

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



COMPATIBILIDAD SEXUAL ENTRE MORFOESPECIES SILVESTRES Y CULTIVADAS DE NOPAL TUNERO

(Opuntia spp)

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
MARTHA SUSANA ZULOAGA AGUILAR
GUADALAJARA, JAL., NOVIEMBRE DE 1996

M. C. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ
DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante MARTHA SUSANA ZULOAGA AGUILAR código número 086549492. con el título COMPATIBILIDAD SEXUAL ENTRE MORFOESPECIES SILVESTRES Y CULTIVADAS DE NOPAL TUNERO (*Opuntia* spp), consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

ATENTAMENTE

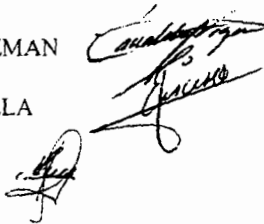
Guadalajara, Jal. a 18 de Septiembre de 1996

EL DIRECTOR DE TESIS


DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS

SINODALES

1. BIOL. ANA LILIA VIGUERAS GUZMAN
2. BIOL. IDELFONSO ENCISO PADILLA
3. ING. ROSA ELENA MARTINEZ



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por apoyarme durante toda la carrera sobre todo a mi mamá quién es la persona a quién más admiro.

A mi director de tesis el Dr. Eulogio Pimienta Barrios de quién he aprendido mucho, gracias por su apoyo y consejos.

A todos mis compañeros del laboratorio de Fisiología y Anatomía Vegetal por brindarme su amistad.

Al investigador M.C. José Luis Navarrete Heredia del Laboratorio de Colecciones Zoológicas por la identificación del material entomológico colectado.

A la Quim. Hilda Palacios investigadora del Instituto de Madera Celulosa y Papel de la UDEG por la toma de fotografías a placas permanentes.

A mis sinodales Biol. Ana Lilia Vigueras Guzmán, Biol. Idelfonso Enciso Padilla y al Ing. Rosa Elena Martínez por sus importantes y valiosos comentarios para mejorar aún más el presente trabajo.

Agradezco de todo corazón la amistad y sincero apoyo de mis compañeros de carrera Susana Valencia, David Hernández, Martín Vázquez y en especial a Tito Livio Pérez Vivar quién muy a su manera nunca me ha dejado ser mediocre, gracias por ser tan enfadoso.

Y a todas aquellas personas y amigos que en su momento me apoyaron y que con el tiempo, mal hace uno en olvidar.

Este trabajo lo dedico a
todos los que se han casado con la ciencia
cualesquiera que ésta sea.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE CUADROS.....	II
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. HIPOTESIS.....	3
4. REVISION DE LITERATURA	
4.1 Antecedentes.....	4
4.2 Clasificación.....	6
4.3 Morfología y Anatomía.....	6
4.4 Fisiología.....	9
4.5 Flor.....	10
4.5.1 Diferenciación del Gametofito Masculino.....	11
4.5.2 Diferenciación del Gametofito Femenino.....	12
4.6 Biología Floral.....	14
4.7 Polinización.....	17
4.8 Fase Progámica.....	22
4.8.1 Viabilidad del Polen.....	22
4.8.2 Receptividad del Estigma.....	24
4.8.3 Germinación del Polen.....	25
4.8.4 Desarrollo del Tubo Polínico.....	27
4.8.5 Fecundación del Saco Embrional y Eventos de Post-fertilización.....	30
4.8.6 Desarrollo del Proembrión.....	33
4.9 Descripción de las Morfoespecies Empleadas.....	35
4.10 Mecanismos de Aislamiento.....	37
4.10.1 Aislamiento Reproductivo Externo.....	40

4.10.2 Aislamiento Reproductivo Interno.....	42
4.10.2.1 Incompatibilidad Sexual.....	43
4.10.2.1.1 Sistema de Incompatibilidad Sexual Gametofítico.....	47
4.10.2.1.2 Sistema de Incompatibilidad Sexual Esporofítico.....	50
4.11 Coexistencia.....	51
4.12 Especiación.....	52
4.12.1 Especiación por Hibridación.....	53
4.13 Hibridación Natural.....	53
5. MATERIALES Y METODOS	
5.1 Descripción del Area de Estudio.....	56
5.2 Biología Floral.....	56
5.3 Tratamientos de Polinización.....	57
5.5 Desarrollo de Tubos Polínicos y Fecundación de los Ovulos.....	60
5.6 Método Estadístico.....	61
6. RESULTADOS Y DISCUSION	
6.1 Biología Floral.....	62
6.2 Polinización.....	63
6.3 Germinación de los Granos de Polen.....	67
6.4 Desarrollo de los Tubos Polínicos.....	69
6.5 Fecundación y Eventos de Post-fecundación.....	74
6.6 Incompatibilidad Sexual.....	81
7. CONCLUSIONES.....	83
8. LITERATURA CITADA.....	84

INDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.- Síntesis de la Megasporogénesis
y Megametogénesis.....pag 13
- FIGURA 2.- Períodos de floración de algunos
miembros del subgénero *Opuntia*.....pag 15
- FIGURA 4.- Abultamiento y deformación
del ápice de los tubos polínicos
en el tejido estilar en el tratamiento
de autopolinización.....pag 72
- FIGURA 5.- Tubo polínico penetrando por el micropilo del óvulo 72
h después de la polinización en el tratamiento de
Polinización Cruzada ("Burróna" ♂ x "Cardona" ♂).....pag 72
- FIGURA 6.- Nucleos del endospermo celular o libre en óvulos 72 h
después de la apertura floral en el tratamiento de
Autopolinizaciones.....pag 76
- FIGURA 7.- Desarrollo de las papilas dorsales..
después de la Polinización Cruzada ("Burróna" ♂ x
"Xoconoxostle" ♂).....pag 76
- FIGURA 8.- Semillas abortivas colectadas 30 días después de la
polinización cruzada ("Burróna" ♂ x "Cardona" ♂).....pag 77
- FIGURA 9.- Semilla abotiva en la se aprecia las primeras
divisiones el proembrión 30 días después de la Polinización
Cruada ("Burróna" ♂ x "Cardona" ♂).....pag 77



INDICE DE CUADROS

CUADRO 1.- Clasificación de los Mecanismos
de Aislamiento de las Plantas..... pag 38

CUADRO 2.- Número de tubos polínicos en la base del estilo
a diferentes intervalos de tiempo..
polinización en diferentes tratamientos
polinización.....pag 74

RESUMEN



BIBLIOTECA CENTRAL

En este trabajo se abordó el tema sobre aislamiento reproductivo, de nopal (*Opuntia* spp) en morfoespecies silvestres y cultivadas para lo cual se realizaron cruza interespecíficas. Se emplearon seis tratamientos: 1. Polinización libre; 2. Autopolinización; 3. Polinización Cruzada entre "Burrona" x "Xoconostle" ; 4. Polinización Cruzada entre "Burrona" x "Cardona" ; 5. Emascular y cubrir; y 6. Emascular sin cubrir. Para las cruza se utilizó la técnica de emasculación y polinización artificial. En la evaluación del grado de aislamiento reproductivo se estudiaron las siguientes variables: número de tubos polínicos en la base del estilo, la expresión de anomalías en los tubos polínicos características del fenómeno de la incompatibilidad sexual; fecundación del óvulo, eventos de post-fecundación, como es el caso, del desarrollo del endospermo; desarrollo del proembrión y la aparición de las papilas dorsales en la epidermis dorsal de la cobertura funicular.

Los resultados obtenidos revelaron que el aislamiento reproductivo se manifiesta en la fase post-cigótica, ya que no se observaron fenómenos histológicos de incompatibilidad durante el desarrollo de los tubos polínicos en el estilo, pero si anomalías en el desarrollo del embrión y el endospermo tanto en estadios

tempranos después de la fecundación, como en estadios avanzados, lo cual conduce a la abscisión de frutos.

1. INTRODUCCION

El nopal tunero (*Opuntia* spp) es una planta nativa de las zonas áridas y semiáridas de México, su cultivo es muy apreciado por los pobladores de dichas zonas, debido a su alta productividad y a su diversidad de usos, ya que se aprovechan tanto los cladodios jóvenes y maduros como el fruto. Además, es una planta que está adaptada a los ambientes áridos, sobresaliendo de otras que coexisten con ella. Una de las características notables de las poblaciones del subgénero *Opuntia* es el polimorfismo, el cual se aprecia al estudiar las poblaciones silvestres de solar y cultivadas (Pimienta, 1990). Esta diversidad se ha constatado a través de estudios morfológicos, citogenéticos, químicos, biogeográficos, fenológicos y de biología reproductiva. El polimorfismo se puede explicar, en gran parte, a la existencia de flujo genético en las poblaciones naturales de *Opuntia* (Grant y Grant, 1979a, 1989b; Rodríguez, 1981; Peralta, 1983; García, 1984; Gibson y Nobel, 1986; Trujillo, 1991). Por lo cual se considera que en esta especie, la hibridación natural es común, debido a que los mecanismos de aislamiento reproductivo se encuentran en proceso de desarrollo. En este trabajo uno de los objetivos principales es la caracterización histológica de los mecanismos de aislamiento reproductivo pre-cigóticos y post-cigóticos a través del estudio

del desarrollo de tubos polinicos y del embrión en tratamientos de polinización compatibles e incongruentes.

2. OBJETIVO

Evaluar el grado de compatibilidad sexual interespecífica, entre morfoespecies silvestres y cultivadas de nopal (*Opuntia spp.*).

3. HIPOTESIS

Los miembros del subgénero *Opuntia* presentan un amplio grado de variación en los atributos fenológicos y caracteres anatómicos y morfológicos en partes vegetativas y reproductivas, por lo que es de esperarse que esta variabilidad se deba a que existe un activo flujo genético activo entre morfoespecies cultivadas y silvestres.

4. REVISION DE LITERATURA

4.1 Antecedentes

Existen varios trabajos en los cuales se expone la amplia variación, tanto en aspectos morfológicos como fisiológicos, que existe entre las diferentes poblaciones de *Opuntia*, como en el caso del estudio realizado por Peralta (1983) en la cual se describe las diferentes formas silvestres y cultivadas de nopal que se desarrollan en el Altiplano Potosino-Zacatecano. Estas formas difieren en sus hábitos de crecimiento, morfología, fenología y en los componentes del fruto maduro. En estudios similares realizados por Orea (1986) caracterizó la variación morfológica en nopales silvestres y encontró que la morfoespecie más abundante es el nopal "Cardón" (*Opuntia streptacantha*)Lemaire, la abundancia de esta favorece el intercambio genético con otras especies de *Opuntia*, que junto con otras especies contribuye a la diversificación genotípica y fenotípica de las poblaciones silvestres. De igual manera, existen variaciones anatómicas-fisiológicas (López, 1991; Pimienta et.al., 1993). Esta variación se observa también en los periodos de maduración, peso de fruto, color y composición química de la pulpa y la semilla (Mauricio, 1985; Pimienta et al., 1987). Estas evidencias sugieren que existe un flujo genético real entre las diferentes especies de *Opuntia*. Es decir, que esta variación es el

resultado de una hibridación natural entre las semiespecies simpátricas de *Opuntia* como lo afirma Grant y Grant (1979b, 1980).

De acuerdo a un estudio realizado por García et al., (1984) sobre patrones de polinización y fenología floral en poblaciones de *Opuntia*, concluyen que la variabilidad en este género puede deberse a la ocurrencia de hibridación introgresiva entre formas simpátricas. El intercambio genético es efectuado por la conducta de forrajeo de los insectos visitantes, que dependen de la distribución y abundancia de los recursos florales básicos: polen y néctar. Se sugiere que el flujo genético, en cuanto a su componente por polinización, puede ser mayor en poblaciones marginales y entre aquellos individuos de *Opuntia* que florecen al inicio y final del período de floración. Estudios de polinización en especies del género *Opuntia* realizados por Grant (1979a y b) muestran que éstas no presentan barreras interespecificas de polinización e hibridizan en forma natural. Por otro lado, no se observa depresión por xenogamia entre las cruces de *O. streptacanta* (Lemaire) x *O. robusta* (Wendland) y *O. leucotricha* (Wendland) x *O. Cochineria* (Griffiths) en plantulas por aislamiento reproductivo (Trujillo, 1986). Muñoz (1995) estudiando la variación morfológica, hábito de crecimiento, y otros componentes distintivos, entre diferentes miembros del subgénero *Opuntia*, sugiere que las morfoespecies

"Burróna" y "Chapeada" puedan ser híbridos con retrocruza hacia *O. megacatha* o que sean simplemente cultivares, por lo cual son necesarios más estudios sobre aislamiento reproductivo (Muñoz, 1995).

4.2. Clasificación

A pesar de que se han realizado estudios de taxonomía en el subgénero *Opuntia*, ésta es aún confusa porque la mayoría de las descripciones se realizaron con base a un sólo ejemplar, sin considerar la variabilidad existente en su habitat original. Esto ha ocasionado diferenciación de especies, que en realidad, no son más que variedades, formas geográficas, híbridos, etcétera (Bravo, 1978b).

Los nopales tuneros pertenecen a la familia Cactaceae, subfamilia Opuntioideae, tribu Opuntieae, género *Opuntia* y subgénero *Opuntia* (Bravo, 1978a)

4.3 Morfología y Anatomía

Las especies del subgénero *Opuntia* pueden ser rastreras, arbustivas y arborescentes. Los cladodios o tallos, son aplanados y pueden ser de forma lanceolada, elíptica, ovobada, y hasta

suborviculares. El fruto de *Opuntia* es considerado como una baya unilocular, polispérmica y carnosa (Bravo, 1978a). Los frutos son globosos, ovoides y turbinados (Bravo, 1978a) a menudo espinoso o cerdoso (Pimienta 1990).

En estudios anatómicos sobre el desarrollo de la porción comestible del fruto (pulpa) se encontró que ésta se origina de células papilares de la epidermis dorsal de la envoltura funicular y el funículo. La envoltura funicular constituye el 90% de la parte comestible y el funículo con el 10%. Estudios anatómicos comparativos entre la cáscara y el cladodio mostraron que anatómicamente son similares, por lo que se considera que la cáscara (receptáculo) es como un tallo modificado (Pimienta y Engleman, 1985).

En el nopal tunero una modificación importante para enfrentar condiciones adversas es la reducción de la lámina foliar y lo efímero de éstas. Las hojas son generalmente escuamiformes o planas y carnosas muy reducidas (Pimienta, 1990). Estas se diferencian durante el desarrollo de los cladodios jóvenes (brotes internos) y después de 30 a 40 días, las hojas se desprenden del cladodio y son reemplazadas por las espinas (Pimienta, 1990). Las espinas son consideradas como hojas modificadas esclerificadas, que se originan de estructuras vegetativas llamadas aréolas (Buxbaum, 1955; Bravo, 1978a). Las aréolas se consideran como homólogas de las yemas



axilares de otras dicotiledóneas (Boke, 1980). Además de las hojas de las aréolas se originan las flores, tallos, espinas, tricomas y raíces adventicias (Buxbaum, 1955; Bravo, 1978a; Boke, 1980).

Otra adaptación importante en esta planta se localiza en la epidermis de los cladodios, que se encuentra revestida de una cutícula gruesa que le protege de la evaporación (Conde, 1975). Debido a que el tallo es el principal órgano fotosintético del nopal, su epidermis contiene un número de estomas que participan en el intercambio de gases (CO_2 y H_2O) entre la planta y la atmósfera. Estudios llevados a cabo en Laboratorio de Anatomía y Fisiología Vegetal de la Universidad de Guadalajara han revelado que la mayoría de las morfoespecies de nopal tunero presentan estomas hundidos (Pimienta, 1990). Debajo de la epidermis de los cladodios se distingue una capa de células de color verde intenso que constituye el tejido de clorénquima, y que debe su color al abundante contenido de cloroplastos en sus células. En este tejido es donde se realiza la fotosíntesis. En la porción interna de los cladodios, se encuentra un cilindro de células blancas que deben su color al reducido número de cloroplastos y a la presencia de vacuolas grandes, las cuales ocupan el 95% del volumen celular (Gibson y Nobel, 1986). Técnicamente a este tejido se le conoce con el nombre de parénquima medular, siendo su principal función el almacenamiento de agua; este tejido imparte el carácter de succulencia en el nopal (Pimienta, 1990).

4.4 Fisiología

Una de las adaptaciones del nopal a las condiciones áridas y semiáridas más importantes, es su proceso fotosintético denominado metabolismo ácido crasuláceo (MAC). Este tipo de fotosíntesis se distingue de la mayoría de las plantas en que los estomas se encuentran cerrados durante el día y abiertos en la noche, cuando la temperatura y el déficit de presión de vapor son ordinariamente bajos. En la fotosíntesis MAC, el CO_2 del aire es fijado a ácido málico durante la noche, este ácido se almacena en las vacuolas de las células de la corteza. Durante el siguiente período de luz, el ácido málico es liberado de las vacuolas y descarboxilado en el citoplasma para liberar CO_2 , el cual es finalmente refijado y reducido en los cloroplastos por medio del ciclo de Calvin, una de las ventajas de esta ruta metabólica es que se abate la pérdida de agua por transpiración (Kluger y Ting 1978; Whitting et al., 1979).

Además de su tolerancia a la sequía, las especies del género *Opuntia* se consideran resistentes a temperaturas extremas. La mayoría de los vegetales presentan temperaturas foliares cercanas a las del ambiente en que se desarrollan; en contraste con especies de *Opuntia*, la temperatura de los tallos fotosintéticos llega a ser 15°C superior a la del ambiente, indicando que estas plantas tienen la capacidad de soportar el calor en lugar de evitarlo (Gates, et

al., 1968). La succulencia de estas plantas les ayuda a adaptarse en ambientes con lluvias esporádicas y escasas, debido a su gran capacidad de almacenamiento de agua. Sin embargo, el grosor de los cladodios (pencas) afecta su actividad fotosintética, ya que la radiación fotosintética activa no puede transmitirse a través de la penca. Esta característica contrasta con las hojas de las plantas con fotosíntesis C_3 y C_4 , cuyas hojas son delgadas y la radiación solar logra penetrar a través del mesófilo; además, las hojas de estas especies son relativamente flexibles y su orientación puede ser cambiada por el viento, mientras que en el nopal los órganos fotosintéticos son fijos y persistentes (Nobel, 1982).

4.5 La Flor

Las flores de nopal son hermafroditas, pues en la misma flor se encuentran los órganos reproductores de los dos sexos (androceo y gineceo), aunque en el nopal conocido vulgarmente como "tapón" (*O. robusta*) es frecuente encontrar el fenómeno de dioecia, es decir, la presencia de flores unisexuales, ya que presentan flores macho o hembra, en las que no se diferencian el carpelo o los estambres (Felipe, 1986). Las yemas florales nacen en las aréolas del borde superior de las pencas aunque a veces brotan en las aréolas del limbo, hacia el extremo apical (Pimienta 1990). Las

flores son solitarias, vistosas, actinomorfas o casi zigomórficas, mostrando una transición gradual de sépalos a pétalos. Cáliz a menudo petaloide, pétalos epiginios en varias series. Androceo de numerosos estambres, epipétalos o insertos en la base de los pétalos, en cantidades que oscilan entre 480-500 en *O. robusta* y se encuentran insertos en la cavidad receptacular u "ombbligo" (Pimienta, 1990).

El gineceo consta de un pistilo compuesto de cuatro carpelos unidos, con un lóculo, presenta un ovario ínfero y numerosos óvulos en placentación parietal (Bravo, 1978a; Jones, 1987 citado por Pimienta, 1990; Pimienta y Engleman, 1981). El estilo es ensanchado en la base y termina en un estigma lobulado amplio; es hueco y presenta un canal con epidermis glandular en la que se desarrollan los tubos pólinicos. El ovario está rodeado por un tejido vegetal llamado receptáculo, el cual al madurar el fruto constituye la cáscara (Pimienta et al., 1985).

4.5.1 Diferenciación del Gametofito Masculino

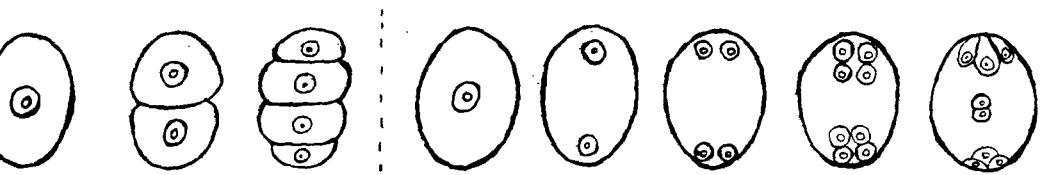
Cuando la flor llega a su madurez, se promueve una alta actividad en las partes sexuales. El desarrollo secuencial en las anteras de los estambres y la formación de los granos de polen

llevando los núcleos espermáticos, es llamado microsporogénesis (Saigo y Saigo, 1983).

El desarrollo del tejido esporógeno en las anteras envuelve ciertos fenómenos característicos de la formación de la pared (Esau, 1965). Durante la formación de la pared del esporangio las células pueden dividirse en varios planos, finalmente separándose una de otra y así funcionar como microsporofito o célula madre del polen. Cada microsporofito funcional por medio de meiosis, da lugar a una tétrade de microsporas haploides (Foster y Gifford, 1959). Los núcleos (n) de cada microspora se dividen por meiosis produciendo dos núcleos o núcleos del tubo (n) y un núcleo generativo (n) (Saigo y Saigo, 1983). Cuando la meiosis empieza, un par de células es formada alrededor de cada microsporofito y más tarde una pared de composición similar delimita cada microspora en la tétrade (Foster y Gifford, 1974).

4.5.2 Desarrollo del Gametofito Femenino.

Las divisiones mitóticas del megasporofito (célula madre de la megaspora) se considera como el primer evento en el desarrollo del saco embrional maduro (Rost et al., 1985), proceso llamado megasporogénesis.



Una sola célula madre de la megaspora sufre meiosis y produce una tétrade lineal, (Weisz y Fuller, 1978), es decir cuatro megasporas haploides (Saigo y Saigo 1983).

Esta hilera de cuatro células se produce en la nucela y son llamadas megasporas (Rost et al., 1985). En la mayoría de los casos, tres de las cuatro células haploides degeneran (Weisz y Fuller, 1978) la restante, que es la funcional, incrementa su tamaño y volumen (Saigo y Saigo, 1983). Posteriormente la megáspora funcional sufre tres divisiones lo cual da origen a ocho núcleos, de éstos cuatro se sitúan en un extremo de la célula y cuatro en el otro. Después, tres de cada grupo de cuatro son separados por la formación de paredes como células, las dos restantes, emigran hacia el centro, lo que da origen a una séptima célula grande en la parte media. De las tres células gametofíticas situadas del lado del micrópilo, una se convierte en la ovocélula (Weisz y Fuller, 1978).

FIGURA 1. Síntesis de la
Megasporogénesis y Megametogénesis (Foster y Gifford, 1974)

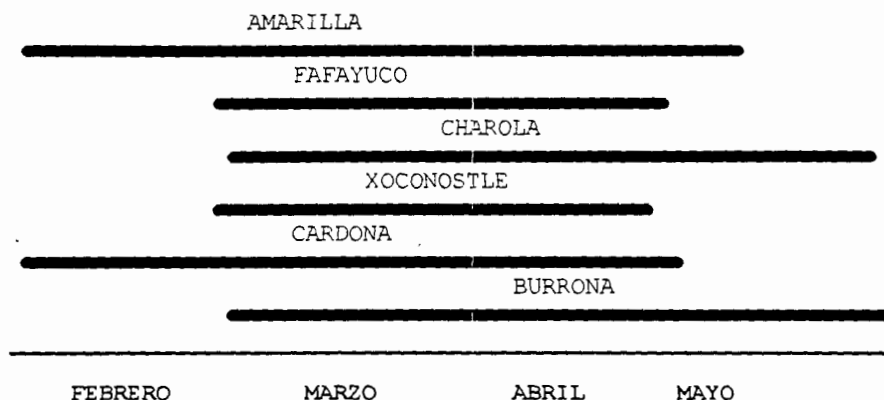
El saco embrionario maduro, es una estructura de siete células, del lado del micrópilo se diferencian la ovocélula la cual esta con dos células llamadas sinérgidas. A este conjunto de células se les denomina aparato huevo. Los dos núcleos que se desplazan hacia el centro, acercándose uno al otro, se denominan núcleos polares, haciéndose encerrar por una membrana celular y forma una célula binucleada conocida como célula central o célula madre del endospermo (Saigo y Saigo, 1983; Rost et al., 1985). Los tres núcleos restantes que se localizan en el extremo del saco embrionario y lejos del micrópilo forman las células antípodas (Fig.1) (Rost et al., 1985).

4.6 Biología Floral

En la mayoría de los miembros del subgénero *Opuntia* la floración ocurre durante los meses de abril y mayo, en las formas y variedades silvestres y cultivadas que se desarrollan en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Jalisco. En los estados de México, Hidalgo y Puebla la floración ocurre más temprano (febrero, marzo y abril), y en ocasiones aparecen flores aisladas durante el transcurso del verano (Fig.2) (Pimienta, 1990).

aspecto distintivo de la flor del nopal es que es efimera: se abre y se cierra el mismo día; este comportamiento contrasta con el de la mayoría de las plantas en que las flores que se abren permanecen abiertas hasta que se transforman en fruto u ocurre la abscisión (Pimienta, 1990).

FIGURA 2. Periodos de floración de algunos miembros del subgénero *Opuntia* en el Antiplano Potosino-Zacatecano.



Fuente: (Peralta, 1983; Pimienta, 1990).

Se distinguen dos tipos de flores (flores tipo "A" y tipo "B"), en relación con la hora del día en que ocurre la apertura y el tiempo que permanecen abiertas. Las flores en su mayoría presentan comportamiento tipo "A" las que inician su apertura a las 9 h; este proceso dura aproximadamente dos horas, de manera que a

las 11 h se encuentran completamente abiertas. El cierre ocurre a partir de las 18 h, siendo éste rápido, ya que generalmente a las 19 h las flores se encuentran cerradas. Las flores clasificadas como tipo "B" empieza la apertura a las 15 h, abren completamente a las 16 h, y se cierran a las 19 h. Estas flores se abren de nuevo al siguiente día empezando la apertura y el cierre de igual manera que las flores clasificadas tipo "A". Un número relativamente bajo de las flores en una planta madura de nopal muestra este tipo de comportamiento (Pimienta, 1990).

Las flores de nopal tunero son visitadas por diferentes tipos de insectos a partir de las 10 h y se reduce a partir de las 16 h. La actividad de los insectos a las horas indicadas disminuye considerablemente cuando ocurren vientos fuerte o cuando se producen nublados (Pimienta, 1987b).

Las flores efímeras son comunes en bosques tropicales secos, aparentemente este comportamiento reduce la pérdida de agua por la transpiración en las flores debido a que éstas se abren y se cierran el mismo día. Es probable que en la caso del nopal tunero, la corta apertura de sus flores sea uno de los mecanismos que la planta usa para reducir la pérdida de agua. Otra explicación probablemente se relaciona con el estigma, que es del tipo húmedo; en este tipo de estigmas la receptividad mengua cuando prevalecen temperaturas altas y vientos secos durante la apertura de la flor, condiciones ambientales que son comunes en las zonas áridas y

semiáridas, por lo que potencialmente pueden causar desecación del estigma y por consiguiente restringir la germinación del grano de polen (Rosas, 1984).

Un aspecto interesante de algunas especies de nopal tunero es la dehiscencia de las anteras antes de la apertura de la flor, y que ha sido caracterizado como cleistogamia preantesis. En este caso, cuando la flor se abre, la porción basal del estigma se encuentra cubierto por granos de polen, algunos de los cuales ya han empezado a germinar, ésto se debe a que el estigma es receptivo antes de la apertura floral (Rosas, 1984).

4.7 Polinización

La polinización es la primera fase del proceso de reproducción sexual. Y se define como la transferencia de los gametos masculinos o granos de polen del centro de producción, situado en los microesporangios de las anteras, a la superficie del carpelo (estigma) (Kapil y Bhatnagar, 1975; Linskens, 1976). El proceso de reproducción sexual empieza con la dehiscencia de las anteras, que dan origen a la liberación de los granos de polen. A diferencia de las gimnospermas (en las cuales el óvulo es polinizado directamente) en las angiospermas la polinización involucra la transferencia de granos de polen por agentes externos

de la antera abierta al estigma receptivo del carpelo. Se han registrado diferencias en la duración del período de dehiscencia entre diferentes especies. Este período se puede prolongar hasta por 26 días como en el caso de *Helleborus* (Free, 1970) en contraste con *Opuntia ficus-indica* (web), que dura aproximadamente de 6 a 8 horas (Pimienta et al., 1985; Rosas y Pimienta, 1986). Desde el punto de vista de eficiencia en el forrajeo es lógico suponer que las flores con períodos largos de dehiscencia son más adecuados para asegurar la polinización cruzada que las flores que producen todo su polen en períodos cortos (Pimienta, 1990a).

Los agentes polinizadores se clasifican en dos grupos: abióticos y bióticos; los primeros son: viento, agua y lluvia; en tanto que los segundos están representados por insectos, pájaros y mamíferos pequeños como los murciélagos (Pimienta, 1987).

La polinización efectuada por la acción del viento se denomina "anemófila" y la que es realizada a través de los insectos se denomina "entomófila". La polinización también es realizada por aves y se le conoce como "ornitófila" (Percival, 1969).

En la mayoría de las especies con polinización entomófila las abejas son consideradas como los insectos polinizadores más

importantes, sin embargo, existen otros insectos que participan en la polinización de las flores (Free, 1970; Hopping y Jerram, 1980).

La dispersión de polen por insectos es afectada por las condiciones climáticas prevalecientes durante la floración. La actividad de los insectos disminuye considerablemente cuando las condiciones atmosféricas son desfavorables (viento, lluvias y temperaturas bajas). Durante periodos de climas desfavorables para la actividad de las abejas domésticas, los insectos silvestres o nativos son observados visitando las flores de especies frutales. En general, se considera que los insectos silvestres son menos sensitivos a los cambios de clima que las abejas domesticadas (Pimienta, 1987).

Existen muchas evidencias que sugieren que la polinización biótica ha desempeñado un papel importante en el establecimiento y la diversidad de las angiospermas (Crepet, 1983), ya que en ocasiones en la mayoría de las especies, la reproducción está limitada por la actividad de los polinizadores (Byerzychdek, 1980). En términos de estrategias reproductivas, la polinización biótica dirigida en la misma especie es la más eficiente en términos de inversión de energía en el sistema reproductivo (Linskens, 1983).

La autopolinización por contacto es común que ocurra en las flores de *Opuntia*. Al empezar la apertura de las flores, los estambres se encuentran firmemente agrupados alrededor del estilo,

con los verticilos de los estambres internos en contacto con la porción basal del estigma; en este momento los estambres se encuentran en una posición inferior con respecto al estilo, cuando la flor abre completamente, los estambres quedan separados entre sí y del estilo; en este momento la porción basal del estigma se encuentra cubierta de polen que proviene principalmente de las anteras que se encontraban en contacto con el estigma al empezar la apertura de la flor (Pimienta,1990)

Una vez que la flor abre completamente, es polinizada la porción superior del estigma. El origen del polen en la porción superior es diverso y puede ser debido a la transferencia por insectos de polen de plantas distintas (polinización cruzada), o bien por autopolinización estimulada por el movimiento de los estambres, causada por los insectos en su búsqueda de nectarios, éstos causan desplazamiento lateral que induce autopolinización por contacto entre las anteras y el estigma (Rosas, 1984).

Se ha observado, además, que factores ambientales como el viento, estimulan la autopolinización al causar movimiento de estambres en flores abiertas, aunque es importante mencionar que el viento puede reducir la actividad de los insectos polinizadores (Rosas, 1984).

El estigma de las flores de *Opuntia* tiene una estructura adecuada para el aterrizaje de los insectos, al estar situado en la

mayoría de los casos en una posición superior a la de los estambres. Estas flores son visitadas principalmente por coleópteros, lepidópteros, dípteros e himenópteros, considerándose a las abejas y escarabajos como los principales insectos polinizadores de *Opuntia* (Grant y Grant 1979a y b). En estudios recientes de polinización por insectos, en poblaciones silvestres de nopal tunero en el Altiplano Potosino-Zacatecano revelaron que el principal polinizador es la abeja de hábitos solitarios *Diadasia rinconis* (García, 1984).

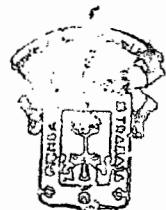
Las observaciones anteriores indican que en los estigmas de nopal ocurre tanto la autopolinización como la polinización cruzada. No obstante, existen diferencias en el tiempo y en el sitio del estigma en que ambos tipos de polinización ocurre. La autopolinización empieza en el momento de la apertura (polinización por contacto) y continúa en la flor abierta (autopolinización por insectos y por el viento). La polinización cruzada es llevada a cabo principalmente por insectos (abejas). En ambos casos, el polen se puede depositar en la porción superior del estigma (Pimienta et al., 1985). Con respecto a la importancia del viento en la polinización cruzada, ésta no se ha cuantificado (Pimienta, 1990).

4.8 Fase Progámica

La fase progámica incluye todos los procesos que se inician desde el momento en que los granos de polen llegan al estigma y termina al tiempo en que el esperma fecunda la célula huevo (Polyakov, 1964 citado por Linskens, 1976). La fase progámica concierne diferentes procesos como la adhesión del grano de polen en los fluidos del estigma; germinación del grano de polen; relaciones de activación enzimática y preparación de sustratos; síntesis de proteínas y sustancias para construir la pared del tubo polínico; incluyendo la formación de tapones de calosa y por último la transferencia del material genético junto con organelos como mitocondrias, plásmidos y ribosomas, observándose el fenómeno de quimiotropismo en la orientación del tubo polínico (Linskens, 1976).

4.8.1 Viabilidad de los Granos de Polen

La longevidad de los granos de polen, es decir el tiempo en que retienen su viabilidad después de ser liberados por las anteras, es importante, especialmente en especies nativas y cultivadas que requieren de polinización cruzada para el "asentamiento" o "amarre" del fruto.



La viabilidad del grano de polen depende del grado en el cual la actividad vital puede ser reducida, sin alterar el poder de germinación. La longevidad, generalmente se incrementa con la reducción de la humedad relativa durante la floración pero, en casos especiales, el contenido del agua del polen no puede ser muy bajo hasta inducir un nivel crítico, en este caso un alto contenido de agua es indispensable para la longevidad (Linskens, 1964).

La sensibilidad del grano de polen a factores ambientales afecta la expresión del esfuerzo reproductivo, lo cual a su vez puede ser un factor importante en la distribución geográfica y ecológica de especies nativas y cultivadas.

En sí la viabilidad del polen es afectada por factores ambientales, factores genéticos y por la condición fisiológica de la planta (Pimienta, 1990a).

Por ejemplo las temperaturas altas causan división anormal de las células madres del polen y producen polen abortado. Las enfermedades fungosas y virales causan anomalías en la meiosis, con la consecuente disminución de la viabilidad (Pimienta, 1987). Otra causa de la pérdida de viabilidad de los granos de polen después de su liberación, se debe a la desecación del grano de polen al exponerse al ambiente (Pimienta, 1990a).

4.8.2 Receptividad del Estigma

El término receptividad se utiliza para describir la capacidad del estilo para interactuar con el polen y ésta determinado genéticamente (Lindsey y Jones, 1989).

La eficiencia biológica de la polinización es definida, en parte, por la receptividad del estigma y por la viabilidad el polen que se deposita en éste. En algunas especies el período de dehiscencias de las anteras no coincide con el tiempo en que el estigma es receptivo, como ocurre en las flores que presentan dicogamia. Existen casos en los que ambos acontecimientos se sincronizan pero las condiciones ambientales prevaletientes pueden afectar la actividad de vectores de polen o la receptividad del estigma. A pesar de que la información sobre la duración de los períodos de receptividad del estigma en especies vegetales es relativamente escasa, la disponible revela que existe amplia variación entre especies (Pimienta, 1990a).

En un estudio realizado por Rosas y Pimienta (1986) sobre receptividad del estigma en *O.ficus-indica* (L) Miller se encontró que los estigmas de botones florales son receptivos, ya que en las muestras colectadas a las 24, 72 y 120 h después de la

autopolinización se registró un 100% de estigmas con granos de polen germinados. Estas observaciones confirman que en la forma "fafayuco" el estigma es receptivo antes de que ocurra la apertura floral. Sin embargo no siempre es así para todas las especies, como en el género *Arachis* L. donde el estigma no es receptivo antes del día de antésis (Sastri y Moss, 1982).

4.8.3 Germinación de Granos de Polen.

La germinación de los granos de polen se lleva a cabo en la superficie receptiva del estigma, que puede ser húmedo o seco (Foster y Gifford, 1974). La superficie del estigma es de carácter glandular y antes de la captura del polen ésta promueve las condiciones para la germinación y crecimiento del tubo polínico, penetrando la superficie del estigma y creciendo a través de los espacios extracelulares del tracto de transmisión (Heslps-Harrison, 1978a). Los estigmas húmedos se caracterizan por secretar un exudado que generalmente coincide con la dehiscencia de las anteras. Los principales componentes de este exudado son: agua, lípidos, fenoles, azúcares y minerales. Entre las funciones atribuidas a estos componentes destaca el papel que desempeñan los lípidos y los fenoles. los primeros funcionan como una cutícula líquida que protege de la desecación a la secreción estigmática y

al polen. Los compuestos fenólicos funcionan dentro de un proceso selectivo regulador para estimular o inhibir la germinación de los granos de polen (Kapil y Bhatnagar, 1975). Generalmente al germinar el polen es capaz de extraer sustancias metabólicas de las sustancias de reserva, de las cuales esta constituido. Y muchos autores consideran que conforme crece el tubo polínico absorbe materiales del estilo, usando éstos para construir la pared del tubo (Linskens, 1964).

Así pues, algunas de las causas de por qué los granos de polen no germinan es porque son inviables, por las condiciones ambientales, o porque la condición fisiológica del estigma no reúne los requerimientos adecuados para su germinación (Pimienta, 1990a), o bien cuando se previene la germinación de polen incompatible la planta posee o produce una sustancia la cual actúa inhibiendo al polen (Sears, 1937). En recientes experimentos se ha comprobado que la mezcla de polen en la cual existe polen de la misma flor y polen procedente de otra especie, el auto-polen inhibe la germinación y el crecimiento del polen de cruza, aun cuando esta planta sea autoincompatible (Morse, 1994).

4.8.4 Desarrollo de Tubos Polínicos en el Estilo

Después de que el polen ha germinando, el tubo polínico que se genera de éste crece entre las células papilares, y llega al tejido de transmisión del estilo. Una característica importante del carpelo de las angiospermas es la continuidad que existe entre el tejido del estigma y la región placentar del ovario. Esta continuidad se establece a través del tejido de transmisión que, en algunas especies, es del tipo sólido, aunque en un número reducido de especies es hueco y en este caso el "tejido de transmisión" está representado por una epidermis glandular que reviste el canal estilar (Foster y Gifford, 1974).

En los estilos "huecos" el crecimiento de los tubos polínicos es superficial y las secreciones de la epidermis glandular que reviste el canal sirve para alimentar al tubo polínico durante su desarrollo y tal vez para orientar quimiotrópicamente el crecimiento del tubo polínico hacia el ovario observándose diferencias de potencial eléctricos entre el estigma y el ovario (Yamada, 1965; Labarca y Loews, 1973 citados por Pimienta, 1990a; Linskens, 1964). Las características ultraestructurales del estigma, el análisis de exudados del tejido de transmisión, del canal estilar, y el aparato filiforme así como evidencias obtenidas

con técnicas de autorradiografías, sugieren que existe un tipo de transferencia de pared donde el material es translocado de una célula a otra. Planteándose que el tubo polínico utiliza materiales de los espacios intercelulares del tejido de transmisión, o productos de secreción de las sinérgidas, las cuales juegan un papel muy importante en la nutrición del saco embrional, secretando sustancias quimiotrópicas que guían el crecimiento de tubo polínico (Rosen 1974; Linskens, 1964; Jensen, 1973). Otro factor importante es la presencia de iones calcio (Ca^{2+}) observándose que son esenciales en el medio para el crecimiento del tubo polínico, permitiendo su elongación, los tubos polínicos presentan o poseen un foco de gradientes de calcio en el ápice intracelular y una entrada extracelular de calcio en el ápice (Pierson et al., 1994).

Una característica importante de los tubos polínicos es la presencia de calosa, que es uno de los principales constituyentes de la pared del tubo. La distribución de las glicoproteínas es uniforme en la porción vieja de la pared del tubo polínico, la cual ayuda en la regulación del movimiento citoplasmático y de las constricciones del tubo polínico (Kapil y Tiwari, 1977).

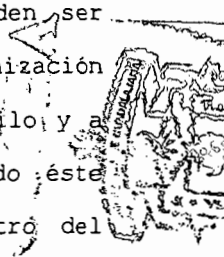
Los tapones de calosa se presentan debido a la actividad producida por la degradación de azúcares, por medio de la respiración. En esta forma, más tarde se emplea para construir las paredes de arriba de acuerdo a la dirección de crecimiento y cuando

se presenta un exceso se acumula en forma de tapones de calosa. Los tapones de calosa se forman por varias razones, no solo por la acción de la respiración sino por traumas (i.e. mecanismos de tensión, estrés o rompimientos que dañan la pared del tubo) (Tupy, 1959; Tsinger and Petrous Kaya-Baranava, 1967 citados por Kapil y Tiwari, 1977). La calosa proporciona un útil bioensayo fenotípico para determinar los sistemas de incompatibilidad, donde la formación de calosa es específica y delata el fenómeno de inhibición, así como para determinar la viabilidad de estigmas y óvulos; en este caso la presencia de calosa en óvulos es asociada con la senescencia pudiendo determinar el período efectivo de polinización (Dumas y Knoz, 1983).

La temperatura juega un papel muy importante en el crecimiento del tubo y la reacción de incompatibilidad, debido a que las altas temperaturas aceleran esta reacción (Lewis, 1954). En combinaciones compatibles las altas temperatura incrementan la germinación (Linskens, 1964; Bradley and Griggs, 1963) acelerando el crecimiento del tubo polínico. En combinaciones incompatibles los granos pueden germinar pero los tubos son inhibidos en la superficie del estigma (Bradley and Griggs, 1963). Por otro lado se ha observado que las temperaturas bajas afecta el asentamiento del fruto, debido a que causa retraso en el desarrollo de los tubos polínicos compatibles, impidiendo su llegada al óvulo antes que este presente senescencia (Sears, 1937).

4.8.5 Fecundación del Saco Embrional y Eventos de Post-fertilización

La singamia es la última y decisiva fase de la doble fecundación, que comprende la unión de los núcleos masculinos y la fertilización del núcleo huevo y los núcleos del endospermo (Bryant, 1935; Linskens, 1976). Los tubos polínicos pueden ser observados entrando por el micrópilo 6 h después de la polinización (Sears, 1937). El tubo polínico crece a través del micrópilo y a través de la nucela que rodea el saco embrional. Cuando éste alcanza el saco embrional, la punta del tubo crece dentro del aparato filiforme y dentro de la sinergida degenerativa dejando de crecer, y nunca penetra al huevo o a la célula central. Posteriormente los núcleos son descargados tendiendo a elongarse y son llevados pasivamente por el citoplasma hacia el huevo y núcleos polares. Una vez que el núcleo del esperma está cerca del núcleo del huevo se inicia la fusión con la unión de las membranas externas de las dos envolturas nucleares, después las membranas internas se fusionan formando muchos puentes entre los núcleos. El núcleo del cigoto es rodeado de esta forma por una membrana compuesta de dos espermias y la envoltura nuclear del huevo. Para los núcleos polares el segundo núcleo espermático es muy parecido,



formándose pequeños puentes entre los núcleos (Jensen, 1973; Sears, 1937; Johri and Bhatnagar, 1973). Durante este tiempo no hay un apreciable incremento en el volumen del espermatozoide o cambios en sus propiedades de tinción, y al completarse la fecundación y fusionarse ambos núcleos es entonces difícil observar alguna diferencia. La fusión es un proceso que se complementa con las primeras 30 h después de la polinización seguido de un estado de reposo (Sears, 1937). Después de la fertilización hay una repentina aceleración del desarrollo de la nucela e integumentos y una marcada elongación del saco embrional (Tukey, 1933). El desarrollo del endospermo transcurre normalmente después de la fecundación a partir del producto de la triple fusión, es decir de la fusión de los dos núcleos polares con un gameto masculino (Brink y Cooper, 1947, citado por Esau, 1976). Se han caracterizado tres tipos de endospermo: 1) los formados por muchos núcleos por divisiones nucleares libres, que pueden ser seguidas o no por formación de membranas celulares (nucelar o no celular); 2) los que forman membranas celulares inmediatamente después de la primera división nuclear (celular); 3) en este tipo después de la primera división mitótica el saco embrionario se divide en dos cámaras desiguales. En la cámara mayor, que se encuentra normalmente del lado de la calaza se desarrolla el endospermo no celular y la menor, del lado del micrópilo, presenta composición variable llamado helobial. Este tipo se presenta sólo en las monocotiledóneas donde núcleos libres

se presentan en la capa parietal de citoplasma que encierra una vacuola central (Esau, 1976). El desarrollo de este tipo de endospermo se ha observado durante el desarrollo embriológico de las Araceae (Grayum, 1991).

En angiospermas, el desarrollo primario del endospermo precede a la primera división del cigoto, sin embargo, cuando el cigoto y el endospermo se dividen simultáneamente se promueve una rápida división de núcleos del endospermo (Bryant, 1935). Las primeras divisiones del endospermo usualmente ocurre a las 48 h después de la polinización, observándose que los óvulos de fertilizaciones incompatibles cesan en este punto (Sears, 1979).

Los embriones abortados se caracterizan porque el tejido nucelar se colapsa y los integumentos se arrugan (Tukey, 1933). En los óvulos abortados de *Phytolacea americana* se observó el estadio del embrión globular con endospermo del tipo libre nuclear, sin embargo estos óvulos no reducen su tamaño comparado con los óvulos viables. Es frecuente el desarrollo de un espacio entre los integumentos interno y externo (Mikesell, 1988). Después de la fertilización el endospermo alcanza un número aproximado de 16 núcleos entre 150 a 200 h. En la mayoría de los casos el embrión no alcanza un estadio de dos células hasta que el endospermo posee de

8 a 16 núcleos o más. En fertilizaciones incompatibles los óvulos usualmente se presentan senescencia entre las 48 a 96 h después de la polinización (Sears, 1937).

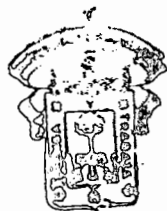
4.8.6 Desarrollo del Embrión

Johansen (1950) define el proembrión de las angiospermas más o menos como un filamento constituido de células. Es la fase más temprana de embriogénesis y comienza con la generación de cuatro células y finaliza cuando se forman 17 células, por lo cual el estadio temprano de desarrollo del embrión de angiospermas es usualmente designado como proembrión (Foster and Gifford, 1959).

El embrión se desarrolla apartir del cigoto y la cubierta de la semilla (testa) de los integumentos del óvulo. Después de la doble fecundación, las primeras divisiones celulares de la nueva generación dan como resultado un filamento de cuatro células. Más tarde, la célula más cercana al micrópilo se elonga y empuja a las demás células del filamento hacia el interior del endospermo. Casi al mismo tiempo, la célula más alejada del micrópilo se divide en ángulos rectos al eje del filamento. Las divisiones posteriores dan como resultado una etapa esférica y por último, una etapa en forma de corazón después de que los cotiledones se han desarrollado (Rost *et al.*, 1985).

En ciertas cactáceas la primera división del cigoto es en plano transversal o algunas veces oblicuo, formando una pequeña célula al final del lado de la calaza y una gran célula basal vacuolada. Dos días después aparece un proembrión en forma de pera el cual consiste en una hilera uniseriada de tres a cuatro células, las cuales son soportadas por la célula grande de la base. Las divisiones futuras llevan una hilera de células y produce un proembrión columnar, el cual en algunas ocasiones se encuentra constreñido en la parte media. Las células micropilares son largas y más vacuoladas que la del embrión inicial y que en la calaza. Seis días después de la polinización aparece un embrión esférico caracterizado por un largo suspensor, el cual en este estadio deja de crecer (Engleman, 1960). En otras cactáceas una línea de tétrade irregular es producida como en *Rhipsalis cassytha*, pero un proembrión irregular de cinco células y una línea de seis células están también representadas. En general se presentan proembriones de tres hileras de dos células cada una, de dos hileras de dos células yuxtapuestas en la base y dos nuevas células superpuestas superiores. El último estadio presenta una hilera superior de cinco células, probablemente cuatro células, una de las cuales se ha segmentado prematuramente por una pared oblicua, presentando una línea de ocho células como suspensor (Maurition, 1934 citado por Johansen, 1950).

CUCBA



4.9 Descripción de las Morfoespecies

Las morfoespecies empleadas en este trabajo se seleccionarán en base a sus atributos y características apreciadas por los agricultores e investigadores de ésta especie. Se emplearon tres morfoespecies las cuales se describen a continuación.

"Burrona": la forma del fruto es obovoide, con cáscara de color verde-oscuro y la pulpa de color verde claro. La cicatriz receptacular es mediana y ligeramente cóncava. El peso del fruto varía de 150 a 250 g. El porcentaje de azúcares es inferior a 13%, de los cuales el 8% por ciento lo constituyen reductores. El contenido de vitamina C es de 10 mg/100 g. Se considera como una variedad de maduración intermedia, ya que su cosecha se lleva a cabo durante septiembre y octubre. Los frutos presentan un alto grado de resistencia al manejo durante la poscosecha. El hábito de crecimiento de la planta es arbustivo, pero vigoroso. Los cladodios son obovoides de color verde-oscuro (Pimienta, 1990). Las espinas son rectas y reflejas, presentando mayor número de espinas menores a 1 cm los pelos o hirsutas sufren abscisión fácilmente (Muñoz, 1995). Presentan ventajas agronómicas favorables para su cultivo,

entre las que se destacan su floración tardía (abril y mayo), que le permite escapar del daño de las heladas que se presentan al final de la estación de invierno. Además, es resistente a la sequía y al daño causado por la fauna silvestre, y una de las variedades más productivas (Pimienta, 1990).

"Cardona" (*Opuntia streptacantha* Lemaire): Es una variedad silvestre, y es la más abundante en las nopaleras silvestres que se encuentran en el Altiplano Potosino-Zacatecano y partes territoriales de Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro y Jalisco.

Las plantas pueden ser arborescentes (Muñoz, 1995) y arbustivas, ramificadas con tronco bien definido. La forma de los cladodios varía de obovados a orbiculares, son de color verde-oscuro (Pimienta, 1990). Tienen un promedio de 9.6 hileras de aréolas y la distancia entre las hileras de espinas es reducida, presentan gran número de espinas la mayoría son adpresas y reflejas con un tamaño de 1 a 2 cm, los pelos o hirsutas son por lo general permanentes (Muñoz, 1995). La cicatriz receptacular es pequeña y ligeramente hundida. La maduración de los frutos se presenta durante los meses de agosto y septiembre. La forma del fruto es globosa, y la cáscara y el lóculo son de color rojo-púrpura, es una de los frutos más pequeños. El porcentaje de azúcares es superior al 14 % (Pimienta, 1990).

"Xoconostle" (*Opuntia Joconostle* Web): Tanto la planta como el fruto se le identifica con el nombre de xoconostle. Se encuentra en condiciones silvestres en las zonas semiáridas de los estados de Jalisco, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Querétaro. En condiciones cultivadas se encuentran en los estados de México, Jalisco, Querétaro y Michoacán del Altiplano. La planta es arborecente hasta 5 m de altura, con tronco grueso bien definido, como de 20 cm de diámetro, grisáceo, ramificaciones prominentes

gruesas, artículos pequeños, ovales, con epidermis glabra de color verde claro ligeramente amarilla. El fruto subgloboso como de 3 a 6 cm de diámetro de pulpa ácida rosada, ligeramente perfumada. El nombre de esta especie elude al sabor del fruto y proviene del Náhuatl *xoconochtli* que significa agria (Bravo, 1978a).

4.10 Mecanismos de Aislamiento

La reproducción constituye la función primordial e indispensable de todo organismo vivo (Dobzhansky, 1983). Y si bien las especies biológicas son grupos reproductores distintos, deben existir entre ellas barreras a la hibridación (Grant, 1989). Los mecanismos de aislamiento constituyen todo impedimento condicionado genéticamente para el intercambio de genes entre las poblaciones

(Dobzhansky, 1983). Constituyendo la característica biológica que causa la existencia de especies simpátricas (Futuyma, 1986). La hibridación y el intercambio genético entre las especies, se impide o se reduce mediante mecanismos de aislamiento. Dichos mecanismos se pueden agrupar en tres clases principales: espaciales, ambientales y reproductivos (Cuadro 1) (Grant, 1989).

Cuadro 1-Clasificación de los mecanismos de aislamiento de las plantas (Grant, 1989).

- I. Espaciales
 - 1. Aislamiento geográfico
 - II. Ambientales
 - 2. Aislamiento ecológico
 - III. Reproductivos
 - A. Externos
 - 3. Aislamiento temporal
 - a) Estacional
 - b) Diurno
 - 4. Aislamiento mecánico
 - 5. Aislamiento etológico
 - 6. Aislamiento por autogamia
 - B. Internos
 - 7. Barreras de incompatibilidad
 - a) Prefertilización
 - b) Postfertilización
 - 8. Falta de viabilidad de híbridos
 - 9. Esterilidad de híbridos
 - 10. Deterioro de los híbridos
-

El aislamiento espacial o geográfico ocurre entre dos especies vegetales alopátricas, cuyas respectivas áreas geográficas están separadas por distancias más grandes que el radio normal de dispersión de polen o de la semilla. El aislamiento ambiental o ecológico es el resultado de las preferencias ecológicas entre las

especies. Esta diferenciación lleva a que las especies ocupen diferentes habitats donde coexisten en la misma área geográfica (Grant, 1989; Dobzhansky, 1983). El aislamiento ecológico esta muy bien observado en las plantas, en el caso de que dos especies muy poco relacionadas que crecen en diferentes ambientes pueden producir progenie, los híbridos producidos no llegan a adaptarse al ambiente de ninguno de sus padres (Soltbring, 1966).

El concepto de aislamiento reproductivo se aplica en primer lugar a organismos sexuales y de fecundación cruzada. El aislamiento reproductivo consiste en obstrucciones al intercambio génico entre poblaciones; obstrucciones que provienen de diferencias genotípicamente controladas en sus órganos reproductores, hábitos reproductores o relaciones de fertilidad. Estas obstrucciones pueden ser externas, es decir, que actúan antes de la polinización cruzada, como en el caso del aislamiento temporal, mecánico y etológico. O bien, los obstáculos pueden ser internos, es decir, que operan después de la polinización cruzada, como la incompatibilidad, inviabilidad, esterilidad y deterioro de los híbridos (Grant, 1989). La mayoría de los aislamientos reproductivos pueden romperse en cualquier momento, y se considera que las únicas barreras reproductivas absolutas son las de incompatibilidad sexual (esporofítica y gametofítica), y las de esterilidad total de los híbridos (Solbring, 1970 citado por

Trujillo, 1986). La aparición de mecanismos de aislamiento reproductivo impiden que las conquistas adaptativas se pierdan por hibridación lo cual es de gran trascendencia biológica (Rabinovich y Halffter, 1979).

Los mecanismos de aislamiento se pueden clasificar de igual forma en mecanismos precopulatorios (precigóticos) (Rabinovich y Halffter, 1979; Dobzhansky, 1983; Futuyma, 1986) que englobarían a los mecanismos de aislamiento espaciales, ambientales, reproductivos externos e internos como las barreras de incompatibilidad (Rabinovich y Halffter, 1979; Grant, 1989), impidiendo la hibridación de miembros de poblaciones distintas, evitando de esta forma la formación de cigotos (Dobzhansky, 1983; Futuyma, 1986), y los mecanismos de aislamiento postcopulatorios (postcigóticos) (Rabinovich y Halffter, 1979; Dobzhansky, 1983; Futuyma, 1986) agrupando, la falta de viabilidad de los híbridos, esterilidad de los híbridos y deterioro de los mismos (Rabinovich y Halffter, 1979; Dobzhansky, 1983; Grant, 1989).

4.10.1 Aislamiento Reproductivo Externo

Los tipos de aislamiento reproductivo externos los podemos agrupar en, aislamiento temporal o estacional, el cual presenta entre dos especies vegetales cuando sus periodos de floración y

polinización se presentan en diferentes épocas del año y horas del día (Solbrig, 1966; Grant, 1989). Si los puntos máximos de los dos períodos de floración están bien separados en el tiempo, y por otra parte, si las áreas de distribución se traslapan, el aislamiento puede ser parcial; por otra parte si las áreas de distribución y de los dos períodos no se traslapan, el aislamiento puede ser completo (Grant, 1989, Dobzdansky, 1983). En este punto la polinización es considerada como un problema ecológico. Algunas plantas superiores presentan barreras que previenen la hibridación por diferencias en el tiempo de maduración de los estambres y carpelo como en *Crocus*. Otras que previenen la fertilización cruzada son las diferencias morfológicas entre dos tipos de flores en una misma planta como en *Pinus*, o dos tipos de flores una llevando estambres y las otras llevando carpelo en plantas diferentes (Linskens, 1976), como en algunas variedades de *O. robusta* Wendland (Pimienta, 1990).

El aislamiento mecánico es una consecuencia de las diferencias estructurales en las flores de dos o más especies que impiden o dificultan la polinización interespecifica (Grant, 1989). En las fanerógamas las distintas especies pueden haberse especializado para atraer a distintos insectos que actúan como polinizadores (Dobzhansky, 1983). El aislamiento etológico es un

efecto secundario del comportamiento de ciertos insectos que visitan flores de una sola especie, que puede ocurrir en algunos grupos vegetales polinizadas por tales insectos como ocurre en las orquídeas (Solbrig, 1966; Grant, 1989).

4.10.2 Aislamiento Reproductivo Interno

La incompatibilidad en el cruzamiento incluye una variedad de obstrucciones, algunas de prefertilización y otras de posfertilización, que impiden el desarrollo de un embrión híbrido viable. En un estigma extraño, es imposible que el polen germine o que los tubos polínicos se desarrollen con éxito en el estilo. O bien, si hay fertilización y se forma el embrión híbrido, éste puede morir prematuramente como resultado de la degeneración del endospermo híbrido (Grant, 1989), como ocurre en cruzas interespecíficas artificiales de los géneros *Trifolium*, *Lotus* y *Ornithopus* (Williams y Lautour, 1980). La incompatibilidad se expresa también con una baja producción de semillas y frutos como en *O. leucotricha* Wendland presentando un alto grado de autoincompatibilidad (Trujillo, 1986).

El impedimento de la fecundación del gameto femenino por parte del gameto masculino es un aislamiento de tipo genético y es

considerada la barrera más eficaz de aislamiento entre las especies (Solbrig, 1966).

4.10.2.1 Incompatibilidad Sexual

La incompatibilidad sexual puede ser definida como la inhabilidad de los organismos hermafroditas de producir cigotos (Linskens, 1973), debido a la falla de algún proceso entre la polinización y la fertilización (Lewis, 1954). La incompatibilidad ocurre entre plantas donde se presentan autopolinizaciones o polinizaciones cruzadas llevando el mismo alelo S, aun cuando el gameto femenino y masculino sean funcionales (Ferrari y Wallace, 1977).

En general el término de incompatibilidad es utilizado para describir la ausencia de tubos polínicos que al no poder penetrar a lo largo del estilo impide el proceso de fecundación (Williams, 1965) específicamente aquellos sistemas que favorecen la alogamia pero discriminando el polen de la misma flor son llamados sistemas de autoincompatibilidad, el cual es indudablemente de un alto nivel de especificidad presente en su funcionamiento (Helpso-Harrison, 1978a). Este es el caso de *O. leucotricha* que presenta un alto grado de autoincompatibilidad, manifestándose por un bajo

desarrollo de semillas y frutos (Trujillo, 1986). Las comparaciones entre la progenie de *Lythrum salicaria* en diferentes tratamientos de polinización entre los cuales se encuentra autopolinizaciones, indican que la depresión por endogamia es importante en esta especie, en este caso y en las plantas en general la incompatibilidad genética es vista como un mecanismo que previene la depresión por endogamia reforzando la polinización cruzada (O'Neil, 1994).

En otros casos la incompatibilidad sexual es considerada como un mecanismo de aislamiento reproductivo interno que opera después de la polinización cruzada (Grant, 1989), y se consideran como una barrera de fertilidad entre individuos que están menos relacionados, como en el caso que éstos pertenezcan a especies o géneros biológicos diferentes, previniendo la mezcla interespecífica por medio de mecanismos fisiológicos, llamando incongruencia (Pulido, 1991; Olesen et al. 1992). La formación de híbridos interspecíficos en especies cultivadas y silvestres de *Arachis* esta restringida por barreras reproductivas incluyendo incompatibilidad genética debido a la aborción del proembrión en cruza recíprocas (Patte y Stalker, 1992).

Existiendo también la semicompatibilidad, como en manzano donde en auto-polinizaciones los tubos polínicos semicompatibles crecen más despacio que los tubos completamente compatibles llegando algunos a penetrar el ovario (Williams y Maier, 1977).

Se ha sugerido para explicar el fenómeno de incompatibilidad dos mecanismos posibles: un mecanismo de estimulación complementaria y uno de reacción inhibitoria. Para la primera, se supone que los tubos polínicos compatibles crecen más rápidamente debido a que son estimulados mediante una sustancia presente en el estilo, que es complementaria de los productos transportados por el grano de polen. Observándose que los tubos incompatibles se desarrollan más lentamente debido a que faltan las sustancias promotoras del crecimiento o posiblemente las que se presentan en los tubos polínicos no son complementarias con las existentes en el estilo accionando un inhibidor específico (Williams, 1965; Lewis, 1954; Helpson-Harrison, 1978a).

En cruzas incompatibles la regulación de la actividad del gen guía la producción de un dímero el cual induce la formación de un sistema inhibitorio. En cruzas compatibles es producido un monómero efectuando la depresión del sistema, promoviendo un crecimiento (Linskens, 1976).

Linskens (1976) por su parte distingue dos categorías de la incompatibilidad sexual: incompatibilidad interespecífica e incompatibilidad intraespecífica o autoincompatibilidad.

Se puede decir que la incompatibilidad interespecífica es una incompatibilidad heterogenética y está basada en dos genes en diferentes loci. La incompatibilidad interespecífica representa la barrera que puede crear especies y razas. En contraste a estos mecanismos como se encuentra en plantas con incompatibilidad intraespecífica es un sistema homogenético determinado por múltiples alelos de un locus. Los conceptos básicos de alelos opuestos que gobiernan la incompatibilidad, constan de una serie de genes alelomorfos, llamados S, genes-S (Linskens, 1976). Los alelos de incompatibilidad S funcionan como genes reguladores. Dos de éstos existen en el estilo diploide y uno en cada tubo polínico; estos reguladores gobiernan los sistemas de operones en el tubo controlando el metabolismo del tubo polínico (Ascher, 1966). Este fenómeno se presenta como el resultado de la interacción de las proteínas liberadas por el polen con aquellas en el estigma descrito como una reacción similar al del antígeno-anticuerpo (Kalpil and Tiwary, 1977).

En ambos sistemas de incompatibilidad se observa la aparición de expresiones morfológicas de incompatibilidad. Estas son

variadas, por ejemplo en autopolinizaciones y cruza en *Olea europaea* L, se ha observado hinchamientos de tubo polínico, ahorcamientos, y enrollamientos, en algunos casos revientan en la superficie del estigma. En el estilo y ovario las paredes de los tubos polínicos presentan hinchamientos moderados incluyendo depósitos de calosa así como el ahorcamiento (Bradley and Griggs, 1963), o como en *Petunia* en donde los tubos incompatibles presentan paredes irregulares y engrosamiento del ápice (Sears, 1937).

4.10.2.1. Sistema de Incompatibilidad Sexual Gametofítica

El sistema gametofítico de incompatibilidad se presenta en especies que producen polen binucleado, con bajo rango de respiración y presenta un período de vida largo. El estigma es húmedo en la fase receptiva y la reacción de incompatibilidad se observa en el tejido de transmisión del tracto o canal del estilo (Heslop-Harrison, 1978b).

Las características principales de este sistema son: 1) el de los genes S que es una serie de múltiples alelos ejerciendo un control específico; 2) el control de la inhibición del polen es gametofítico; 3) los alelos tienen una acción individual en el estilo sin ninguna interacción; 4) los tubos polínicos son incapaces de crecer hacia abajo en el estilo en el cual ambos tubos

y estilo tienen algunos de los alelos S. Generando tres tipos de polinizaciones: 1) completamente incompatibles ($S_{1,2} \times S_{1,2}$) en el cual ambos alelos son idénticos; 2) el polen es semicompatible ($S_{1,2} \times S_{1,3}$) en el cual uno de los alelos es diferente; 3) el polen es compatible ($S_{1,2} \times S_{3,4}$) en el cual ambos alelos son diferentes (Lewis, 1954; Heslop-Harrison, 1978a), ya que el polen es considerado en este caso el gametofito masculino, es por eso que se nombra de esta manera al sistema de incompatibilidad (Linskens, 1976).

Existiendo una nueva relación en el grano de polen diploide que es la interacción de competencia y dominancia entre múltiples alelos en un gen. Como en *Oenothera organensis* donde existe un arreglo lineal de 4 alelos que poseen una escala de dominancia competitiva (Lewis, 1954). Este sistema se encuentra en muchas Solanaceae como en *Trifolium* y *Abutilon* (Linskens, 1976).

El sistema de incompatibilidad gametofítico se han descrito en varias especies como en el almendro en donde la inhibición del crecimiento del tubo polínico sucede en el tejido del estilo y las anomalías morfológicas son engrosamiento y depósitos de calosa en forma de tapones, descrito como auto-incompatibilidad gametofítica (Pimienta y Polito, 1983), o como ocurren en *Malus pumila* Mill donde los tubos son inhibidos en el parte media del

estilo (Aguilar y Pimienta, 1985). *Petunia* presenta un sistema gametofítico de auto-incompatibilidad monofactorial, inhibiendo los tubos polínicos en el transcurso del estilo al óvulo (Linskens, 1975) igual sucede en *Nicotiana glauca* donde el reconocimiento e inhibición del mismo polen ocurre en el pistilo debido a la presencia de proteínas S (Karunamandaa, et al., 1994); presentando el mismo sistema *Nemesia strumosa* (Henny and Ascher, 1977). El control de sistema de autoincompatibilidad gametofítico comúnmente es controlada por un solo gen S o dos genes, el gen S y el gen Z, con múltiples alelos como se presenta en *Phalaris coerulescens* (Li et al., 1994). La forma en la que se expresa molecularmente los alelos S o genes S son variadas, puede codificar para pequeñas glicoproteínas (*Papaver*) o codificar para ribonucleasas (*Solanaceas*) o puede ser más complejo presentando locus tanto para glicoproteínas o receptor S kinasa (*Brassica*). Pero en general la mayoría de los sistemas de incompatibilidad presentan características comunes, las glicoproteínas son secretadas en el pistilo presentando secuencias totalmente diferentes (Li et al., 1994).

El sistema de incompatibilidad da como resultando una baja en la frecuencia de tubos que se desarrollan en el estilo que por lo general son rechazados en la base del estilo observándose óvulos

con el saco embrionario desintegrado en autopolinizaciones así como en cruzas incompatibles.

4.10.2.2 Sistema de Incompatibilidad Sexual Esporofítico

El control en el gametofito masculino está dado directamente por el genoma del pariente diploide del polen ya que la planta es considerada un esporofito. Este tipo de incompatibilidad es llamada esporofítica (Heslop-Harrison, 1978a; Linskens, 1974; Sears, 1937; Brewbaker, 1957 citado por Heslop-Harrison, 1978b). La reacción de inhibición ocurre solamente en el estigma específicamente en la superficie o cutícula (Sears, 1937). La pared del polen juega un papel muy importante debido a que ésta es de origen esporofítico ya que se forma a partir de las paredes de la antera. Por lo general los estilos son huecos, con estigmas secos usualmente papilares (Heslop-Harrison, 1978).

El sistema esporofítico es similar al gametofítico por el hecho de poseer un gen único con múltiples alelos, pero difieren en el control del polen, el cual es de influencia esporofítica. Cualquier de los alelos puede presentar dominancia, acción individual o competencia en el polen y estilo acorde a la combinación alélica (Lewis, 1954).

Este sistema se observa en familias como las *Cruciferae*, *Gramineae*, *Compositae* y otras (Linskens, 1976).

4.11 Coexistencia

Los términos alopatria y simpatria resultan útiles para describir las relaciones espaciales entre las poblaciones (Mayr, 1942 citado por Grant, 1989).

Alopatria. Las poblaciones no cohabitan en la misma área, las cuales son totalmente diferentes (Connell, 1980 citado por Grace y Tilman, 1990; Mettler, 1982; Grant, 1989).

Se les considera alopátricas por lo que atañe a la geografía, pero si los individuos o las células reproductoras se ponen en contacto en un margen común, de modo que se reproduzcan por entrecruzamiento, se les llama simpátricas en el sentido genético (Mettler, 1982).

Simpatria. Las poblaciones habitan el mismo territorio, donde los dominios de dos o más especies pueden traslaparse (Connell, 1980 citado por Grace y Tilman, 1990; Mettler, 1982; Grant, 1989), de modo que están una con respecto de la otra a la distancia normal de dispersión (Grant, 1989).

Aquí se presentan dos situaciones: a) simpatria de vecinos, las poblaciones ocupan diferentes nichos en el mismo habitat general; por regla general, los individuos de las respectivas

poblaciones no viven juntas; b) simpatria biótica, las poblaciones ocupan el mismo nicho, y los individuos de cada una de ellas frecuentemente viven juntas. Así la simpatria es tanto ecológica como genética (Grant, 1989).

4.12 Especiación

Especiación significa el desarrollo de nuevas y diferentes combinaciones genéticas en poblaciones separadas. Este aspecto del proceso de especiación es común en especies evolutivas, en el caso de especies biológicas compuestas de organismos de fecundación cruzada (Grant, 1989). La especiación incluye además el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo que lo separan del resto de la población, de la cual se origina (Solbring, 1966; Mayr, 1942 citado por Mayr, 1987; Grant, 1989). Para explicar la especiación, no es suficiente explicar el origen de la variación o del cambio evolutivo dentro de las poblaciones. El origen del aislamiento reproductivo entre las poblaciones es lo que se debe explicar. La especiación no es tanto el origen de nuevos tipos, si no el de dispositivos contra la introducción de genes extraños dentro de los acervos génicos (Mayr, 1987).

4.12.1 Especiación por Hibridación

La especiación por hibridación quiere decir el origen de una nueva especie directamente a partir de un híbrido natural. Existen varios mecanismos o métodos conocidos de la estabilización de la producción de los híbridos como: 1) la propagación vegetativa; 2) la agamospermia; 3) especiación por recombinación, entre otros. En cualquier caso la combinación genética particular de origen híbrido, si resulta adaptativamente valiosa en algún ambiente disponible, puede aumentar su número y formar su propia población. La población derivada puede ser una nueva especie de origen híbrido (Grant, 1989).

4.13 Hibridación Natural

La hibridación natural es el cruzamiento al azar espontáneo entre poblaciones que tienen una historia previa de divergencia hasta el nivel de razas disyuntas, semiespecies o especies y que están separadas por aislamiento ecológico parcial o reproductivo, o ambos. Puede ocurrir entre especies simpátricas, o puede ocurrir entre razas que antes eran disyuntas y separadas, pero que han restablecido el contacto a lo largo de un nuevo frente geográfico

(Grant, 1989). La hibridación es considerada como un importante fenómeno evolutivo, suministrando poblaciones con aumento en la flexibilidad evolutiva, extendiendo una especie en una reunión de genes (aquí el rango ecológico) por introgresión y relacionando nuevas combinaciones de genes o pueden separarse por selección natural (Bradley et al., 1988). En el reino vegetal la hibridación natural ocasional es normal cuando dos o más especies emparentadas llegan a ponerse en contacto (Grant, 1989). Esto se puede comprobar cuando se realizan hibridaciones artificiales en especies que abarcan una gran extensión territorial observándose que en cruces interspecíficas es alta, por ejemplo, como ocurre entre especies de *Leucaena* (Sorensson y Brewbaker, 1994). En sí muchas especies, incluso pertenecientes a géneros distintos, dan híbridos fértiles cuando se cruzan. De hecho el aislamiento reproductivo se considera como un subproducto de la divergencia es decir que a medida que van divergiendo más desde el punto de vista genético va resultando menos probable que sus genotipos puedan interactuar de forma armónica en un híbrido (Dobzhansky, 1983). La hibridación entre géneros poco relacionados filogenéticamente, son evidencias claras que revelan que las barreras de aislamiento reproductivo no han alcanzado un desarrollo completo, lo cual a su vez sugiere que algunos de sus géneros se encuentran en estado temprano de especiación (Muñoz, 1995). La caracterización central de la

hibridación natural es el entendimiento del proceso de reproducción de las plantas que pueden limitar o promover la fecundación interespecífica (Carney et al., 1994).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Descripción del Area de Estudio.

Este trabajo se llevó a cabo en una plantación cultivada localizada en el municipio de Pinos, Zacatecas, próxima a la población de Ojuelos Jalisco. La zona presenta un clima de tipo templado seco (Bs), registrándose temperaturas medias altas de 24°C y temperaturas mínimas medias de 7.5°C. La precipitación media anual es de 513.4 mm. Las lluvias se presentan en verano (de mayo a octubre) aunque hay algunas lluvias en invierno. Predominan los suelos de textura media (migajon-arcilloso, migajon-arenoso). Desarrollándose una vegetación primaria de pastizal natural, frecuentemente asociado con nopales silvestres (Alvarez, 1990).

5.2 Biología Floral

Se marcaron 20 flores de la variedad "Burrona", de diferentes plantas en un estadio cercano a la apertura floral, con el fin de dar seguimiento al comportamiento de las flores de la variedad "Burrona", durante el transcurso del día. Se registraron las siguientes características como: a) color de los pétalos al empezar la apertura y cierre de la flor, así como la variación de la distancia y altura de los estambres con respecto al estigma y la b)

temperatura del ambiente durante la apertura y cierre de las flores.

Se colectaron los insectos que mayor frecuencia visitaban las flores de *Opuntia*, registrando su comportamiento desde que arribaron a la flor y posteriormente sus hábitos de forrajeo dentro de la misma; así como los vuelos interflorales que realizaban hacia otras flores de la misma especie o especies distintas. Los especímenes colectados se identificaron en el Laboratorio de Colecciones Zoológicas del Departamento de Botánica y Zoología de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales, del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

5.3 Tratamientos de Polinización

1) Polinización libre (natural). Se permitió la polinización natural de flores de la morfoespecie conocida comúnmente como "Burrona", las que fueron solamente marcadas con una etiqueta.

2) Autopolinización. Para favorecer la autopolinización de flores de la variedad "Burrona" seleccionadas para este

tratamiento, se cubrieron con bolsas de glassine para evitar de este modo, la llegada de polen ajeno a la flor.

3) Polinización cruzada. Cruza "Burróna" ♂ x "Xoconostle" ♂

Las flores seleccionadas fueron emasculadas, posteriormente se polinizaron manualmente con polen previamente seleccionado. En este caso la morfoespecie de "Burróna" fue el progenitor femenino y la morfoespecie de "Xoconostle" el progenitor masculino. Estas flores se cubrieron con bolsas de glassine para evitar la visita de polinizadores y la transferencia de polen extraño.

4) Polinización cruzada. Cruza "Burróna" ♂ x "Cardona" ♂ Después de la emasculación de las flores, fueron polinizadas manualmente observando que fuera abundante el polen sobre el estigma y por último se cubrieron con bolsas de glassine. En este tratamiento la morfoespecie conocida como "Burróna" fue el progenitor femenino y "Cardona" el progenitor masculino.

5) Emasculación y cubrir. En este tratamiento se marcaron aproximadamente 30 flores de la variedad "Burróna", las cuales se emascularon y se cubrieron sin polinizar. Este tratamiento permitió observar si existe el desarrollo de semillas sin fecundación (apomixis).

6) Emascular sin cubrir: Se marcaron 30 flores de la variedad "Burrona", en este caso se emasculó pero no se procedió a cubrir la flor, para poder determinar la importancia del viento en el transporte de polen de *Opuntia*.

En primer lugar se procedió a seleccionar y marcar las plantas y flores que serían usadas en cada tratamiento. Las pencas, flores así como la toma de muestra fueron elegidas totalmente al azar con la ayuda de una tabla de números aleatorios. Una vez seleccionadas las flores fueron marcadas con una etiqueta a partir del número 1 al 150, indicando el tratamiento de polinización que se emplearía en ellas.

Para cada uno de los primeros cuatro tratamientos se seleccionaron 150 flores, las cuales se encontraban en un estadio próximo a la apertura floral.

Para los tratamientos tres y cuatro, que son las cruza, se utilizó el método de emasculación, el cual se describe a continuación: consiste en retirar la corola junto con los estambres del carpelo dejando sólo el carpelo para facilitar así el depósito de polen en el estigma.

De las 150 flores marcadas para cada tratamiento se colectaron 15 muestras de pistilos y ovarios cada 24 h después de la apertura floral, de los cuatro primeros tratamientos. En estas muestras se observó la germinación de los granos de polen, el desarrollo de

tubos polínicos, la fecundación del óvulo y el subsecuente desarrollo del proembrion. Para ésto último se tomaron 15 muestras de ovario de los cuatro primeros tratamientos después de aproximadamente 30 días de la apertura floral.

Los pistilos y ovarios colectados fueron removidos de los carpelos y fijados en FAA (Brooks, Bradley, Anderson, 1959).

5.5 Desarrollo de Tubos Polínicos y Fecundación de óvulos

Con el fin de observar la germinación de los granos de polen y desarrollo de los tubos polínicos, los pistilos fueron ablandados usando el método descrito por Jefferie y Belcher (1971) con las modificaciones descritas a continuación: los pistilos se preservaron usando un fijador histológico FAA (85 ml de alcohol étílico, 5ml de ácido acético y 10 ml de formaldeído). Se lavaron con agua destilada y fueron colocados en una solución acuosa de sulfito de sodio (1%) con el fin de ablandarlos en una autoclave a 120°C durante 20 minutos. Después se pasaron a una solución acuosa de carbonato de sodio (1%) durante 24 h. Estos estilos fueron lavados con agua destilada. Para remover el mucilago se colocaron 30 minutos en acetona, para lograr una pronta tinción se colocaron una hora en carbonato de sodio. Después de la eliminación del mucilago se retiró la epidermis de los estilos ablandados y se

tiñeron con azul lacmoide (0.25 g en 100 ml de alcohol etílico al 30%, pH=8) haciendo una modificación al procedimiento descrito por Chaedle *et al* (1953) y los tapones de calosa de los tubos polínicos se observaron en un microscopio Zeiss.

Para observar la fecundación del óvulo, se procedió a disectarlos al azar de los ovarios fijados en FAA. Los ovarios fueron cortados longitudinalmente y los óvulos fueron removidos con unas pinzas de punta fina. Los óvulos se deshidrataron en alcoholes graduados e incluidos en parafina, para hacer cortes longitudinales a 10µm en un micrótopo rotatorio. Después se montaron en porta objetos, posteriormente se tiñeron con safranina y verde rápido (Rosas, 1984).

5.6 Análisis Estadístico

Para los datos obtenidos sobre el número de tubos polínicos en la base del estilo, de los primeros cuatro tratamientos a diferentes intervalos de tiempo, después de la apertura floral se utilizó el análisis de varianza con parcelas subdivididas. Utilizando la Prueba de Duncan para la comparación de las medias (Little y Hills, 1987).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Biología Floral

Las observaciones sobre el comportamiento floral en la variedad "Burróna" mostraron que éstas son efímeras, ya que abren y cierran el mismo día. Durante el proceso de apertura la corola cambia de color. Los sépalos son de color rosa al empezar la apertura floral, durante el día y al proseguir la aperturar éstas cambian a un color amarillo-brillante, y al final del día adquieren un color anaranjado, que es cuando ocurre el cierre de la flor. Cambios similares en la coloración fueron descritos por Rosas (1984) en las variedades "Pelón" y "Fafayuco".

Al tercer día después de la apertura floral, se observó la separación o absición del perianto y el estilo del resto de la flor o receptáculo, dando origen a la cicatriz receptacular u "ombbligo". Las flores de "Burróna" son del tipo "A", abren y cierran el mismo día, puesto que la apertura de la flor empieza aproximadamente a las 20:00 am, y abren completamente a las 11:00 am, iniciando el cierre a partir de las 16:00 pm y cerrando completamente a las 18:00 pm.

Cuando las flores empiezan su apertura, los estambres ya han cubierto de polen la parte basal de los lóbulos del estigma ya

húmedo, debido a que las anteras abren antes de la apertura floral ocurriendo cleistogamia preantesis.

Un aspecto importante sobre el comportamiento de las flores estudiadas, es la relación entre la temperatura y la hora en la que abren y cierran. Al parecer la flores abren cuando se registran temperaturas mayores a los 20°C, que es cuando los rayos solares empiezan aumentar su intensidad durante la mañana. Las temperaturas más altas (alrededor de 30°C) se presentan después de las 14 horas cuando las flores están completamente abiertas. El cierre de las flores coincide con el inicio de descenso de las temperaturas, cuando los rayos solares disminuyen (temperaturas menores a los 28°C).

6.2 Polinización

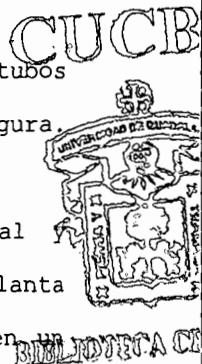
En algunas especies el viento es un agente importante de polinización, y es la forma más común de polización en plantas que tienen flores poco notables como es el caso de los nogales, encinos y altamisas (Rosas y Pimienta, 1986). Sin embargo, el efecto del viento como agente de polinización se descarta en *Opuntia*, debido a que en las flores del tratamiento de emascular sin cubrir, no se registró polen en sus estigmas, no obstante que durante el experimento prevalecieron vientos fuertes en el transcurso del

día. Sin embargo, cabe hacer notar que el polen de *Opuntia* es relativamente pesado en comparación con el de otras especies como las anemófilas, siendo difícil su transporte por este medio; debido a que el polen de *Opuntia* al ocurrir la dehiscencia se caracteriza por ser humedo, misma que aumenta cuando entra en contacto con el estigma germinando rápidamente.

Lo cual se comprobó al observar la gran cantidad de tubos polínicos que llegan después de 24 h a la base del estilo (Figura 4).

Otro aspecto a considerar es que la morfología floral y disposición de las flores en los demás cladodios de la misma planta no favorece el depósito de polen en flores circunvecinas o en un nivel inferior a éstas.

Las observaciones sobre el comportamiento de los insectos que visitaban las flores de *Opuntia* revelaron que el número y el tipo de insectos que visitaron en las flores es variado. Los principales insectos registrados fueron: los himenópteros (abejas, avispas, abejorros) y coleópteros (escarabajos). Las abejas pertenecen a la familia *Halictidae* género *Agapostemon*, así como de la familia *Anthophoridae* género *Diadacia* y familia *Apidae*, siendo la especie *Apis mellifera* la más común, coincidiendo estas observaciones con lo reportado por Grant (1979b; 1979c) y McFarland (1989). Además, las abejas fueron las que realizaban vuelos más largos que variaron



de 2 a 5 m con visitas florales intermedias en diferentes pencas. Comportamiento que se observó con los abejorros de la especie *Bombus steindactineri*, sin embargo el número de individuos que visitaban las flores fue menor comparado con las abejas.

Llamó la atención el hecho de que se identificó un número bajo de abejas *Diadasia rinconis* que previamente habían sido reportadas por García et al. (1984) como el principal polinizador de *Opuntia*. Sin embargo nuestras observaciones sobre los himenópteros en especial las abejas juegan un papel muy importante en la polinización de los miembros del subgénero *Opuntia* en particular las abejas domésticas *Apis mellifera*.

Otros insectos que se encontraron visitando las flores de *Opuntia* fueron de la familia Vespidae. Estos insectos no realizan vuelos demasiado largos, ya que sus visitas se localizaban en flores de la misma planta o plantas vecinas.

Coleópteros de la familia Cleridae y Rhizophagidae se encontraron en las flores, sin embargo, no se observó que realizaran algún vuelo interfloral, ya que solo cuando caía la flor éstos volaban a otra flor cercana.

El comportamiento de los insectos polinizadores durante sus visitas a las flores se ha descrito en varios trabajos como por ejemplo Rosas (1984) y García (1984). Las visitas de los insectos

empiezan por la mañana alrededor de las 10 am, las visitas interflorales se prolongaban desde el mediodía hasta la tarde, a esta hora se observó una disminución en su afluencia por la presencia de vientos fuertes y la disminución de la luz. El comportamiento de las abejas y abejorros es similar, al llegar a la flor se posan sobre el estigma lobulado tocando los estambres cuando buscan néctar y polen, entrando en contacto con los anteras, comportamiento similar al descrito por Rosas (1984). Se observó que el movimiento de los insectos en las series de estambres, provocaba la autopolinización por contacto, entre los estambres de las series internas y el estigma.

A las avispas se les observó en reducidas ocasiones en el estigma y cerca de los estambres, ya que principalmente buscan nectarios en las aréolas que se encuentran en el exterior del perianto. Con respecto al comportamiento de los escarabajos dentro de las flores de *Opuntia*, se les observó forrajeando entre los estambres alimentándose del polen y pocas veces se acercaban al estigma. Sin embargo su desplazamiento entre los verticilos de estambres provoca que éstos se muevan y contacten el estigma originando autopolinización.

6.3 Germinación de los Granos de Polen

En el estigma de la variedad "Burróna" se observó un alto depósito de granos de polen, y todos los estigmas observados mostraron granos de polen germinando, tanto el tratamiento de autopolinizaciones como en las cruces interespecíficas donde se esperaba encontrar evidencias de incompatibilidad o incongruencia inhibiendo la germinación del polen.

Después de 24 h de la apertura floral se observó una gran cantidad de granos que iniciaban la germinación penetrando las células papilares del estigma. En esta zona, se observaron expresiones morfológicas de incompatibilidad. Las más comunes fueron: tapones largos de calosa, y tubos con ramificaciones laterales que se caracterizaban por presentar tapones largos de calosa, lo cual detenía su crecimiento en estadios tempranos del desarrollo (Figura 4).

Estas expresiones morfológicas anormales, no se pueden atribuir a expresiones de incompatibilidad sexual ya que fueron observados tanto en polinizaciones que se consideran compatibles (autopolinización) como incompatibles o incongruentes.

Se podría pensar que las expresiones de estas anormalidades pudiesen afectar el número de tubos polínicos que arriban a la base

del estilo o al lóculo donde se encuentran los óvulos a fecundar. Sin embargo, el registro del número de tubos polínicos en la base del estilo a diferentes intervalos de tiempo (figura 3), nos muestra que su número es superior al número promedio de óvulos. Por lo cual se cree que puede existir una selección de gametofitos masculinos durante la germinación del grano de polen y el desarrollo del tubo polínico, dado que un gran porcentaje del genóma se expresa durante estas fases del desarrollo del gametofito. Esto permite regular las tasas de crecimiento de los tubos durante su desarrollo en el estilo, como los afirman Willing y Mascarenhas (1984), Sari-Gorla *et al.* (1975) citados por Pimienta (1990a).

Por otro lado, estas expresiones de incompatibilidad pueden deberse a fricciones o daños que sufren las paredes y el ápice del corto tubo polínico al penetrar las papilas y también al contacto que existe entre el gran número de tubos que se desarrollan en él, por lo cual la competencia en este caso sería física, ya que es importante mencionar que la cantidad de granos que se depositan es elevado (5000 por estigma). Muchos granos no se observaron germinando, esta cantidad puede crear grandes fricciones entre los cortos tubos en el estigma.

6.4 Desarrollo de los Tubos Polínicos

Una vez que los granos de polen han germinado, los tubos polínicos crecen en el canal del estilo que es hueco.

Para observar el desarrollo y comportamiento de los tubos polínicos que crecen en el tejido de transmisión, se cuantificó el número de tubos polínicos que lograban llegar a la base del estilo a diferentes intervalos de tiempo después de la apertura floral en los cuatro primeros tratamientos (Cuadro 2, Figura 4).

Después de 24 h de la apertura floral, el número de tubos polínicos en la base del estilo no difieren estadísticamente entre los tratamientos de polinización libre y las polinizaciones cruzadas. Aunque en el tratamiento de autopolinización se registró un número promedio menor de tubos polínicos, que en el resto de los tratamientos (Figura 3).

A las 48 h, se observaron diferencias entre los tratamientos con respecto al número de tubos polínicos que se desarrollaron en el estilo. En el tratamiento de polinización libre es menor el número de tubos que llegan a la base del estilo, en contraste con los tratamientos de polinización cruzada, como es de "Burróna" x "Cardona" donde es mayor el número de tubos en el estilo. En el

tratamiento de autopolinización se incremento el número de tubos polínicos, en comparación con el registrado después de 24 h.

El desarrollo de los tubos polínicos para cada tratamiento muestra diferencias. El Tratamiento de polinización libre el desarrollo de tubos polínicos en el tejido estilar es elevado pero este número disminuye con el tiempo (Figura 3), debido a que existe competencia entre los diferentes tubos polínicos por nutrimentos o espacio. Además hay que tomar en cuenta que en este tipo de polinizaciones se desarrollan tubos polínicos tanto de polen de la misma flor o planta o polen de diferentes especies, fenómeno reportado por Rosas (1984). Por lo tanto esta competencia no únicamente se restringe a nutrimentos o espacio, sino que además se puede presentar competencia entre los diferentes genotipos. Dandose de este modo una selección de los tubos polínicos más vigorosos.

Observando el número de tubos polínicos que se desarrollan en estilos de autopolinizaciones nos damos cuenta que existe un retraso en el rango de crecimiento debido a que el número de tubos polínicos no se incrementa con el tiempo en el mismo rango que en los tratamientos de polinización libre y polinización cruzada.

El lento crecimiento de los tubos polínicos en autopolinizaciones puede ser debido a la frecuente aparición de expresiones morfológicas de incompatibilidad observadas en este tratamiento. Sin embargo como se observa en la Figura.4, esto no

resulta en una inhibición de todos los tubos polínicos del tratamiento de autopolinización, debido a que después de 48 h el número de tubos polínicos de este tratamiento aumenta comparándose estadísticamente a las cantidades observada en los tratamientos de polinización libre y polinización cruzada después de 24 h, observándose claramente como los tubos polínicos de autopolinizaciones presentan tasas de crecimiento más lentos comparados con los demás tratamientos. Por lo que estos resultados plantean la existencia de semicompatibilidad en las autopolinizaciones, la cual se caracteriza por las bajas tasas de crecimiento de tubos polínicos (William y Maier, 1977).

El número y las tasas de crecimiento de los tubos polínicos registrados en los estilos de los tratamientos de polinización cruzada son los más altos en comparación con lo observado en los tratamientos de polinización libre y autopolinización en los diferentes intervalos de tiempo en que se observaron tubos polínicos en los estilos (Figura.4), observándose que el desarrollo y el número de tubos polínicos es constante a través del tiempo. Al parecer no se presentan barreras que impidan el desarrollo de éstos.

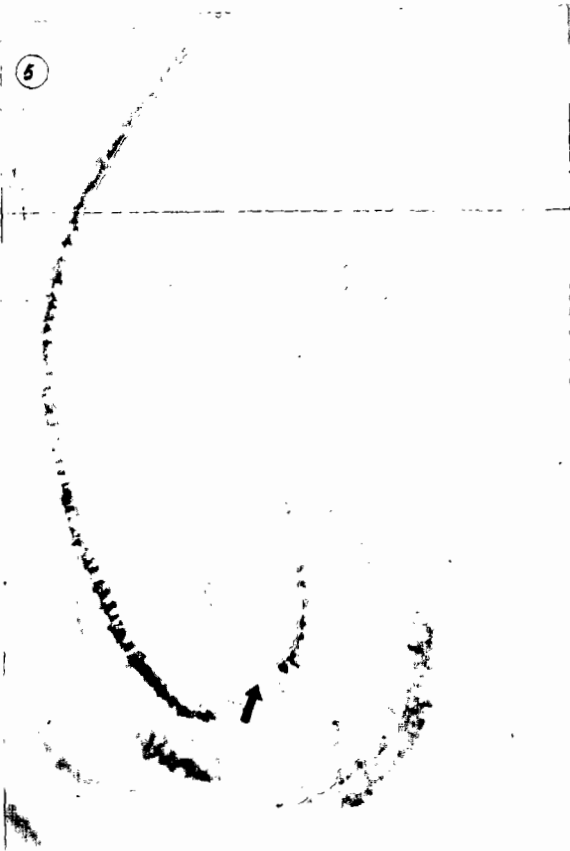


Figura. 4- Abultamiento y deformación de los ápices de tubos polínicos, en el tejido estilar, después de 72 h de la apertura floral en polinizaciones cruzadas ("Burróna"♂ x "Cardona"♀).

Figura. 5- Tubo polínico penetrando por el micropilo del óvulo 72 h después de la polinización cruzada en el tratamiento de polinización cruzada ("Burróna"♂ x "Cardona"♀).

Rosas (1984) reporta que un promedio de 127 tubos polínicos alcanzan la base del estilo 72 h después de la polinización, logrando que 229 óvulos se transformaron en semillas de un total de 267 óvulos por flor. Es decir que los tubos polínicos continúan llegando gradualmente, aún después de las 72 h por lo que se puede asumir que hay suficientes tubos polínicos para fecundar los óvulos que se diferencian en cada flor. En este trabajo, también se encontró que tanto en los tratamientos de autopolinización como de polinización cruzada, se desarrolla una cantidad óptima para fecundar los óvulos que se diferencian en la flor de la variedad "Burrona", que es de 318 por flor. Esto nos permite afirmar que el nivel del estigma y estilo no se presentan los fenómenos de incompatibilidad o incongruencia.

Nuestras observaciones relevaron que todos los tratamientos tanto los considerados como compatibles e incompatibles presentaron expresiones morfológicas de incompatibilidad, sin embargo estas se observaron con mayor frecuencia en los tratamientos de autopolinización.

En autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, las expresiones morfológicas anormales más comunes a nivel de tejido estilar, son los abultamientos y deformaciones del ápice (Figura 4), tapones de calosa (figura 4), ramificaciones laterales y formación abundante de tapones cortos de calosa a lo largo del tubo

polínico, lo cual aparentemente afecta la elongación de los tubos polínicos a través del tejido del estilo. Estas expresiones se observan en la base del estilo y rara vez en la parte media de este.

Cuadro 2. Número de tubos polínicos en la base del estilo. En diferentes intervalos de tiempo, después de la polinización para cada tratamiento.

	Polinización libre	Autopolinización	Cruza 1 (B*σ ² x C*σ ²)	Cruza 2 (B*σ ² x X**σ ²)
24 h	425.7a	305.9b	407.2a	390.4a
48 h	376.9a	399.2a	494.4a	508.2a
72 h	-	-	645.8a	545.7a

*Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Prueba de Duncan P=0.05).

* Variedad "Burróna" - ** Variedad "Cardona" - *** Variedad "Xoconostle"

6.5 Fecundación y Eventos de Post-Fecundación

Los óvulos de la variedad "Burróna" son del tipo bitégmico, crasinucelado y el tipo saco embrional maduro corresponde al tipo polygonum (Rosas, 1984).

Los óvulos, colectados 72 h después de la apertura floral son completamente maduros, en los que es visible la célula huevo,

acompañada de dos sinérgidas con citoplasma denso, la mayoría de las veces éstas se encontraban senescencia, condición que es común en el aparato huevo previo a la fecundación. Así mismo, se observaron los núcleos polares y las antípodas, estas últimas por ser efímeras fueron difícil de observar. Engleman (1960) al describir el megametofito en cactaceas, menciona que este posee ocho núcleos antes o precisamente al tiempo de la apertura floral, que son reducidos después de la fertilización debido a la desintegración o absorción de las antípodas y la fusión de los núcleos polares y el gameto masculino.

Después de 72 h fue comun observar la entrada del tubo polínico a través del micrópilo, por lo que el tipo de fecundación es porogámica (Figura 7), como se ha observado en otros trabajos (García, 1994). Por otra parte, se observó el núcleo del cigoto en la zona micropilar y el núcleo del endospermo primario del lado de la calaza. Esto explica por que el desarrollo del endospermo empieza del lado de la calaza. Los núcleos del endospermo en la calaza no presentan paredes o divisiones, lo cual coincide con el tipo de endospermo nuclear o no celular descrito por Esau (1976). Por otra parte Engleman (1960) menciona que la existencia de núcleos libres ocurre hasta el quinto día.



CUCU



PROTE...

Figura. 6- Nucleos del enspermo celular o libre en óvulos 72 h después de la apertura floral en Autopolinizaciones.

figura. 7- Desarrollo de las papilas dorsales, en óvulos. 30 días después de la Polinización Cruzada ("Burrona" x "Xoconoxostle").

8



9



Figura. 8- Semillas abortivas colectadas 30 días después de la polinización cruzada ("Burrona"♂ x "Xoconoxtle"♀), en la que se distingue la formación de papilas dorsales

Figura. 9- Semillas abortivas en las que se aprecia las primeras divisiones del embrión, 30 días después de la fecundación cruzada ("Burrona"♂ x "Xoconoxtle"♀).

En las cruizas, el desarrollo del endospermo es del tipo celular, y sus nucleos los podemos encontrar a través del saco embrional principalmente en la calaza y el centro.

Es importante aclarar que el endospermo no se presentó como un tejido abundante debido a que los núcleos estuvieron distribuidos principalmente en la calaza y al centro del saco embrional y raramente del lado del micrópilo.

Otra evidencia de fecundación fue la aparición o desarrollo de las papilas dorsales (Figura 9). Estas papilas como lo describe Engleman y Pimienta (1985) se desarrollan en los óvulos a partir de las células epidermales dorsales de la cobertura funicular, las que posteriormente dan origen a la pulpa o porción comestible del fruto.

Engleman y Pimienta (1985) menciona que estas papilas aparecen a partir del segundo o quinto día después de la polinización floral, sin embargo, en nuestras observaciones se aprecian muy desarrolladas hasta los treinta días. En los tratamientos de polinización libre los óvulos colectados 30 días después de la polinización, mostraron papilas largas con núcleos grandes. Las papilas pueden observarse hasta en óvulos de tratamientos compatibles (autopolinización) como las no compatibles o incongruentes (polinizaciones cruzadas), no obstante que las semillas presentan anomalías en su desarrollo (Figura 10).

En los tratamientos de autopolinización la mayoría de los óvulos se encuentran deformes, que es característico de óvulos senescentes. En los tratamientos de autopolinizaciones la mayoría de los óvulos se encuentran deformes, que es característico de ovulos abortados. En estos no se observa el desarrollo del embrión, ni del endospermo, la cavidad del saco embrional se encuentra colapsada, los integumentos enjuntados y las papilas dorsales no se desarrollan. Por lo cual se piensa que en estos óvulos no se realizó la doble fecundación.

Una vez realizada la fecundación cruzada, los sistemas de incompatibilidad se pueden expresar en diferentes niveles durante el desarrollo de la semilla. Presentándose óvulos necróticos con el saco embrional colapsado, y ausencia de núcleos del endospermo, observándose el núcleo del cigoto, muy grande en la zona micropilar, lo que nos sugiere que la inhibición se presenta en una fase muy temprana, poco tiempo después de la doble fecundación.

En las polinizaciones cruzadas fue común observar síntomas de aislamiento reproductivo post-cigótico, ya que fue común encontrar embriones en que se detuvo su desarrollo en etapas iniciales de su desarrollo, por lo que un número muy bajo de semillas (1%-2%) presentaron desarrollo normal (Figura 11).

En los óvulos de polinizaciones cruzada, aun cuando el funículo y el óvulo se presenta un alto grado de senescencia es posible observar el desarrollo de papilas dorsales. Estas papilas

también deformes en su citoplasma así como en su núcleo (Figura 10). Sin embargo la presencia de papilas es una evidencia de la doble fecundación, aun así el endospermo falló en su posterior desarrollo dando como resultado la degeneración del proembrión como lo han reportado en otras especies (Tukey 1933; y Grant 1989). Esta es considerada como la primera fase crítica en el desarrollo de un híbrido.

En los tratamientos de polinización cruzada se observaron óvulos que presentaron características similares a las observadas en óvulos normales en polinizaciones libres y autopolinizaciones, sin embargo en estas no se observaron indicios del desarrollo del proembrión, aun cuando se observó el desarrollo del endospermo.

En base a las observaciones hechas por Engleman (1960) en los óvulos de cactáceas, se debe de apreciar embriones bien desarrollados esféricos y con un gran suspensor o, mínimo, una hilera de tres a cuatro células. Sin embargo, ninguno de estos estadios embrionarios se observan, suponiendo que la embriogénesis en *Opuntia* es lenta y el endospermo se desarrolla mucho antes que el embrión; el cual empezaría con las primeras divisiones hasta que el endospermo este bien desarrollado como endospermo celular ocupando mayor espacio en el saco embrional.

6.6 Incompatibilidad sexual

La mayoría de los autores dividen los sistemas de incompatibilidad sexual en esporofítico y gametofítico, de acuerdo al sitio del estilo donde se inhibe el desarrollo del gametofito masculino. En nuestras observaciones en autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, se encontró germinación normal de los granos de polen y el desarrollo de los tubos polínicos en el estilo. De acuerdo a estas observaciones no existen mecanismos de aislamiento reproductivo durante la fase progámica que regulen el desarrollo de tubos polínicos compatibles e incompatibles en el estilo, por lo que el aislamiento reproductivo en *Opuntia* aparentemente se expresa durante las etapas iniciales post-cigóticas, después de la fecundación de los óvulos.

Las observaciones realizadas en las polinizaciones cruzadas, las que se caracterizan óvulos con el saco embrional colapsado, con deformaciones de núcleos de la nucela y papilas dorsales, así como la degeneración del proembrión en estadios muy tempranos de su desarrollo, nos permite sugerir que los mecanismos de aislamiento reproductivo del tipo precigótico no existen, si no que más bien se expresan como barreras post-cigóticas.

Confrontando las investigaciones anteriormente descritas con nuestros resultados, hace suponer que la causa por la cual las cruzas interespecíficas realizadas no desarrollaron semillas con embriones híbridos, debido a que las morfoespecies empleadas en este estudio se encuentran en proceso de especiación, la cual incluye el desarrollo de mecanismos de aislamiento reproductivo (Solbring, 1966; Grant, 1989), divirgiendo genéticamente de su población original. Como explica Dobzhansky (1983), resulta más difícil que sus genotipos interactuen armoniosamente en un híbrido. Sin embargo, es recomendable que se realicen trabajos más detallados sobre la embriogénesis de cruzas interespecíficas del subgénero *Opuntia* y que estas cruzas sean recíprocas para observar la presencia de incompatibilidad unidireccional.

6. CONCLUSIONES

- Las barreras de aislamiento reproductivo no se manifiestan durante la fase progámica, ya que no se afectó la germinación de los granos de polen ni el desarrollo de los tubos polínicos en el estilo así como la fecundación de los óvulos.
- Las barreras de aislamiento reproductivo se observaron después de la fecundación de los óvulos. Por lo cual fue evidente la aborción de éstos, que se acompañó por la suspensión del crecimiento de los embriones en fases iniciales de su desarrollo y el pobre desarrollo del endospermo.

. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Aguilar, L.A. y Pimienta B.E. 1985. Desarrollo de tubos polinicos tubo floral y viabilidad de óvulos en polinizaciones compatibles e incompatibles en manzano (*Malus pumila* Mill). *Agrociencia* 62: 41-50.
- Alvarez, N.B. 1990. Efecto de la fertilización química y orgánica en componentes reproductivos del nopal (*Opuntia Ficus-indica* (L) Miller) tunero y variedad naranjona. Tesis licenciatura. Universidad de Guadalajara.
- Ascher, P.D. 1966. A gene action model to explain gametophytic self-incompatibility. *Euphytica* 15: 179-183.
- Boke, N.H. 1980. Development, morphology and anatomy of cactaceae. *BioScience* 30(9): 605-610.
- Bradley, M.V. and W.H. Griggs. 1963. Morphological evidence of incompatibility in *Olea europaea* L. *Phytomorphology* 13 (2): 141-156.
- Bradley M.P. and J.B. Reid. 1988. Hibridization as a dispersal mechanism. *Evolution* 42(6): 1245-1255.
- Bravo, H.H. 1987a. "Las Cactáceas de México". UNAM, segunda ed. 735 pp.
- 1987b. Consideraciones acerca de la clasificación morfológica y distribución de las cactáceas. *Cact. Suc. Mex.* 23: 9-20.
- Brook, R.M.; V. Bradley and T.I. Anderson 1959. Plant Microtechnique Manual. University of California, Davis. 70 p.
- Bryant L.R. 1935. A Study of the factors affecting the development of the Embryo-Sac and the Embryom McIntosh Apple. *Thechical Bulletin*. 61: 3-40.
- Buxbaum, F. 1955. Morphology of Cacti. Section I. Roots and stems. Pasadena: Abbey Garden Press, California. 1-87.
- Byerzychdek, P. 1980. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *Am. Nat.* 117: 838-840.

- Carney, S.E; M.B. Cruzan and M.L. Arnold. 1994. Reproductive interaction between hybridizing irises: Analyses of pollen-tube growth and fertilización succes. Amer. Jour. of Bot. 81(9): 1169-1175.
- Cheadle, V.I; E.M. Gifford and K. Esau. 1953. A staining combination for phloem and contiguous tissues. Stain technol. 28(2): 49-53.
- Conde, F.L. 1975. Anatomical comparison of five species of *Opuntia* (Cactaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 62: 425-473.
- Crepet, L.W, 1983. The role of insect pollination in the evolution of the angiosperms. En: pollination Biology. L Real(Ed) Academic Press, Orlando Florida.
- Dobzhansky, T. 1983. Evolución. Ed. Barcelona: OMEGA. 558 p.
- Dumas, C. and Knox, R.B. 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. Theor. Appl. Genet. 67: 1-10.
- Engleman E. Mark. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. Amer. J. of Bot. 47: 460-467.
- Esau, k. 1965. Plant Anatomy. Second ed, Wiley. 767 p.
- Felipe, C.R. 1986. La selección natural de los sistemas de cruzamiento en *Opuntia rubusta*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. 133 p.
- Fernández, E.R; L. Rallo. 1981. Influencia de la polinización cruzada en el cuajado de frutos de cultivares de olivo (*Olea eupaca L.*) ITEA, 45: 51-58.
- Ferrari, T.E. and D.H. Wallace. 1977. A model for self-recognition and regulation of the incompatibility response of pollen. Theor. Appl. Genet. 50: 211-225.
- Free, B.J. 1970. Insect pollination of Crop. Academic Press, Nueva York, 544 p.
- Foster, and E.M. Gifford. 1974. Comparative Morphology of Vascular Plants. 2ª ed. 751 p.

- Futuyma, D.J. 1986. Evolutionary Biology. Sinaver Associates Inc. Publisher. Sunderland Massachusetts. 600 p.
- García, A.M. 1994. Evidencias Morfológica y Citológicas de Agamosperma en Morfoespecies de *Opuntia* spp. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara.
- García, S.R. 1984. Patrones de polinización y fenología floral en poblaciones de *Opuntia* spp. en San Luis Potosí y Zacatecas. Tesis de Licenciatura en Biología. UNAM. 128 p.
- García, S. R. y M.E. González. 1984. Abundancia y distribución de flores y forrajeo de polinizadores de especies de *Opuntia* Resúmenes del 9° Congreso Mexicano de Botánica. del 9-14 de septiembre de 1984. México, D.F. Sociedad Botanica de México, A.C. 143 p.
- Gates, D.M; R. Aldefer y E. Taylor. 1968. Leaf temperature of desert plant. Science, 159: 994-995.
- Gibson, C.A. y P.S. Nobel. 1986. The Cactus Primer Cambridge. Harvad University Press. 286 p.
- Grace, J.B. y D. Tilman. 1990. Perspectives on Plant Competition. Ed. Academic Press, inc. 484 p.
- Grant, V. y K. Grant. 1980. Clonal microspecies of hybrid origen in the *Opuntia linditelmeri* group. Bot. Gaz. 141(1): 101-106.
- Grant, V. and K. Grant. 1979a. Pollination of *Opuntia basilaris* and *O. littoralis*. Pl. Syst. Evol. 132: 321-325.
- 1979b. Pollination of *Opuntia lindneimer*, and related species. Pl. Syst. Evol. 132: 313-320.
-1979c. Hybridization and variation in the *Opuntia pheacantha* group in central texas. Bot. Gaz. 140(2): 208-215.
-1979d. The Pollination Specrtrum in the Southwester American Cactus Flora. Pl. Syst. Evol. 133: 29-37

- Grant, V. 1989. *Especiación Vegetal* Ed. Limusa. 585 pp.
- Grayum, H.M. 1991. Systematic Eebryology of Araceae. The Botanical Review, Vol. 57(3): 167-203.
- Henny, R.J. and P.D. Ascher. 1977. Sporophytic recognition of pollen S alleles in the gametophytic self-incompatibility system of *Nemesia strumosa*. Theor. Appl. Genet. 49:15-19.
- Hopping, E.M. and Jerram. 1980. Supplementary pollination of tree fruits. II Field Trials on Kinwifruit and Japan plum. No.2, J. of Agri. Research. 27: 517-521.
- Heslop-Harrison. 1978a. Recognition and response in the Pollen-Stigma interaction. Simposium Society Experimental Biology XX. 121-134.
- 1978b. Genetics and physiology of angiosperm incompatibility Systems., Proc. R. Soc. Lond. B. 202: 73-92.
- Jafferries, J.C. and A.R. Belcher. 1971. A fluorescent brightener used for pollen tube identification *in vivo*. Stain technol. 49: 199-202.
- Jensen, W.A. 1973. Fertilization in flowering plants. BioScience. 23(1): 21-26.
- Johansen, D.A. 1950. Plant Embryology. Waltham, Mass; USA. Published by The chronica Botanica Company. 305 pp.
- Johri, B.M. and S.P. Bhatnagar. 1973. Some histochemical and ultrastructural aspects of the female gametophyte and fertilization in angiosperms. Caryology. Vol. 25: 9-25 suppl.
- Kalpin, N.R. y Bhathager. 1975. A fresh look at the process of double fertilización in angiosperm. Phytomorphology 25: 334-368.
- Kalpin, R.N. and S.C. Tiwari. 1977. Plant Embryological Investigations and fluorescence Microscopy. An Assesment of integration International Revier of cytology. 317-327 p.
- Karunanandaa, B; S. Huang and Teh-hui Kao 1994. Carbohydrate Moiety of the *Petunia inflata* S₃ protein is not required for

self-incompatibility interactions between pollen and pistil.
The plant Cell, 6: 1933-1940.

Kluge, M.E.; I.P Ting. 1978. Crassulacean and Metabolism Berlin Heidelberg. Springer Verlag. 209 p.

Lewis, D. 1948. Structure of the incompatibility gene I.
Spontaneous mutation rate Heredity 2: 219-236.

..... 1954. Comparative incompatibility in angiosperms and
Fungi Adv. Genet. No. 6: 235-284.

Li, X; J. Nield; D. Hayman and P. Langridge. 1994. Cloning a
putative self-incompatibility gene from the pollen of the
Grass *Phalaris coerulea*. The Plant Cell, vol. 6: 1923-
1932.

Lindsey, K; M.G.K. Jones. 1989. Biotecnología Vegetal Agrícola.
Ed. Acribia, S.A. 276 pp.

Linskens, H.F. 1964. Pollen physiology. Annv. Rev Plant. Physiol.
15: 255-270.

.....1973. Activation of the ovary. Caryologia, Vol.25:
29-41 suppl.

..... 1976. The physiological basis of incompatibility
in angiosperms In: Gamete Competition in plants and animals.
(ed) D.L. Mulcahy. North-Holland. Amsterdam. 148-157.

.....1975. Incompatibilidad in *Petunia*. R. Soc. Lond.
B. 188, 299-311.

.....1983. Pollination procesess: Understanding
fertilización and limits to hybridization, in strategies of
plant reproducción. W.J. Mevet (ed) (Allsnheld Osmond
Publidhers, Granada), 35-49.

Little, T.M. y J. Hills. 1987. Métodos estadísticos para la
investigación en la agricultura. Ed. Trillas. 7ª ed. 270 pp.

López, A.L.O. 1991. Estudio Anatómico fisiológico comparativo en
morfoespecies de nopal (*Opuntia* spp) tunero. Tesis de
Licenciado en biología. Universidad de Guadalajara.

- Mauricio, L.R. 1985. Caracterización fenológica y morfológica de formas de noapl (*Opuntia* spp) tunero en el antiplano potosino zacatecano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agricultura, Universidad de Guadalajara.
- Mayr, E. 1987. Algunas ideas sobre la historia de la síntesis evolutiva. UNAM. 50 pp.
- McFarland, J.D; P.G. Kevan and M.A. Lane. 1989. Pollination biology of *Opuntia imbricata* (Cactaceae) in southern Colorado. Vol. 67(1): 24-28.
- Mettler, L.E; T.G. Gregg. 1982. Genética de las poblaciones y evolución. Ed. uteha. 245 pp.
- Mikesell, J. 1988. Comparative development of viable and aborted ovules in *Phytolacea americana* L. (Phytolacaceae). Bot. Gaz. 149(2): 196-202.
- Morse, D.H. 1994. The role of self-pollen in the famele reproductive succes of common milkweed (*Asclepias syriaca*: Asclepiadaceae). Am. Jor. of Bot. 81(3) 322-330.
- Muñoz, U.A. 1995. Estudio anatómico, morfológico y citológico de seis variedades de nopal tunero del altiplano potosino-Zacatecano. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados de Chapingo. 65 pp.
- Nobel, S.P. 1982. Orientación of terminal cladodes of playopuntias Bot. Gaz. 143(2): 219-224.
- Olesen, P; L. Bruum and P. Steen. 1992. The use of incompatibility in breeding programmes. Reproductive biology and plant breeding. Reprint from Y. Datte, C. Dumas, A. Gallais (eds.) 177-186.
- O'Neil, P. 1994. Genetic incompatibility and offspring quality in the tristyus plant *Lythrum salicaria* (Lythraceae). Amer. Jour of Bot. 81(1): 76-84.
- Orea, R.T.B. 1986. Variación morfológica de formas de nopaleras silvestres del Suroeste del desierto Chihuahuense. Tesis Ingeniero Agronomo Universidad Autonoma de San Luis Potosi. 90 p.

CU



BIBLIOTECA

- Pattee, H.E. and H.T. Stalker. 1992. Embryogenesis in reciprocal crosses of *Arachis hypogaea* cv NC6 with *A. duranensis* and *A. stenosperma*. *Int. J. Plant Sci.* 153(3): 341-347.
- Peralta, M.V.M. 1983. Caracterización fenológica y morfológica de formas de nopal (*Opuntia* spp) de fruto (tuna) en el antiplano potosino-zacatecano. Tesis profesional Ingeniero Agronomo. UAA. 88 pp.
- Percival, S.M. 1969. *Floral Biology*. Pergamun Press, Londres. 243 pp.
- Pierson, E.S; D.D. Miller; D.A. Callaham; A.M. Shipley; B.A. Rivers; M. Cresti and P.K. Hepler. 1994. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *The Plant Cell*, 6: 1815-1828.
- Pimienta, B.E. Y E.M. Engleman. 1981. Estudio del desarrollo de la yema floral y el fruto en nopal. III Congreso nacional de fruticultura, Guadalajara, Jal. 222 pp.
- Pimienta, B.E; V.S. Polito and D.E. Kester. 1983. Pollen tube growth in Cross- and self -pollinated "Nonpareil" almond. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108(4): 643-647.
- Pimienta, B.E; E.M. Engleman. 1985. Desarrollo de la pulpa y la porción en volumen de los componentes del lóculo maduro en tuna (*Opuntia Ficus-indica* (L)L Miller). *Agrociencia*, 62: 51-56.
- Pimienta, B.E; E.M. Engleman y P.C. Rosas. 1985. Algunos aspectos del ciclo reproductivo del nopal (*Opuntia* spp) tunero. Memorias del Seminario Sobre la Investigación genética Básica en el conocimiento y evaluación de los recursos Genéticos. Jardín Botánico UNAM y SOMEFI. 96-105.
- Pimienta, B.E. 1987. Polinización y Fecundación en frutales perennes. *SARH*. 4: 5-26.
-1990. El nopal tunero, Universidad de Guadalajara, Primera impresión. 246 pp.
- 1990a. Fase Progámica en angiospermas. *Ciencia* 41: 319-332.

- Pimienta, B.E; A.A. Delgado y R.L. Mauricio. 1987b. "Evaluación de la variación de las formas de nopal (*Opuntia spp*) tunero en la Zona Centro de México", en Strategies for Clasification and Managament of Native vegetation for Food Production in Arid Zones. Tucson, AZ.
- Pimienta, B.E.; M. Loera Q.; L.O. López A. 1993. Estudio anatómico comparativo en colectas del subgénero *Opuntia*. Agrociencia Serie Fitociencia. Vol. 4: 7-21.
- Pulido, A.M.G. 1991. Polinización Críptica en orquidea (*Bahuinia varigata* (L)) Primavera. Tesis profesional Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 74 pp.
- Rabinovich, J. y G. Halffter. 1979. Tópicos de Ecología Contemporanea. Fondo de Cultura Económica. México. 190 pp.
- Rodríguez, Z.O. 1981. Fénología reproductiva y aporte de frutos y semillas en dos nopaleras del antiplano potosino-zacatecano. Tesis profesional. Universidad Autonoma de Nuevo Leon.
- Rosas, C.M.P. 1984. Polinización y Fase Progámica en *Opuntia spp* Tesis profesional de Licenciatura. Universidad de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 76 pp.
- Rosas, C.M.P. y B.E. Pimienta. 1986. Polinización y Fase Progámica en nopal (*Opuntia ficus-indica* (L) Miller) tunero. Fitotecnia. 164-176.
- Rosen, W.G. 1974 Polen-pistil interactions. In The Biology of the Male Gamete. J. G. Ducktt and P. A. Racey. Biol. J. Lin. Soc. Suppl. Vol. 7(1): 153-164 .
- Rost, L.T. 1985. Botánica Introducción a la Biología Vegetal. Ed. Limusa. México. 466 pp.
- Saigo, R.H. and B.W. Saigo. 1983. Botany principles and applications. Ed. Prentice Hall. 537 pp.
- Sastri, D.C. and J.P. Moss. 1982. Effects of growth regulator on incompatibility crosses in the genus *Arachis* L. Journal of Experimental Botany. 33(137): 1293-1301.
- Sears, E.R. 1937. Citological Phenomena connected with self-sterility in the flowering plants. Genetics 22: 130-181.

- Sorensson, C.T. and J.L. Brewbaker. 1994. Interespecific compatibility among 15 *Leucaena* species (Leguminosae: Mimosoideae) via artificial hybridizations. *Amer. J. of Bot.* 81(2): 240-247.
- Solbrig, O.T. 1966. *Evolution and Systematics*. Ed. The Macmillan Company, New York. 122 pp.
- Tomer, E. and S. Gazzit. 1979. Early stage in avocado (*Persea americana* Mill). fruit development: Anatomical Aspects. *Bot. Gaz.* 140(3): 304
- Trujillo, A.S. 1986. Aislamiento reproductivo y formas de reproducción en *Opuntia* spp. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados de Chapingo. 79 pp.
- Tukey, H.B. 1933. Embryo abortion in early-ripening varieties of *Prunus avium*. *The Bot. Gaz.* Vol. XCIV. 3: 433-468
- Weiz, R.B. y M.S. Fuller. 1978. *Tratado de Botánica*. Ed. SECSA 6ª ed. 740 pp.
- Whitting, H.B; H.A. de Venter y J. G. S. Small. 1979. Crassulacean acid metabolism in jointed cactus (*Opuntia aurantiaca* (Lindley). *Agroplanta*, 11: 41-43.
- Williams, W. 1965. *Principios de genética y mejora de plantas*. Ed ACRIBIA. Zaragoza, España. 527 pp.
- Williams, E.G. y G. de Lautour. 1980. The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interespecific hybrids in pasture legumes. *Bot. Gaz.* 141: 252- 257.
- Williams, E.G. and M. Maier. 1977. Pseudo-compatibility after Self-pollination of the apple Cox's Orange Pippin. *J. of Hort.Sc.* 52: 475-483.

APENDICE

Análisis de varianza con parcelas subdivididas para número de tubos polínicos en la base del después de 24h de la apertura floral.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F observada	F requerida
Total	39	380394.4			1% 5%
Bloques	9	172451.9	19161.322	4.1762278	3.14 2.25
Variedad	3	84061.4	28020.467	6.1070866	4.6 2.96
Error	27	123881.1	4588.1889		

Después de 48h de la apertura floral

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Observada	F Requerida
Total	39	717764.2			1% 5%
Bloques	9	61066.55	6785.1722	2.8657444	3.14 2.25
Variedades	3	131694.3	43898.1	2.2576021	4.6 2.96
Error	27	525003.35	19444.569		

Después de 72 h de la apertura floral.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Observada	F Requerida
Total	1	239648.9			1% 5%
Bloques	9	79490.4	8832.2667	.76	3.52 2.43
Variedad	1	56286	56286	4.8	8.18 4.38
Error	9	103872.5	11541.389		