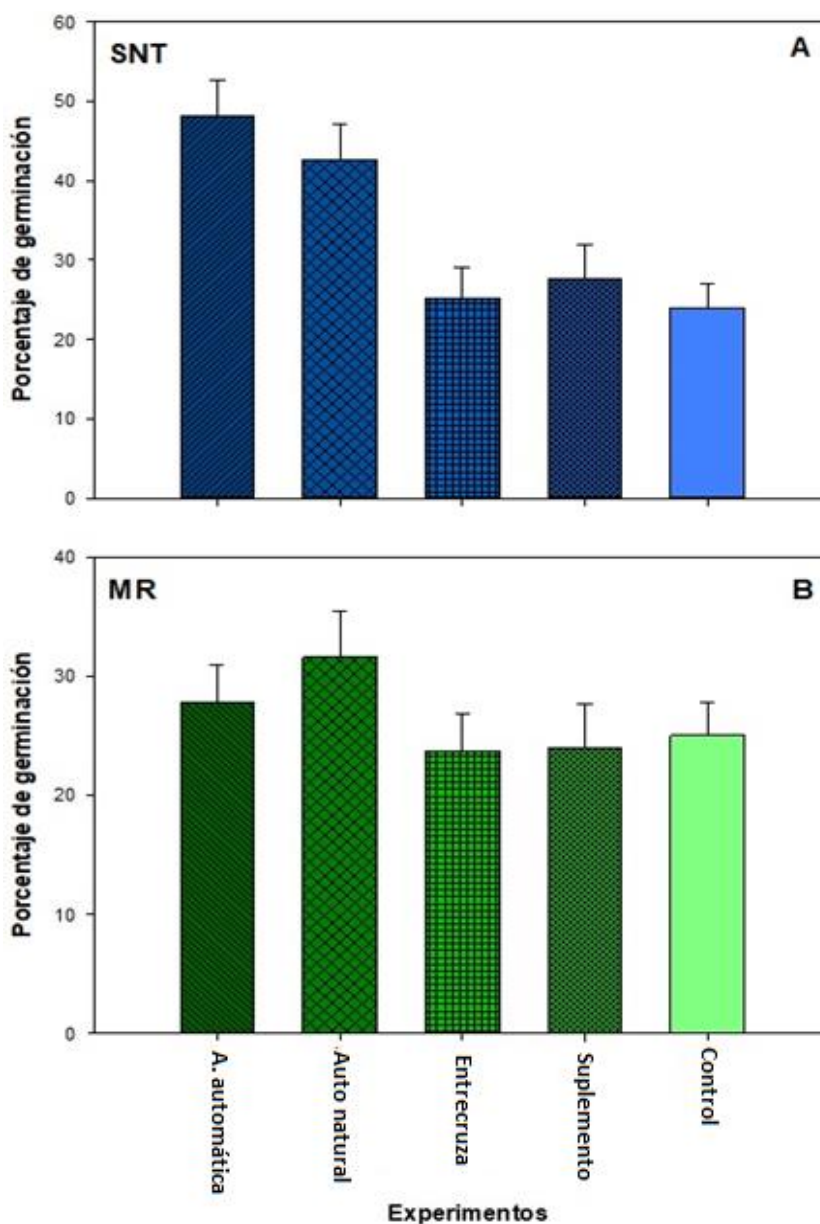


Figura 15. Porcentaje de germinación de semillas por tratamiento en las poblaciones MR y SNT. A) Porcentaje de germinación de semillas por tratamiento para la población MR \pm 1 IC 95%, B) Porcentaje de germinación de semillas por tratamiento para la población SNT \pm 1 IC 95%.

5. DISCUSIÓN

5.1 El sistema reproductivo de *Opuntia robusta* en individuos hermafroditas favorece la autogamia

El número de granos de polen de las poblaciones MR y SNT no fue diferente a la cantidad de polen que se encontró en la población trioica Santa Rosa, SLP (Castillo y Trujillo-Argüeta, 2009). En las observaciones que se realizaron en campo, se encontró que las flores hermafroditas de *O. robusta* en las poblaciones MR y SNT presentaron autopolinización y protandria. Igualmente, en *O. lindheimeri* se documentó que sus flores experimentan autopolinización y protandria (Mondragón-Jacobo y Bordelon, 1996). La explicación que uniría este fenómeno tanto para las flores de *O. robusta* como para las de *O. lindheimeri* es que la rápida maduración sexual del verticilo masculino podría favorecer la autopolinización, ya que en el momento de apertura floral muchas veces el polen ya había impregnado el estilo y el estigma de la flor. Por otra parte, la protandria también puede funcionar como un mecanismo para evitar la autofecundación, ya que en *O. polyacantha* la dehiscencia de las anteras sucede antes de que el estigma esté receptivo, pero en el momento de la maduración del verticilo floral femenino el polen ya no era viable, en este ejemplo se sugiere que el polen puede utilizarse por los visitantes florales para favorecer la xenogamia (Cota-Sánchez *et al.*, 2013).

En la población SNT el número de óvulos fue similar al número que se reportó en la población Santa Rosa (del Castillo y Trujillo-Argüeta, 2009) y también el tamaño de la cavidad del ovario fue similar (del Castillo y González-Espinoza, 1988), pero en el caso de la población MR se encontró que la cavidad del ovario y por consiguiente el número de óvulos fue mayor en comparación con SNT, por casi 70%. Este resultado se puede interpretar como una especialización de la cavidad del ovario en la población ginodioica de SNT con respecto la población hermafrodita de MR, algo similar a la adopción de la estrategia K la cual se caracteriza porque los individuos utilizan sus recursos reproductivos en una menor cantidad de descendientes que tengan la mayor probabilidad de sobrevivir (Pianka, 1970), ya que en esta población existen flores

hembras que tienen menor cantidad de óvulos y con los datos de las germinaciones se demostró que dichos óvulos tienen mayor viabilidad (Figura 13).

Los individuos hermafroditas no presentaron diferencias en el largo del estilo ni de los estambres. Esto concuerda con los resultados que presentaron del Castillo y González-Espinosa (1988) para *O. robusta*, ya que describieron que los morfos de los individuos unisexuales presentan heterostilia, pero los individuos hermafroditas son homostílicos.

5.2 El periodo de floración es diferente en las poblaciones de *Opuntia robusta*

Del Castillo y González-Espinoza (1988) mencionan que en la población trioica de *O. robusta* en Santa Rosa, San Luis Potosí, el periodo de floración comienza en febrero para los individuos masculinos, en marzo para los femeninos y en abril para los hermafroditas, mientras que la floración termina a finales de mayo o principios de junio para los tres morfos sexuales antes descritos. El periodo de floración, en la población del JBRC comienza a mediados de marzo para los individuos masculinos y poco después inicia la floración de los individuos femeninos. Ambos morfos sexuales terminan su floración durante la mitad de abril (*observación personal*). Al estudiar las plantas hermafroditas de MR y SNT pudo observarse un periodo de floración más largo, de abril a julio lo cual excedió un mes a lo descrito anteriormente. Esto posiblemente se deba a que en MR y en SNT no hay visitantes florales como *Diadasia* que ejerzan presiones de selección y entonces se invertirían menos recursos en la floración como en JBRC (*observación personal*). Existen cactáceas en las que la floración dura alrededor de un mes, como en el caso de *O. tomentosa*, cuya floración ocurre durante mayo en la Reserva del Pedregal de San Ángel (Mandujano *et al.*, 2014) y otras cactáceas como la especie *Astrophytum ornatum* la cual presenta flores todo el año, aunque tiene dos picos de floración, el primero en julio y el segundo en septiembre (Palafox *et al.*, 2017).

El horario o el momento de apertura y cierre de las flores de *O. robusta* en Hidalgo fue similar entre ambas poblaciones, ya que abrieron alrededor de las 9 o 10 horas y cerraron entre las 19 y las 21 horas. Las horas de apertura y cierre de las flores

de *O. robusta* fueron similares a las que se reportan para *O. macrocentra* (Mandujano *et al.*, 2013) ya que sus flores abren alrededor de las 8 y cierran alrededor de las 20 horas, y un poco diferente a las horas de apertura de *O. tomentosa*, cuyas flores abren a las 9 y cierran a las 16 horas (Mandujano *et al.*, 2014). Además, las flores abren generalmente de dos a tres días, lo cual se parece a lo reportado para *O. robusta* por del Castillo y González-Espinosa (1988).

5.3 El néctar como recompensa floral favorecería la visita de las abejas como polinizadores efectivos en *Opuntia robusta*

En la población trioica de *O. robusta* de Santa Rosa (del Castillo y González-Espinosa, 1988), en una población dioica (JRBC) y en las poblaciones hermafroditas (SNT y MR) se producen grandes cantidades de néctar durante la mañana del primer día de apertura floral. Mientras que en *O. macrocentra* y en *O. tomentosa* el néctar se acumula a lo largo del día, lo cual indica que se colectó el néctar y las flores lo volvían a producir, esto se repite a lo largo del día (Mandujano *et al.*, 2013; Mandujano *et al.*, 2014). En otras cactáceas como *Neobuxbaumia tetetzo*, la cual tiene una apertura floral nocturna, el néctar se produce de manera constante durante toda la noche (Valiente-Banuet *et al.*, 1996).

El volumen del néctar en las flores masculinas de la población dioica de Cadereyta fue 2.7 veces mayor que en la población trioica de Santa Rosa. El volumen en las flores hembra de esta misma población dioica también fue 3.4 veces mayor que en la población trioica, igualmente el volumen de néctar para las poblaciones con flores hermafroditas fue alrededor de 3.4 veces mayor en comparación con la población trioica. Esto posiblemente se deba a que el ancho del receptáculo podría ser mayor en las poblaciones SNT, MR y Cadereyta, en comparación con la población de Santa Rosa que estudiaron del Castillo y González-Espinosa (1988), aunque esto es algo que se debe comprobar en futuros trabajos sobre esta especie.

En la población trioica de Santa Rosa, la concentración de azúcares fue 1.5 veces mayor en comparación con las poblaciones hermafroditas SNT y MR, mientras que en la población dioica la concentración de azúcares fue similar en comparación

con la población trioica. El contenido energético es la medida que conjunta a la concentración de azúcares con el volumen del néctar y que tiene un significado biológico importante porque está directamente ligada con las ganancias o recompensas que obtienen los visitantes florales y/o polinizadores de las flores, además del gasto energético que debe hacer la planta para producir dicha recompensa. La producción del néctar en las flores femeninas es mayor que en los machos ya que induce las visitas de las abejas a este morfo floral y la transferencia del polen (González *et al.* 1995, Nepi *et al.* 2001) con la finalidad de maximizar la reproducción femenina (Ashworth y Galetto, 2002).

En la población dioica y en la población hermafrodita de Cadereyta e Hidalgo respectivamente, el contenido energético fue alrededor de 10 veces mayor sin importar el sexo (machos, hembras o hermafroditas) en comparación con los datos que se reportaron para la población trioica de Santa Rosa en San Luis Potosí (del Castillo y González-Espinosa, 1988). Además, el néctar de las hembras de la población dioica de Cadereyta tuvo mayor contenido energético, en comparación con los individuos hermafroditas de Hidalgo. Esto puede deberse a que necesitan atraer a los visitantes florales y entre ellos a los polinizadores efectivos para asegurar la fecundación.

Opuntia mycrodasys produce alrededor de 32 μ l de néctar durante la primera hora antes de que ocurra la antesis (Piña *et al.*, 2007). En el caso de *O. quimilo* en Córdoba, Argentina, en un sistema ginodioico las hembras tuvieron el néctar más diluido con respecto a las plantas hermafroditas (Díaz y Cocucci, 2003) y sus principales polinizadores fueron colibrís (*Chlorostilbon aureoventris* y *Heliomaster furcifer*), lo cual implica que las presiones de selección fueron de un polinizador filogenéticamente muy diferente.

Los visitantes florales son todas las especies que interactúan con las flores y pueden o no participar activamente en la polinización (King *et al.*, 2013). En el caso de *O. robusta* esporádicamente se observaron hormigas y mariposas sobre las plantas, los cuales también se consideraron visitantes florales.

Existen estudios donde diversas especies de *Opuntia* son polinizadas por grupos específicos de abejas (Valiente-Banuet *et al.*, 1996). En el caso de *O. rastrera*,

las abejas *Diadasia sp.* y *Lithurge sp.* pueden considerarse como los polinizadores efectivos y no solamente como visitantes florales, ya que son las especies que realizan mayor número de visitas, se alimentan de las recompensas florales como el néctar y el polen, y hacen contacto con el estigma de las flores lo que promueve la fecundación (Mandujano *et al.*, 1996). En el caso de *Neobuxbaumia tetetzo* los murciélagos *Leptonycteris yerbabuenae* y *Choeronycteris mexicana* fueron los polinizadores efectivos, pues se observó que hay una dependencia recíproca entre los murciélagos y las plantas, pues los murciélagos se alimentan del polen, del néctar y de los frutos, y a su vez *Neobuxbaumia tetetzo* necesita de ellos para la polinización, visitan activamente las flores durante la noche, cuando es el momento de mayor actividad de las flores y de los murciélagos, además posiblemente hacen contacto con los verticilos sexuales mientras se alimentan (Valiente-Banuet *et al.*, 1996).

En el sistema dioico de *O. robusta* del JBRC se encuentra su polinizador más importante, *Diadasia rinconis* (del Castillo y González-Espinosa, 1988). *Diadasia* también es el polinizador de otras especies de cactáceas como *Opuntia rastrera* y *Opuntia heliabravoana* (Mandujano *et al.*, 1996; Sánchez-Echeverría *et al.*, 2017). La población dioica de Cadereyta posiblemente depende de esta abeja para la reproducción sexual y por eso las hembras invierten en una gran cantidad de calorías para atraerlas. La población de *O. robusta* en Cadereyta está protegida en el Jardín Botánico y al ser dioica es necesario realizar más estudios sobre la biología reproductiva en esta población para conocer si existe algún riesgo de conservación, ya que posiblemente dependa de un polinizador específico para reproducirse por la vía sexual (Johnson y Steiner, 2000) ya que se ha visto que este tipo de interacciones estrechas son más susceptibles a desaparecer (Rezende *et al.*, 2007; Saavedra *et al.*, 2011).

En el JBRC los principales polinizadores de *O. cantabrigensis* son las abejas de los géneros *Diadasia*, *Lithurge* y *Ceratina* (Hernández, 2016), pero hacen falta observaciones adicionales para saber si estas abejas también polinizan a *O. robusta* en la misma localidad. Las abejas de los géneros *Macrotera* y *Tetraloniella* fueron los principales polinizadores que promovieron la polinización cruzada de *O. robusta* en las poblaciones SNT y MR. Este es el primer registro de las abejas del género *Tetraloniella*

como polinizadores de *O. robusta*. Las abejas de este género generalmente polinizan a las flores de la familia Orchidaceae (Johnson *et al.* 2005; Paulus 2006).

Las abejas del género *Macrotera* también fueron los principales visitantes florales de *O. robusta* en MR y SNT, ya que se tienen registros en video donde estas abejas acudieron con más frecuencia a las plantas y además tuvieron más contacto con el estilo y el estigma que cualquier otro visitante floral. En el municipio de Peñamiller, Qro. los principales polinizadores de *Lophophora diffusa* fueron abejas de los géneros *Macrotera*, *Lasioglossum* y *Augochlorella* (Briseño, 2016). En *Myrtillocactus geometrizans* en el municipio de Cadereyta de Montes, Qro. se encontró que los principales polinizadores son abejas de los géneros *Diadasia*, *Macrotera*, *Lithurge* y *Ceratina* (Cano, 2017). Este es el segundo registro del género de abejas *Macrotera* con el género *Opuntia*, ya que también se les ha observado con *O. heliabravoana* en las afueras de Pachuca, Hidalgo (Sánchez-Echeverría *et al.*, 2017).

En este estudio se encontró que las abejas fueron más abundantes en la población MR (observación personal) y esto posiblemente se debe a que en ese año se observó una población con más flores que en la población SNT (Tabla 4). Un aspecto que no se evaluó fue la presencia de abejas en las poblaciones que se estudiaron, en comparación con la cercanía a zonas altamente antropizadas, pues en áreas aledañas a Pachuca, Hidalgo se encontró que las plantas de *O. heliabravoana* cercanas a zonas urbanas tuvieron menor cantidad de polinizadores con respecto a las áreas sin población humana (Sánchez-Echeverría *et al.*, 2017).

Dentro de las flores se encontraron grandes cantidades de coleópteros principalmente de los géneros *Trichochrous* y *Camptodes* y se les consideró como depredadores importantes pues se alimentan activamente de las recompensas florales como el néctar y/o polen. Se sabe que el género de escarabajos *Trichochrous* es un visitante floral de varios géneros de la familia Cactaceae (por ejemplo, *Echinocereus*, *Ferocactus* y *Opuntia*; Grant y Grant 19179; Grant y Hurd 1979) mientras que al género *Camptodes* se le ha encontrado en *Opuntias* y en herbáceas de las familias Fabaceae y Asteraceae (de Souza *et al.* 2016). Estos insectos favorecen la autopolinización en *O. robusta*, como se demostró anteriormente, ya que mientras realizan sus conductas

de forrajeo pueden saturar el estigma con polen procedente de la misma flor, sin la presencia de otro tipo de polinizador (del Castillo y González-Espinosa, 1988).

5.4 El sistema de apareamiento mixto está presente en la mayoría de las poblaciones de *Opuntia robusta*

Los resultados del conteo de semillas comparados con los datos del volumen de los frutos son menos confiables, debido a que hubo tratamientos que fueron dañados por los depredadores naturales (*p. ej.*, chinches fitófagas, Sandoval-Molina *et al.*, 2018) y aunque dentro de ellos hubo pocas semillas el volumen de estos frutos se encontraba casi intacto, pues estos depredadores únicamente horadan una pequeña porción del fruto para comerse la pulpa y las semillas. El volumen de los frutos podría ser una buena aproximación para equiparlo con el número de semillas ya que estas generalmente mantienen un volumen constante sin importar el tratamiento al que se les someta. En la cactácea *Polaskia chende* se midieron los frutos y se calculó un volumen de aproximadamente 1 semilla por centímetro cúbico. *Polaskia chende* es una planta que se ha domesticado en el centro de México y se sabe que, aunque el volumen de los frutos de las plantas domesticadas es mayor al de las naturales el volumen de las semillas es constante (Cruz y Casas, 2002).

El cociente polen/óvulos para la población MR sugiere un sistema de apareamiento autógamo facultativo y para la población SNT un sistema de apareamiento xenógamo facultativo. Los resultados de los individuos hermafroditas en la población SNT son similares a lo encontrado para los individuos hermafroditas de la población trioica de *O. robusta* en Santa Rosa (del Castillo y Trujillo-Argueta, 2009), ya que poseen un sistema de apareamiento con xenogamia facultativa.

En la cactácea *Opuntia spinosissima*, la cual se encuentra en Florida, se realizaron experimentos de polinización controlada y las flores se emascularon, pero se registró que el tubo polínico no germinó en el estigma lo cual sugiere apomixis (Negrón-Ortiz, 1998). Sin embargo, los resultados en el caso de las poblaciones de *O. robusta* que se estudiaron en este trabajo muestran que no existe apomixis pues, aunque hubo 3 casos en los que el experimento derivó en la formación de semillas, se

consideraron como falsos positivos, ya que posiblemente las flores no se emascularon adecuadamente o no se les aisló el estigma correctamente cuando se realizó el experimento.

La hipótesis clásica de los sistemas de apareamiento (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth *et al.*, 1990) propone que evolutivamente los sistemas autógamos y xenógamos son más estables que los intermedios (mixtos). Pero la evidencia empírica más reciente ha mostrado que 63% de las especies vegetales presentan sistemas de apareamiento mixtos, pero no es posible decir de manera concluyente porque este sistema es tan frecuente, ya que no se ha encontrado una señal filogenética clara para explicar este patrón (Goodwillie *et al.*, 2005; Whitehead *et al.*, 2018). Algunas de las explicaciones ecológicas para los sistemas de apareamiento mixtos en la naturaleza postulan que se podrían deber a la cantidad de polinizadores y la presencia de sistemas de autoincompatibilidad, entre otros (Goodwillie *et al.*, 2005; Whitehead *et al.*, 2018).

La autogamia evoluciona en conjunto con la xenogamia (Goodwillie *et al.*, 2005). Fisher (1941) mostró que un alelo que funcione para la autofecundación debería propagarse en una población con xenogamia porque las entrecruzas propician su propia transmisión. Sin embargo, el aumento de la autogamia también puede causar depresión por endogamia, la acumulación de mutaciones deletéreas y la reducción del potencial de adaptación en las poblaciones (Peterson y Kay 2014). La tasa de autofecundación puede variar ampliamente entre las especies que están estrechamente relacionadas e incluso entre poblaciones dentro de una misma especie, lo cual sugiere que estos cambios podrían responder rápidamente a la selección natural (Jain 1976).

La variación de la autofecundación a través de las poblaciones de una misma especie puede indicar variabilidad en la polinización biótica y esto limita la respuesta evolutiva a la selección en el sistema de apareamiento (Schemske & Lande 1986). La estabilidad evolutiva a los sistemas de apareamiento mixtos es más frecuente en los sistemas que dependen de agentes de selección biótica comparados con sistemas polinizados por el viento (Barrett *et al.*, 1996; Goodwillie *et al.*, 2005). Sin embargo, la variación de las tasas de polinización por entrecruza y autocruza entre las poblaciones

y dentro de las especies no se correlaciona con el sistema de polinización que puede plasmarse en una filogenia (Whitehead *et al.*, 2018). Esto implica que la varianza del sistema de apareamiento puede evolucionar demasiado rápido o lento para reflejarse en una filogenia (Whitehead *et al.*, 2018). Entre algunos ejemplos de cactáceas con sistemas de apareamiento mixto podemos mencionar a *O. tomentosa* y a *Lophophora diffusa*. *Opuntia tomentosa* presentó un sistema de apareamiento mixto en la Reserva del Pedregal de San Ángel (Mandujano *et al.*, 2014). En este sistema de apareamiento, las abejas de los géneros *Diadasia*, *Lithurge* y *Megachile* promueven la entrecruza, pues la autopolinización no necesariamente necesita de un vector biótico. *Lophophora diffusa* presenta un sistema de apareamiento mixto dependiente de la melitofilia, ya que las abejas fungen como polinizadores efectivos y son necesarias para la fecundación (Briseño, 2016).

5.5 La eficiencia de la autopolinización en relación con la germinación de las semillas

El porcentaje de germinación que se obtuvo en este estudio fue mayor a lo reportado por del Castillo y Trujillo-Argüeta (2009), ya que se obtuvo 29% de germinación, mientras ellos obtuvieron únicamente alrededor del 10% de germinación. Las plantas de la población SNT tuvieron mayor porcentaje de germinación que las de MR, lo cual podría deberse a que los individuos de la población ginodioica poseen características de especialización en su reproducción. Husband y Schemske (1996), analizaron 62 especies de plantas autocompatibles y encontraron que, en comparación con la polinización cruzada, la autopolinización reduce la producción de semillas entre 20% y 87%. La variación en este porcentaje puede deberse a que las flores reciben polen proveniente de otras flores y polen de sus propias flores (Aizen y Harder, 2007).

La técnica más común para evaluar la limitación de polen en poblaciones naturales consiste en depositar mediante entrecruza una abundante cantidad de polen adicional sobre el estigma receptivo de las flores, dónde el estigma de una o más flores de la planta receptora fue expuesto previamente a polinización abierta o automática. Posteriormente se comparan los resultados del número de semillas producido a partir

de las plantas del tratamiento control y el suplemento de polen. Si el número de semillas es mayor en el tratamiento donde se añade polen extra, es posible concluir que hay limitación de polen (Knight *et al.*, 2006; Fishman y Willis, 2008). En este estudio no se pudo apreciar que existiera limitación por polen (Figura 14).

Una hipótesis evolutiva para explicar el sistema de apareamiento mixto de *O. robusta* es que esta especie proviene de un clado de diversificación temprana llamado Humifusa el cual es un grupo diploide, y posteriormente formaron un grupo con miembros tetraploides y octaploides conocido como la sección de las *Basilares*, el cual migró desde Sudamérica y permitió la diversificación del género *Opuntia* en Norteamérica (Griffith *et al.*, 2009; Majure *et al.*, 2012). Posteriormente, las plantas de *Opuntia* hibridaron y tuvieron una subsecuente poliploidización, la cual originó nuevas especies (Pinkava, 2002). Como otras especies del género, las poblaciones actuales de *O. robusta* posiblemente evolucionaron del hermafroditismo hacia el dioicismo por medio de la poliploidización.

La diversidad de sistemas reproductivos en las poblaciones de *O. robusta* podrían ser los vestigios de la ruta del hermafroditismo hacia el dioicismo (Spigler y Ashman, 2011; Ashman *et al.*, 2013; Dufaÿ *et al.*, 2014). Parte de los resultados que apoyarían esta hipótesis, es que la población hermafrodita (MR) tuvo un sistema de apareamiento autógeno facultativo, el número de óvulos fue mayor que en las poblaciones ginodioica (SNT) y trioica (Santa Rosa), pero con menor tasa de germinación de semillas, es decir, posee un sistema reproductivo que utiliza de manera menos eficiente los recursos disponibles para la reproducción.

6. CONCLUSIONES

El número de granos de polen y de óvulos en los individuos hermafroditas de la población ginodioica en Hidalgo coinciden con los resultados que se encontraron en la población trioica de Santa Rosa, San Luis Potosí. Esto posiblemente se deba a una especialización de la función reproductiva femenina en esta población. En la población MR de individuos hermafroditas, el número de óvulos fue 70% mayor, en comparación con la población SNT y la población Santa Rosa, lo cual podría sugerir que en esta población la función femenina tiene un costo más grande, aunque esto no se refleja en su tasa de germinación.

Antes de la apertura floral, el estigma frecuentemente ya estaba impregnado de polen, lo cual se demostró con el experimento de autopolinización automática, y esto podría favorecer la autofecundación. Las poblaciones de Hidalgo (MR y SNT) presentaron un periodo de floración largo, desde mediados de abril hasta principios de julio. Las flores en ambas poblaciones de Hidalgo tuvieron la misma hora de apertura (entre las 9 y las 10 de la mañana) y una hora de cierre floral similar (entre las 8 y las 9 de la noche).

Las flores abren en promedio de 2 a 3 días, durante los cuales los tépalos conservan la turgencia. En las tres poblaciones (MR, SNT y JRBC), la producción de néctar ocurre durante la mañana del primer día de apertura floral. Esto parece ser un carácter que se comparte en todas las poblaciones de *O. robusta*, ya que en la población trioica de Santa Rosa en San Luis Potosí la producción de néctar coincide con el mismo día de apertura floral (del Castillo y González-Espinosa, 1988). El volumen del néctar producido por los individuos hermafroditas en las poblaciones SNT y MR fue mayor que el producido por las hembras y los machos de la población dioica del JBRC, pero más diluido con respecto a las hembras.

La concentración de azúcares (grados Brix) en los individuos masculinos y femeninos de la población dioica de Querétaro, fue mayor en comparación a la concentración de azúcares en el néctar de los individuos hermafroditas en las poblaciones SNT y MR (Figura 7). Esto se debe a las presiones de selección ejercidas por las abejas como agentes de selección. Las hembras de la población dioica poseen

el mayor contenido calórico de una aproximación de la glucosa (disacárido), aunque en el néctar existe una mezcla de varios azúcares, lo cual puede deberse a que ellas necesitan atraer a los polinizadores para que se realice la fecundación cruzada.

El néctar de los individuos hermafroditas tuvo mayor contenido calórico que el néctar de las flores macho. La producción de néctar podría estar asociada a algún aspecto relacionado con los caracteres sexuales femeninos, pero esto requiere de estudios adicionales para comprobarse. Los polinizadores de *O. robusta* son abejas. En el caso de las poblaciones de Hidalgo y la de Querétaro, las abejas con más registros y que tocaron más veces el estilo y el estigma son las del género *Macrotera*. Existen registros de que este género de abejas también poliniza otras especies de cactáceas de la región, como *Opuntia heliabravoana* o *Lophophora diffusa*.

En las poblaciones SNT y MR se observó la presencia de coleópteros de los géneros *Trichochrous* y *Camptodes* que forrajeaban las recompensas florales, saturan el estilo y el estigma con polen de la misma flor, y mediante esta conducta pueden promover la autopolinización.

El logaritmo del cociente de polen/óvulos para la población MR sugiere un sistema de apareamiento autógamo facultativo y para la población SNT un sistema xenógamo facultativo; estos resultados apuntan hacia un sistema de apareamiento mixto. En la mayoría de los experimentos de polinización controlada, en comparación con el grupo control, el volumen de los frutos producidos y el número de semillas fue similar entre ellos, a excepción del experimento de entrecruza, que tuvo el menor número de semillas y el menor volumen en los frutos.

El porcentaje de germinación fue mayor en la población SNT (32.67 %) que en la población MR (26.32 %). Este resultado posiblemente se deba a que en la población SNT el ovario está más especializado ya que supuestamente es una población ginodioica. En ambas poblaciones de Hidalgo se encontró que los experimentos de autopolinización tuvieron el mayor porcentaje de germinación.

Perspectivas

En la población ginodioica SNT no se realizaron estudios de biología floral en los individuos femeninos debido a que durante diferentes años (2015, 2016) no fue posible encontrar las flores de las plantas femeninas en esta población. Adicionalmente, en la población dioica del JBRC tampoco se aplicaron muchas de las observaciones y experimentos necesarios para caracterizar la biología floral de estas plantas como la determinación del número de óvulos y granos de polen, la fenología floral, las polinizaciones controladas o la germinación de las semillas. Con la finalidad de intentar descubrir cuáles son las posibles adaptaciones de esta especie como un paso intermedio de la ruta evolutiva hacia el dioicismo, es primordial estudiar la biología floral tanto de los individuos femeninos en la población SNT, como en la población dioica de Cadereyta, lo que además complementaría de manera importante el trabajo que se realizó en esta tesis.

Respecto a los individuos hermafroditas de la población SNT, se encontró mayor porcentaje de germinación en los tratamientos de autopolinización, en el caso de que se realizaran experimentos con los individuos femeninos, posiblemente se encontraría que las fecundaciones cruzadas de las hembras darían lugar a la xenogamia facultativa que se esperaría por el cociente polen/óvulos propuesto por Cruden.

También es indispensable hacer un análisis más detallado de los componentes del néctar con técnicas como la cromatografía de gases-masas, por medio de cual, se podría conocer con exactitud la concentración de al menos tres de los azúcares principales que conforman la mezcla del néctar y permitiría realizar comparaciones con la mezcla de azúcares donde predomina la sacarosa, ya que esto apuntaría a la existencia de un síndrome de polinización con las abejas (Perret *et al.*, 2001).

Las poblaciones de *O. robusta* probablemente experimentaron un cambio en la composición de individuos en sus poblaciones y en el sistema reproductivo, aunque falta un estudio de genética poblacional para saber cuándo ocurrieron estos posibles cambios, lo que implica un cambio en el número y sexo de los individuos en tiempo evolutivo. La hipótesis que se debería explorar es que las poblaciones de *O. robusta* pasaron del hermafroditismo al dioicismo. Tomando en cuenta esta hipótesis sería

importante hacer un análisis genético para saber cuáles son los niveles de diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *O. robusta*, qué tan diferenciadas están dichas poblaciones y conocer si hubo o hay alguna poliploidía, la cual propiciara la evolución en los sistemas de apareamiento que vemos actualmente en las poblaciones de *O. robusta*.

7. LITERATURA CITADA

- Abarca G. C. A., López V. A. (2007).** La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. En Eguiarte L. E., Souza V., Aguirre–Dugua X, compiladores. *Ecología Molecular*. México, DF, Instituto Nacional de Ecología. 183-214.
- Airoldi C. A., Davies B. (2012).** Gene duplication and the evolution of plant MADS–box transcription factors. *Journal of Genetics and Genomics*, **39(4)**, 157–165.
- Aizen M. A., Harder L. D. (2007).** Expanding the limits of the pollen limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, **88(2)**, 271-281.
- Akaike H. (1974).** A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19(6)**, 716–723.
- Alanís-Flores G. J., Velazco-Macías C. G. (2008).** Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noreste de México. *Ciencia–UANL*, **9 (1)**, 11.
- Almeida O. J., Cota–Sánchez J. H., Paoli A. A. (2013).** The systematic significance of floral morphology, nectaries and nectar concentration in epiphytic cacti of tribes Hylocereeae and Rhipsalideae (Cactaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **15(5)**, 255–268.
- Altmann J. (1974).** Observational study of behavior: sampling methods. *Behaviour*, **49(3)**, 227-266.
- Allen G. A., Antos J. A. (1993).** Sex ratio variation in the dioecious shrub *Oemleria cerasiformis*. *The American Naturalist*, **141(4)**, 537-553.
- Anderson, E. F. (2001).** The cactus family. *Timber Press*, Portland, Oregón, USA.
- Anderson S. H., Kelly D., Ladley J. J., Molloy S., Terry J. (2011).** Cascading effects of bird functional extinction reduce pollination and plant density. *Science*, **331(6020)**, 1068–1071.
- Ángeles-Martínez A., Tovar–Olvera M., González–Cruz L., Bernardino–Nicanor A. (2007).** Obtención de un aderezo tipo mayonesa sin colesterol a partir del nopal (*Opuntia robusta* Wendl). *Memoria IV Encuentro: Participación de la mujer en la ciencia*. ISBN 978–968–9241–03–4

- Ashman T. L., Knight T. M., Steets J. A., Amarasekare P., Burd M., Campbell D. R., Dudash M. R., Johnston M. O., Mazer S. J., Mitchell R. J., Morgan M. T., Wilson W. G. (2004).** Pollen limitation of plant reproduction: Ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, **85(9)**, 2408-2421.
- Ashman T. L., Kwok A., Husband B. C. (2013).** Revisiting the dioecy-polyploidy association: alternate pathways and research opportunities. *Cytogenetic and Genome Research*, **140(2-4)**, 241-255.
- Ashworth, L., Galetto, L. (2002).** Differential nectar production between male and female flowers in a wild cucurbit: *Cucurbita maxima ssp. andreana* (Cucurbitaceae). *Canadian Journal of Botany*, **80(11)**, 1203-1208.
- Ávila Ramírez J. R. (2006).** Central regional de abasto y su impacto en el crecimiento económico del Municipio de Singuilucan Hidalgo. Tesis de licenciatura. *Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo*. Pachuca de Soto, Hidalgo. México, 196.
- Badano, E. I., Schlumpberger, B. O. (2001).** Sistema de cruzamiento y estimaciones en la eficiencia de polinización sobre *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) en dos poblaciones del noroeste Argentino. *Gayana. Botánica*, **58(2)**, 115-122.
- Barrett S. C., Eckert C. G. (2012).** Variation and Evolution of Mating Systems in Seed Plants. En Soichi Kawano, editor. *Biological approaches and evolutionary trends in plants*, San Diego California, Academic Press, 229.
- Barrett, S. C. H., Harder, L. D., Worley, A. C. (1996).** The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **351(1345)**, 1271-1280.
- Barrett S. C., Harder L. D. (2006).** David G. Lloyd and the evolution of floral biology: from natural history to strategic analysis. En Harder L, Barrett S. C., editores. *Ecology and evolution of flowers*. New York: Oxford University Press, 1–21.
- Bascompte J., Jordano P., Melián C. J., Olesen J. M. (2003).** The nested assembly of plant–animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **100(16)**, 9383–9387.

- Bastolla U., Fortuna M. A., Pascual–García A., Ferrera A., Luque B., Bascompte J. (2009).** The architecture of mutualistic networks minimizes competition and increases biodiversity. *Nature*, **458(7241)**, 1018.
- Bell C. D., Soltis D. E., Soltis P. S. (2010).** The age and diversification of the angiosperms re-revisited. *American Journal of Botany*, **97(8)**, 1296–1303.
- Bicknell R. A., Borst N. K., Koltunow A. M. (2000).** Monogenic inheritance of apomixis in two *Hieracium* species with distinct developmental mechanisms. *Heredity*, **84(2)**, 228.
- Bravo–Hollis H. (1978).** Las cactáceas de México I. *Universidad Nacional Autónoma de México*, Mexico City, Mexico.
- Bravo–Hollis H., Sánchez–Mejorada H. (1991).** Utilidad de las cactáceas. *Las cactáceas de México*. **3**, 501–535.
- Briseño M. I. (2016).** Estructura poblacional y biología de la reproducción de *Lophophora diffusa* (Croizat) Bravo (Cactaceae) en Querétaro, México. Tesis de Licenciatura, *FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México*, Los Reyes Iztacala, Estado de México, 86.
- Camacho-Velázquez A., Rios-Carrasco S., Vázquez-Santana S. (2016).** Biología reproductiva de la subfamilia Cactoideae (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **61(4)**: 100-127.
- Cano M. (2017).** Biología floral y uso de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. ex Pfeiff) Console (Cactaceae) en Cadereyta de Montes Querétaro, México. Tesis de Licenciatura, *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México*, Ciudad Universitaria, México, 90.
- Charlesworth D., Morgan M. T., Charlesworth B. (1990).** Inbreeding depression, genetic load, and the evolution of outcrossing rates in a multilocus system with no linkage. *Evolution*, **44(6)**, 1469–1489.
- Chittka L., Thomson J. D., Waser N. M. (1999).** Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften*, **86(8)**, 361–377.
- Cota–Sánchez J. H., Almeida O. J., Falconer D. J., Choi H. J., Bevan L. (2013).** Intriguing thigmonastic (sensitive) stamens in the Plains Prickly Pear *Opuntia polyacantha*

- (Cactaceae). *Flora–Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **208(5–6)**, 381–389.
- Cruden R. W. (1977).** Pollen–ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, **31(1)**, 32–46.
- Cruden R. W. (2000).** Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*, **222(1–4)**, 143–165.
- Cruz M., Casas A. (2002).** Morphological variation and reproductive biology of *Polaskia chende* (Cactaceae) under domestication in Central Mexico. *Journal of Arid Environments*, **51(4)**, 561–576.
- Cuevas García, E. y Abarca García, César A. (2006).** Origen, mantenimiento y evolución del Ginodioicismo. Boletín de la Sociedad Botánica de México, (78), 33-42.
- Dafni A. (1992).** Pollination ecology: a practical approach. Nueva York, *Oxford University Press*, 25–57, 127–149.
- Davies T. J., Barraclough T. G., Chase M. W., Soltis P. S., Soltis D. E., Savolainen V. (2004).** Darwin's abominable mystery: insights from a supertree of the angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **101(7)**, 1904–1909.
- de la Cuadra C. (1993).** Germinación, latencia y dormición de las semillas: Dormición en las avenas locas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General de Estructuras Agrarias. *Hojas divulgadoras*, 3.
- del Castillo R. F. (1986).** Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **31(1)**, 5-11.
- del Castillo R. F., González–Espinosa M. (1988).** Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia*, **(71)**, 185–196.
- del Castillo R. F., Trujillo- Argüeta S. (2009).** Reproductive implications of combined and separate sexes in a trioecious population of *Opuntia robusta* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, **96(6)**, 1148–1158.
- de Souza, C. S., de Alcântara, D. M. C., Dargas, J. H. F., Stefanello, T. H., de Barros, M. F., de Souza, E. B., & Neyra, M. O. C. (2016).** Composição e comportamento de visitantes florais de duas espécies herbáceas no Chaco úmido brasileiro. *Entomotropica*, **31**, 64-75.

- Díaz L., Cocucci A. A. (2003).** Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology* **5(5)**, 531–539.
- Doria J. (2010).** Generalidades sobre las semillas: Su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, **31(1)**, 74-85.
- Dreni L., Zhang D. (2016).** Flower development: the evolutionary history and functions of the AGL6 subfamily MADS–box genes. *Journal of Experimental Botany*, **67(6)**, 1625–1638.
- Dufaÿ M., Champelovier P., Käfer J., Henry J. P., Mousset S., Marais G. A. B. (2014).** An angiosperm–wide analysis of the gynodioecy–dioecy pathway. *Annals of Botany*, **114(3)**, 539–548.
- Ehrlich P. R., Raven P. H. (1964).** Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, **18(4)**, 586–608.
- Figueira, J. E. C., Vasconcellos-Neto, J., Garcia, M. A., de Souza, A. L. T. (1994).** Saurocory in *Melocactus violaceus* (Cactaceae). *Biotropica*, 295-301.
- Fisher, R. A. (1941).** Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics*, **11(1)**, 53-63.
- Fishman L., Willis J. H. (2008).** Pollen limitation and natural selection on floral characters in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *New Phytologist* **177(3)**, 802-810.
- Fuentes-Pérez, M., Terrazas, T., & Arias, S. (2009).** Anatomía floral de cinco especies de *Opuntia* (Opuntioideae, Cactaceae) de México. *Polibotánica*, **(27)**, 89-102.
- Galetti M., Dirzo R. (2013).** Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world. *Biological Conservation*, **163**, 1–6.
- Galetto L., Bernardello L. M. (1992).** Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. *Canadian Journal of Botany*, **70(6)**, 1101–1106.
- Gillespie J. H. (2004).** Population genetics: a concise guide. Segunda Edición, *Johns Hopkins University Press*.

- Gonzalez, A., Rowe, C. L., Weeks, P. J., Whittle, D., Gilbert, F. S., & Barnard, C. J. (1995).** Flower choice by honey bees (*Apis mellifera L.*): sex-phase of flowers and preferences among nectar and pollen foragers. *Oecologia*, *101*(2), 258-264.
- Goodwillie C., Kalisz S., Eckert C. G. (2005).** The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, *36*, 47–79.
- Grant, V., & Grant, K. A. (1979).** Pollination of *Echinocereus fasciculatus* and *Ferocactus wislizenii*. *Plant Systematics and Evolution*, *132*(1-2), 85-90.
- Grant, V., & Hurd, P. D. (1979).** Pollination of the southwestern opuntias. *Plant Systematics and Evolution*, *133*(1-2), 15-28.
- Griffin A. R. (1980).** Floral phenology of a stand of mountain ash (*Eucalyptus regnans* F. Muell.) in Gippsland, Victoria. *Australian Journal of Botany*, *28*(4), 393–404.
- Griffith M. P., Porter J. M. (2009).** Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal of Plant Sciences*, *170*(1), 107–116.
- Guzmán, U., Arias S., Dávila P. (2003).** Catálogo de cactáceas mexicanas. *Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.*
- Hernández R. (2016).** Biología reproductiva de *Opuntia cantabrigensis* Lynch (Cactaceae) en la localidad de Cadereyta de Montes Querétaro, México. Tesis de Licenciatura, *Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México*, 66.
- Holsinger K. E. (2000).** Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(13), 7037–7042.
- Husband B. C., Schemske D. W. (1996).** Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, *50*(1), 54–70.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). (1992).** Síntesis geográfica del Estado de Hidalgo. México, 134.
- Jain, S. K. (1976).** The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *7*(1), 469-495.

- Janczur M. K., Solano H. J. L., Ramos L. T. S., Mendoza-Reyes C. H., Cerro M. D. C. O., Berasain M. D. M., Czarnoleski M., Rivas-Manzano I. V., Manjarrez J., Villareal-Benítez J. L., Czarnoleski M. (2014).** Chemical and physical defense traits in two sexual forms of *Opuntia robusta* in central eastern Mexico. *PLoS ONE*, **9(3)**, e89535.
- Jing S. W., Coley, P. D. (1990).** Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer negundo*. *Oikos*, 369-377.
- Johnson S. D., Steiner K. E. (2000).** Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution*, **15(4)**, 140-143.
- Johnson, S. D., Steiner, K. E., & Kaiser, R. (2005).** Deceptive pollination in two subspecies of *Disa spathulata* (Orchidaceae) differing in morphology and floral fragrance. *Plant Systematics and Evolution*, **255(1-2)**, 87-98.
- Kearns C. A., Inouye D. W. (1993).** Techniques for pollination biologists. *University Press of Colorado*.
- King C., Ballantyne G., Willmer P. G. (2013).** Why flower visitation is a poor proxy for pollination: measuring single-visit pollen deposition, with implications for pollination networks and conservation. *Methods in Ecology and Evolution*, **4(9)**, 811–818.
- Knight T. M., Steets J. A., Vamosi J. C., Mazer S. J., Burd M., Campbell D. R., Dudash M. R., Johnston M. O., Mitchell R. J., Ashman T. L. (2005).** Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 467-497.
- Knight T. M., Steets J. A., Ashman T. L. (2006).** A Quantitative Synthesis of Pollen Supplementation Experiments Highlights the Contribution of Resource Reallocation to Estimates of Pollen Limitation. *American Journal of Botany*, **93(2)**, 271-277.
- Koltunow A. M. (1993).** Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *The Plant Cell*, **5(10)**, 1425.
- Lande R., Schemske D. W. (1985).** The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, **39(1)**, 24–40.
- Lloyd D. G., Webb C. J. (1992).** The evolution of heterostyly. En Barret S. C. H., editor. *Evolution and function of heterostyly*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 151–178.

- Majure L. C., Puente R., Griffith M. P., Judd W. S., Soltis P. S., Soltis D. E. (2012).** Phylogeny of *Opuntia* sp. (Cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany*, **99(5)**, 847–864.
- Mandujano M. C., Montaña C., Eguiarte L. E. (1996).** Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: why are sexually derived recruitments so rare? *American Journal of Botany*, **83(1)**, 63–70.
- Mandujano M. C., Golubov J., Montaña C. (1997).** Dormancy and endozoochorous dispersal of *Opuntia rastrera* seeds in the southern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments*, **36(2)**, 259–266.
- Mandujano, M. C., Carrillo-Ángeles, I., Martínez-Peralta, C., Golubov, J. (2010).** Reproductive Biology of Cactaceae, En Ramawat K. G., editor. Desert Plants. Berlín, Springer- Verlag, pp. 197-230.
- Mandujano M. C., Golubov J., Huenneke L. (2013).** Reproductive ecology of *Opuntia macrocentra* (Cactaceae) in the northern Chihuahuan Desert. *The American Midland Naturalist*, **169(2)**, 274–285.
- Mandujano M. C., Plascencia L., Aguilar G., Jiménez G., Galicia-Pérez A., Rojas-Aréchiga M., Martínez-Peralta C. (2014).** Sistema sexual de *Opuntia tomentosa* Salm–Dyck (Cactaceae, Opuntioideae) en un pedregal de origen volcánico. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **59(4)**, 100–120.
- Martínez–Peralta C. (2007).** Biología floral de *Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) Schumann (Cactaceae) en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Tesis de Licenciatura, *Universidad Nacional Autónoma de México*, Ciudad de México, 62.
- Martínez-Peralta C., Molina-Freaner F., Golubov J., Vázquez-Lobo A., Mandujano, M. C. (2014).** A comparative study of the reproductive traits and floral morphology of a genus of geophytic cacti. *International Journal of Plant Sciences*, **175(6)**, 663-680.
- Moreno, J. M. (2016).** Fórmulas generales para la determinación de áreas y volúmenes. *El Guiniguada. Revista de investigaciones y experiencias en Ciencias de la Educación*, **9**, 291-318.
- Maynard-Smith J., Price G. R. (1973).** The logic of animal conflict. *Nature*, **246(5427)**, 15.
- Maynard-Smith J. (1978).** The evolution of sex. Cambridge University Press, 20.

- Meagher T. R., Delph L. F. (2001).** Individual flower demography, floral phenology and floral display size in *Silene latifolia*. *Evolutionary Ecology Research*, **3(7)**, 845–860.
- Mondragon–Jacobó C., Bordelon B. B. (1996).** Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) breeding for fruit production. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, **1**, 19–35.
- Nassar J. M., Ramírez N. (2004).** Reproductive biology of the melon cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **248(1-4)**, 31-44.
- Negrón–Ortiz V. (1998).** Reproductive biology of a rare cactus, *Opuntia spinosissima* (Cactaceae), in the Florida Keys: why is seed set very low? *Sexual Plant Reproduction*, **11(4)**, 208–212.
- Nepi, M., Guarnieri, M., & Pacini, E. (2001).** Nectar secretion, reabsorption, and sugar composition in male and female flowers of *Cucurbita pepo*. *International Journal of Plant Sciences*, **162(2)**, 353-358.
- Oaxaca–Villa B., Casas A., Valiente–Banuet A. (2006).** Reproductive biology in wild and silvicultural managed populations of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53(2)**, 277–287.
- Palafox M. L. M., Jiménez–Sierra C. L., Golubov J., Mandujano M. C. (2017).** Reproductive ecology of the threatened "star cactus" *Astrophytum ornatum* (Cactaceae): a strategy of continuous reproduction with low success. *Botanical Sciences*, **95(2)**, 245–258.
- Passarelli, L., Bruzzone, L. (2004).** Significance of floral colour and scent in three *Solanum* sect. *Cyphomandropsis* species (Solanaceae) with different floral rewards. *Australian Journal of Botany*, **52(5)**, 659-667.
- Paulus, H. F. (2006).** Deceived males–pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Journal Europäischer Orchideen*, **38(2)**, 303-353.
- Percival M. S. (1961).** Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist*, **60(3)**, 235–281.
- Perret, M., Chautems, A., Spichiger, R., Peixoto, M., & Savolainen, V. (2001).** Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in *Sinningieae* (Gesneriaceae). *Annals of Botany*, **87(2)**, 267-273.

- Peterson, M. L., & Kay, K. M. (2014).** Mating system plasticity promotes persistence and adaptation of colonizing populations of hermaphroditic angiosperms. *The American Naturalist*, **185(1)**, 28-43.
- Pianka, E. R. (1970).** On r-and K-selection. *The American Naturalist*, **104(940)**, 592-597.
- Pinkava D. J. (2002).** On the evolution of the continental North American Opuntioideae. Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). Milborne Port, Dorset: David Hunt, *Succulent Plant Research*, **6**, 59–98.
- Piña H. H., Montaña C., Mandujano M. C. (2007).** Fruit abortion in the Chihuahuan–Desert endemic cactus *Opuntia microdasys*. *Plant Ecology*, **193(2)**, 305–313.
- Pyke G. H. (1978).** Optimal foraging in bumblebees and coevolution with their plants. *Oecologia*, **36(3)**, 281–293.
- Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E. (2005).** Biology of plants. 8a Edición. Editorial W. H. Freeman and Company Publishers. Estados Unidos, 864.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre J. R., Valiente-Banuet, A. (2006).** Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *Journal of Arid Environments*, **64(4)**, 549-585.
- Rezende E. L., Lavabre J. E., Guimarães P. R., Jordano P., Bascompte J. (2007).** Non–random coextinctions in phylogenetically structured mutualistic networks. *Nature*, **448(7156)**, 925.
- Richards A. J. (2003).** Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **358(1434)**, 1085–1093.
- Rico–Gray V., Oliveira P. S. (2007).** The ecology and evolution of ant–plant interactions. *University of Chicago Press*.
- Rodríguez-Ortega, C., Franco, M., & Mandujano, M. C. (2006).** Serotiny and seed germination in three threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Basic and Applied Ecology*, **7(6)**, 533-544.
- Rodríguez-Zapata O. (1981).** Fenología reproductiva y aporte de frutos y semillas en dos nopaleras del Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis de Doctorado. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. Nuevo León, Monterrey, México. 158.

- Rojas–Aréchiga M., Vázquez–Yanes C. (2000).** Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments*, **44(1)**, 85–104.
- Rojas–Aréchiga M., Batis A. (2001).** Las semillas de cactáceas, ¿forman bancos en el suelo. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **46**, 76–82.
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J. M., Quesada, M. (2014).** A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology letters*, **17(3)**, 388-400.
- Romero–López M. R., Balderas–Sosa M., González–Cruz L., Bernardino–Nicanor A. (2006).** Obtención de dulces a partir del nopal (*Opuntia robusta* wendl). *IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica*. ISBN 978–968–9241–03–4
- Rydin, C., & Bolinder, K. (2015).** Moonlight pollination in the gymnosperm *Ephedra* (Gnetales). *Biology letters*, **11(4)**, 20140993.
- Rzedowski. (2006).** Vegetación de México. 1^{ra} Edición Digital. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)*. México.
- Saavedra S., Stouffer D. B., Uzzi B., Bascompte J. (2011).** Strong contributors to network persistence are the most vulnerable to extinction. *Nature*, **478(7368)**, 233.
- Sánchez–Echeverría K., Castellanos I., Mendoza–Cuenca L. F. (2017).** Abejas visitantes florales de *Opuntia heliabravoana* en un gradiente de urbanización. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico-Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, **18(1)**, 27–34.
- Sandoval-Molina, M. A., Zavaleta-Mancera, H. A., León-Solano, H. J., Solache-Ramos, L. T., Jenner, B., Janczur, M. K. (2018).** First description of extrafloral nectaries in *Opuntia robusta* (Cactaceae): Anatomy and ultrastructure. *PlosOne*, **13(7)**, e0200422.
- Sandoval–Molina, M. A. (2019).** Interacción entre hormigas, insectos herbívoros y nectarios extraflorales en *Opuntia robusta*: una prueba de la función defensiva. Tesis de Maestría. *Instituto de Ecología A. C., Xalapa*. 93.
- Schemske, D. W., Lande, R. (1986).** Mode of pollination and selection on mating system: a comment on Aide's paper. *Evolution*, **40(2)**, 436-436.

- Segura, S., Scheinvar, L., Olalde, G., Leblanc, O., Filardo, S., Muratalla, A., Gallegos, C., Flores, C. (2007).** Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. *Genetic resources and crop evolution*, **54(5)**, 1033-1041.
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN).** Consultado 20-05-2015 en <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=hgo>
- Silvius, K. M. (1995).** Avian consumers of cardon fruits (*Stenocereus griseus*: *Cactaceae*) on Margarita Island, Venezuela. *Biotropica*, **27(1)**, 96-105.
- Shapiro M. S., Couvillon P. A., Bitterman M. E. (2001).** Quantitative tests of an associative theory of risk-sensitivity in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, **204(3)**, 565-573.
- Shishkova S., Las Peñas M. L., Napsucialy-Mendivil S., Matvienko M., Kozik A., Montiel J., Pattin A., Dubrovsky J. G. (2013).** Determinate primary root growth as an adaptation to aridity in *Cactaceae*: towards an understanding of the evolution and genetic control of the trait. *Annals of Botany*, **112(2)**, 239-252.
- Shivanna K. R., Tandon R. (2014).** Pollen-Pistil Interaction. En Shivanna K. R., Tandon R., editores. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: a manual*. Nueva Delhi, Springer, 97-105.
- Simpson B. B., Neff J. L. (1983).** Floral biology and floral rewards of *Lysimachia* (*Primulaceae*). *American Midland Naturalist*, 249-256.
- Spigler R. B., Ashman T. L. (2011).** Gynodioecy to dioecy: are we there yet? *Annals of Botany*, **109(3)**, 531-543.
- SPSS (2015).** IBM SPSS statistics for Windows. version 23.0. New York, IBM Corp.
- Trujillo-Argueta S., González-Espinosa M. (1991).** Hibridación, aislamiento reproductivo y formas de reproducción en *Opuntia* sp. *Agrociencia*, **1**, 39-58.
- Valiente-Banuet A., Arizmendi M. D. C., Rojas-Martínez A., Domínguez-Canseco L. (1996).** Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, **12(1)**, 103-119.

- Vamosi J. C., Otto S. P., Barrett S. C. (2003).** Phylogenetic analysis of the ecological correlates of dioecy in angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology*, **16(5)**, 1006-1018.
- Villers–Ruiz L., Trejo–Vázquez I. (2000).** El cambio climático y la vegetación en México. México: una visión hacia el siglo XXI. El cambio climático en México. *Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, US Country Studies Program*, 57–66.
- Whitehead M. R., Lanfear R., Mitchell R. J., Karron J. D. (2018).** Plant Mating Systems Often Vary Widely Among Populations. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **6**, 38.
- Wikström N., Savolainen V., Chase M. W. (2001).** Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **268(1482)**, 2211–2220.
- Wright S. I., Kalisz S., Slotte T. (2013).** Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. *Proceedings of the Royal Society B*, **280(1760)**, 20130133.
- Zamudio S. (1984).** La vegetación de la cuenca del Río Estórax, en el estado de Querétaro y sus relaciones fitogeográficas. Tesis de licenciatura. *Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.*, 275.