

POLINIZACION Y FASE PROGAMICA EN NOPAL Opuntia ficus-indica (L) Miller) TUNEROPilar Rosas Ceja <sup>1</sup> y Eulogio Pimienta Barrios <sup>2</sup>

## RESUMEN

En este estudio se describen los mecanismos de polinización y la fase progámica en dos formas de nopal (Opuntia ficus-indica (L) Miller) tunero. Las flores presentan características de flores efímeras; abren y cierran el mismo día. Las observaciones de la presencia de granos de polen revelaron que los estigmas de las flores son cubiertos por una combinación de granos de polen derivados de la autopolinización y de la polinización cruzada. En una de las formas evaluadas (fayuco) se registró dehiscencia de las anteras antes de la apertura de la flor (cleistogamia preantesis). La germinación de granos de polen y el crecimiento de tubos polínicos es relativamente rápida, registrándose tubos polínicos en la base del estilo 24 horas después de la apertura de la flor. El estilo es hueco y los tubos polínicos se desarrollan en la superficie de la epidermis glandular del canal estilar. Un número alto de tubos polínicos empieza su crecimiento en la porción superior del estilo, en comparación con los que empiezan en la base del estilo. La fecundación de los óvulos es gradual y empieza dos días después de la polinización y se prolonga por ocho días más. El promedio de óvulos fecundados es alto y fluctúa entre 70 y 80%. Las observaciones de la presencia de granos de polen adheridos al estigma y de la fecundación de óvulos, sugieren que las semillas producidas en los frutos del nopal tunero son el resultado de la autofecundación y fecundación cruzada.

## SUMMARY

The pollination mechanisms and the proghamic phase were studied in two forms of prickly pear (Opuntia ficus-indica (L) Miller). The flowers showed characteristics of ephemeral flowers, opening and closing in the same day. The observations of pollen grain deposition revealed that the stigmas are covered by a mixture of pollen grains derived from cross and self-pollination. In one of the evaluated forms, anther dehiscence was observed before flower opening (preanthesis cleistogamy). Pollen grain germination and pollen tube growth occur relatively fast, since pollen tubes were observed at the base of the style 24 hr after flower opening. The style is hollow, and the pollen tubes develop on the surface of the glandular epidermis of the stylar canal. A high number of pollen tubes started to grow in the upper half of the style as compared to the number of pollen tubes growing at the base of the style. Ovule fertilization occurs progressively, starting two days after flowering opening and ending eight days later.

<sup>1</sup> Ex-becaria del Centro Regional de Enseñanza e Investigación para Zonas Áridas y Semiáridas. CREZAS-CP. Salinas, San Luis Potosí.

<sup>2</sup> Investigador INIFAP. Programa de Fruticultura. CAESLP-CIANOC-SARH. San Luis Potosí.

The observation of pollen grain deposition and ovule fecundation suggests that the seeds developed in the prickly pear fruit are the result of both cross and self-fertilization.

## INTRODUCCION

El término fase progámica, se refiere a los eventos que empiezan desde que los granos de polen llegan a la superficie receptiva del carpelo (estigma) y terminan cuando el gameto masculino fecunda a la célula huevo (Polyakov, 1964). La caracterización de la fase progámica permite identificar factores que limitan el prendimiento de frutos, y además ayuda a entender los mecanismos de polinización e hibridación de la especie en estudio, así como algunos aspectos relacionados con estrategias de reproducción en especies vegetales.

El objetivo de este trabajo es describir algunos aspectos de los mecanismos de polinización y de la fase progámica del nopal tunero.

## MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en dos formas de nopal (Opuntia ficus-indica (L) Miller) tunero que forman parte de una nopalera de solar localizada en los terrenos del CREZAS-CP. Una de estas formas se conoce como "fafayuco" y la otra como "liso"; la edad de las plantas fluctúa entre 13 y 15 años.

### Mecanismos de Polinización

En las dos formas se realizaron observaciones en las flores antes y durante la apertura de éstas. Las observaciones antes de la apertura se hicieron mediante disección longitudinal, con el fin de registrar la dehiscencia de las anteras y la presencia de granos de polen adheridos al estigma. Al empezar la apertura de flores, las observaciones se hicieron a intervalos de una hora (entre las 8:00 y las 19:30 horas) durante una semana, y cada dos horas durante el resto del período de floración. Se registraron los siguientes datos: a) horas del día en que ocurría la apertura y cierre de flores; b) actividad de insectos polinizadores; c) tiempo en que ocurre la dehiscencia de anteras; d) presencia de granos de polen adheridos al estigma.

### Receptividad del Estigma

Debido a que en una de las formas evaluadas ("fafayuco") se observó dehiscencia en las anteras antes de la apertura floral, se procedió a evaluar la receptividad de los estigmas de estas flores. Para ello se cortaron los estilos de 50 botones florales, aproximadamente 10 días antes de la apertura floral; los estilos obtenidos se colocaron en frascos vial, con sus bases sumergidas en una solución de sacarosa al 10% para retrasar su senescencia, y fueron autopolinizados mediante frotación de sus estigmas con anteras dehiscentes de las mismas flores. Se colectaron muestras de estilos a diferentes intervalos después de realizada la autopolinización (24, 48, 72, 96 y 120 horas); los estilos colectados se conservaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  en el congelador de un refrigerador doméstico.

Para observar la germinación de granos de polen y el desarrollo de tubos polínicos, los estilos se colocaron en una solución acuosa de carbonato de sodio (1%) por una hora. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se colocaron en sulfato de sodio (1%) para ser ablandados en una olla de presión por un período de 20 minutos (Jefferies y Belcher, 1971). Después del ablandamiento se encontró presencia de mucílago en los estilos que causaba interferencia en las observaciones del desarrollo de tubos polínicos en el estilo, por lo que se procedió a remover este compuesto utilizando el siguiente procedimiento: se colocaron los estilos ablandados en carbonato de sodio (1%) por un período de 24 horas, se lavaron en agua destilada, y se colocaron en acetona (80%) para ser agitados por 30 minutos en un plato magnético.

Posteriormente, los estilos se tiñeron con azul de anilina (0.005%) en  $\text{KH}_3\text{PO}_4$  con un pH de 9.0. La fluorescencia inducida por la reacción de azul de anilina con los tapones de callosa en los tubos polínicos, fue observada con un microscopio Zeiss equipado con un sistema de luz reflejada (epi-iluminación) provista por una lámpara de mercurio HB050, y usando la combinación de filtros Zeiss 98 77 05 que proporcionan excitación azul violeta y filtro barrera a 470 nm.

### Desarrollo de Tubos Polínicos en el Estilo y Fecundación de Ovulos

En esta parte del estudio se utilizaron las dos formas de nopal mencionadas previamente: "fafayuco" y "liso". En plantas diferentes de cada una de las dos formas, se marcaron 200 botones florales en estados similares de desarrollo.

de las anteras de los verticilos internos que se encontraban en contacto con el estigma al momento en que empezó la apertura.

Una vez que la flor abre completamente, la porción superior del estigma se cubre de granos de polen, cuyo origen es diverso; el polen puede provenir de otras flores transportado por insectos, o por autopolinización estimulada por el viento, debido a que éste causa movimiento de estambres y polinización por contacto. También se observó que las abejas estimulan la autopolinización; estos insectos al penetrar entre los estambres en búsqueda de nectarios, causan desplazamiento lateral de estambres, con lo cual ocurre también autopolinización por contacto.

Las flores fueron visitadas por dípteros, coleópteros e himenópteros, los que iniciaban sus visitas a partir de las 10 y terminaban a las 17 horas, registrándose una mayor actividad al incrementarse las temperaturas ambientales. De estos insectos, las abejas fueron las que más frecuentemente visitaron las flores. El viento por una parte estimula la autopolinización y por otra reduce la actividad de los insectos polinizadores en nopal.

Se encontraron diferencias entre las dos formas de nopal estudiadas en cuanto al tiempo en que se presentó la dehiscencia de las anteras. En la forma denominada "fafayuco" se registró la dehiscencia antes de la apertura de la flor, mientras que en la forma "liso" la dehiscencia empezó al momento de la apertura.

#### Receptividad del Estigma

Se encontró que los estilos de botones florales son receptivos, ya que en muestras colectadas a las 24, 72 y 120 horas después de la autopolinización se registró un 100% de estigmas con granos de polen germinados; un porcentaje menor de receptividad (70%) se registró en estilos colectados a las 48 y 96 horas después de la polinización (Cuadro 1). Estas observaciones confirman que en la forma "fafayuco" el estigma es receptivo antes de que ocurra la apertura floral.

Cuadro 1. Receptividad del estigma en estilos de la forma "fafayuco" (10 estilos por cada fecha de observación).

Horas después de la polinización	Porcentaje de estilos con granos de polen germinados
24	100
48	70
72	100
96	70
120	100

Desarrollo de Tubos Polínicos y  
Fecundación de Ovulos

Una característica distintiva de la flor de nopal, es que el estilo es hueco; tiene un canal entre el estigma y la cavidad locular. En este tipo de estilos, el crecimiento de tubos polínicos es sobre la epidermis glandular del canal. Un alto número de granos de polen (no determinado) se depositaron en los estigmas de ambas formas estudiadas. La rápida germinación de granos de polen se evidenció por la existencia de tubos polínicos en la base del estilo, 24 horas después de la apertura de la flor (en ambas formas) siendo superior el porcentaje de estilos con tubos polínicos en la forma "fafayuco" (70%) que en la "liso" (50%). Sin embargo, a las 48 y 72 hr después de la apertura se encontró que el 100% de estilos de ambas formas presentaban tubos polínicos en la base (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de estilos de las formas "fafayuco" y "liso" con tubos polínicos en la base del estilo, a diferentes horas después de la apertura floral (10 estilos por cada fecha de observación).

Forma de nopal	Horas después de la apertura			
	0	24	48	72
"Fafayuco"	0	70	100	100
"Liso"	0	50	100	100

La frecuencia de tubos polínicos en diferentes posiciones del estilo y a diferentes horas después de la polinización se presentan en los Cuadros 3 y 4. Dicha frecuencia varió entre la parte superior del estilo y la base de éste, siendo considerablemente mayor el número de tubos polínicos que empiezan su desarrollo en el cuarto superior del estilo, que los que empiezan en la base del estilo. En ambas formas se registraron tubos polínicos en la base del estilo 24 horas después de la apertura, con una mayor frecuencia de estilos en la forma "fafayuco" que en la "liso". En las observaciones realizadas a las 48 y 72 horas después de la polinización, se encontró una tendencia similar, indicada por una frecuencia más alta de tubos polínicos en la punta que en la base del estilo.

El número promedio de tubos polínicos en el cuarto superior del estilo (estigma-1/4) fue superior en la forma "fafayuco" que en la "liso"; un comportamiento similar fue registrado para las diferentes posiciones del estilo y para los distintos tiempos en que se evaluó la frecuencia de tubos polínicos (Cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Número promedio de tubos polínicos en diferentes posiciones del estilo y diversos períodos después de la apertura de la flor, en estilos de la forma "fafayuco" (10 estilos por observación)<sup>1</sup>.

Horas después de polinización	P O S I C I O N E S D E L E S T I L O			
	Estigma-1/4	1/4-1/2	1/2-3/4	3/4-base del estilo
24 hr	397±21.10a	292±19.89b	175±69.55b	53±45.22b
48 hr	393±28.69a	340±21.08a	230±25.81a	151±21.05a
72 hr	346±27.16b	292±15.81b	225±54.00a	127±39.17a

<sup>1</sup>Medias agrupadas con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Prueba de Tukey, P = 0.05).

Cuadro 4. Número promedio de tubos polínicos en diferentes posiciones del estilo y diversos períodos después de la apertura de la flor, en estilos de la forma "liso" (10 estilos por observación)<sup>1</sup>.

Horas después de polinización	P O S I C I O N E S D E L E S T I L O			
	Estigma-1/4	1/4-1/2	1/2-3/4	3/4-base del estilo
24 hr	344±49.72a	192±10.32b	63±29.83b	21±24.58b
48 hr	355±41.16a	220±25.81a	126±35.02a	65±9.84 b
72 hr	325±26.32b	225±26.35a	151±20.27a	102±31.19a

<sup>1</sup>Medias agrupadas con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Prueba de Tukey, P = 0.05).

Con relación a la fecundación de óvulos, se encontró que dos días después de la polinización se observaron los primeros tubos polínicos penetrando los óvulos de las dos formas ("fafayuco" y "liso"). En el Cuadro 5 se presenta el porcentaje de óvulos en los que se observaron tubos polínicos penetrando los óvulos a través del micrópilo a diferentes intervalos después de la apertura de la flor, lo cual se consideró como una evidencia de fecundación de éstos.

Cuadro 5. Porcentaje de óvulos fecundados en diferentes intervalos después de la apertura de la flor.

Días después de la apertura de la flor	FORMAS DE NOPAL TUNERO	
	"Liso"	"Fafayuco"
2	2	2
4	38	46
6	24	40
8	52	42
10	20	48

Obsérvese que a los dos días después de la apertura, se registró un 2% de óvulos fecundados en ambas formas de nopal, y que este porcentaje aumentó considerablemente a los cuatro días, sobre todo en la forma "fafayuco". La fecundación de óvulos se prolongó hasta el décimo día después de la apertura, siendo evidente que los porcentajes de óvulos fecundados, fueron mayores en la forma "fafayuco" que en la "liso" en todas las fechas de observación, con excepción de la realizada ocho días después de la apertura de la flor.

Con el fin de obtener una relación entre la cantidad de óvulos que se fecundan y los que se diferencian en semillas, se evaluó el número promedio de óvulos por flor al momento de la apertura y el número promedio de semillas que se forman en frutos maduros. En el Cuadro 6 se presentan los resultados obtenidos, así como el correspondiente porcentaje de semillas logradas en las formas "fafayuco" y "liso".

El porcentaje de semillas formadas fue superior en la forma "fafayuco" que en la "liso", indicando que la fecundación de óvulos fue superior en la forma "fafayuco". Los tubos polínicos penetraron los óvulos a través del micrópilo, lo que indica que es una fecundación del tipo progámico. Los primeros signos de senescen-

cia del óvulo se registraron a los seis días después de la apertura de la flor, aunque la viabilidad de algunos óvulos se prolongó hasta por más de diez días.

Cuadro 6. Relación entre la cantidad de óvulos por flor y el número de semillas por fruto en las formas "fafayuco" y "liso".

Forma de nopal	Promedio de óvulos por flor	Promedio de semillas por fruto	Porcentaje de semillas logradas
"Fafayuco"	267	229	86
"Liso"	242	191	79

A los cuatro días después de la apertura de la flor, se observó que los óvulos fecundados empezaban el desarrollo del endospermo, distinguiéndose divisiones nucleares en el saco embrional en los lados de la chalaza y el micrópilo. Simultáneamente se notó un alargamiento de las células papilares en la epidermis dorsal de la cobertura funicular; éstas células dan origen a la porción comestible del fruto.

#### DISCUSION

La mayoría de las plantas producen flores que abren y permanecen abiertas hasta que ocurre la abscisión; en cambio, en algunas plantas las flores abren y cierran el mismo día. Esta apertura y cierre de flores puede continuar por varios días, o en el caso de flores efímeras limitarse a un día (Jernsted, 1980). La observación realizada en las dos formas de nopal estudiadas, revela que las flores presentan características de flores efímeras, debido a que abren y cierran el mismo día. En especies de bosques tropicales secos, las flores presentan también períodos cortos de apertura floral y se ha mencionado que este comportamiento es un mecanismo que reduce la pérdida de agua por transpiración (Primack, 1982). Es probable que en el nopal tunero, el período corto de apertura floral también sea uno de los mecanismos que la planta usa para reducir la pérdida de agua. Otra explicación puede residir en que las flores de esta especie tienen estigmas húmedos, cuya receptividad se reduce cuando prevalecen temperaturas altas y vientos secos, porque causan desecación del estigma y por consiguiente afectan la germinación de granos de polen (Countanceu, 1971; Leopold y Kriedemann, 1975; Micke y Kester, 1978). Las temperaturas altas y los vientos secos son frecuentes durante la floración de



la mayoría de las formas de nopal tunero, por lo que se sugiere que el período corto de apertura de la flor es un mecanismo que evita la desecación del estigma, favoreciendo de esta manera la germinación de granos de polen.

Las observaciones de la presencia de granos de polen adheridos a los estigmas de ambas formas de nopal, revelaron que los estigmas son cubiertos por una combinación de granos de polen derivados de la autopolinización y de la polinización cruzada. Sin embargo, existen diferencias en el tiempo en que ocurren los dos tipos de polinización y el sitio del estigma donde son depositados los granos de polen. La autopolinización ocurre al momento, y en algunos casos poco antes, de que empiece la apertura de la flor y los granos de polen son depositados en la porción basal del estigma. La polinización cruzada, que es realizada generalmente por insectos, empieza cuando la flor esta completamente abierta y los granos de polen se depositan en la porción superior del estigma. El hecho de que la fecundación de óvulos por granos de polen se extienda hasta por más de 40 días después de la apertura, sugiere que las semillas que se forman en el fruto son el resultado tanto de la autofecundación como de la fecundación cruzada; es probable que los primeros óvulos hayan sido fecundados por tubos polínicos que se formaron a partir de granos de polen derivados de la autopolinización.

La formación de frutos en los que se diferencian semillas resultantes de autofecundación y fecundación cruzada, es una característica sobresaliente como estrategia de reproducción, ya que tales semillas pueden dar origen a poblaciones homogóticas y heterogóticas. Esta característica probablemente representa una ventaja en la adaptación ecológica de esta especie para sobrevivir a condiciones ambientales que presenten variaciones bruscas en diferentes años (Wilken, 1982).

En una de las formas evaluadas ("fafayuco"), se registró dehiscencia de las anteras y polinización del estigma aproximadamente 12 horas antes de la apertura. Este comportamiento floral es un tipo de cleistogamia denominada por Lord, (1981), como cleistogamia preantesis. Este autor cita una lista de especies que han mostrado cleistogamia, en la que no se incluye a Opuntia, por lo que es probable que este trabajo represente el primer registro de la presencia de cleistogamia en Opuntia. Wilken (1982) menciona que en especies que producen flores cleistógamas y casmógamas, la hibridación a través de la casmogamia es relativamente dependiente de las perturbaciones ambientales, mientras que la autopolinización a través de la cleistogamia permanece relativamente independiente. En la forma "fafayuco", la flor combina características de flores cleistógamas y casmógamas, ya que después

de que ocurre la autopolinización en flor cerrada (cleistogamia), la flor abre y prosigue el proceso de polinización. Wilken (1982) también menciona que la cleistogamia confiere la ventaja de asegurar el éxito de la reproducción y supervivencia en condiciones ambientales adversas para el crecimiento. En resumen, la plasticidad de los sistemas reproductivos de Opuntia representan un mecanismo sensitivo de ajuste a variaciones locales y temporales en el ambiente, lo cual es una característica sobresaliente en los sistemas de reproducción en el reino vegetal y juega un papel importante en la estrategia ecológica (Heslop-Harrison, 1982).

El potencial reproductivo, o sea el número de frutos que pueden ser producidos por un individuo, depende del número de flores polinizadas, de la depredación de frutos o semillas, de las condiciones ambientales y de la habilidad del progenitor femenino para proporcionar los recursos necesarios para el desarrollo de los frutos (Stephenson, 1981). En algunas especies, el potencial reproductivo está limitado por la disponibilidad de polen (Byerzychdek, 1980; Howell y Schropfer, 1981; Bertin, 1982; Snow, 1982); cuando la polinización es abundante y constante, la fecundación está limitada por los recursos disponibles en la planta (Stephenson, 1981; Snow, 1982). Los porcentajes de amarre de frutos y semillas registrados en este estudio, indican que al menos para estas dos formas de nopal no se tienen limitantes de disponibilidad de polen y recursos de la planta, ya que el porcentaje de prendimiento de frutos fue superior al 90% y el de semillas varió entre 80 y 86%.

La reducción en la frecuencia de tubos polínicos del ápice a la base del estilo es un caso de redundancia de gametos, en donde hay la producción de más espermatozoides que los requeridos para la fecundación (Cohen, 1975). Aparentemente una alta redundancia de gametos influye en el desarrollo de tubos polínicos en el estilo y en el vigor de la progenie (Mulcahy et al., 1975; Ter-Avanesian, 1978). Las flores de Opuntia se caracterizan por diferenciar un alto número de óvulos por flor, lo que sugiere la necesidad de una alta redundancia de gametos para lograr los porcentajes de prendimiento de semillas previamente mencionados.

#### BIBLIOGRAFIA

Bertin, I. R. 1982. Floral biology, hummingbird pollination and fruit production of trumpet creeper (Campis radicans, Bignoniaceae). Amer. J. Bot. 69:122-134.

- Byerzychdek, P. 1980. Pollinator limitation of plant reproductive effort. *Am. Nat.* 117:838-840.
- Brooks, R. M., M. V. Bradley and T. I. Anderson. 1959. Plant microtechnique manual. University of California, Davis. 70 p.
- Cohen, J. 1975. Gamete redundancy, wastage or selection. *En: D. L. Mulcahy (ed.). Gamete competition in plants and animals. North-Holland, Amsterdam. pp. 99-111.*
- Countanceau, M. 1971. Fruticultura. Oikos-tau, S. A. Barcelona, España. 608 p.
- Heslop-Harrison, J. 1982. The reproductive versatility of flowering plants: an overview. *En: W. J. Meudt (ed.). Strategies of plant reproduction. BARC Symposium 6. Allanheld Osmun Publisher. Granada. pp. 3-18.*
- Howell, O. J. and B. R. Schropfer. 1981. Sexual reproduction in agaves; the benefits of bats; the cost of semelporous advertising. *Ecology* 62:1-17.
- Jefferies, J. C. and A. R. Belcher. 1971. A fluorescence brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Techn.* 49:199-102.
- Jensen, W. A. 1962. Botanical histochemistry. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 408 p.
- Jernsted, A. J. 1980. Anthesis and floral senescence in Chlorogalum pomeridianum (Liliaceae). *Amer. J. Bot.* 67:824-832.
- Leopold, A. C. and P. E. Kriedemann. 1975. Plant growth and development. 2nd. ed. Mc Graw-Hill. New York. 545 p.
- Lord, E. M. 1981. Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev.* 47:421-449.
- Micke, W. C. and D. E. Kester. 1978. Bud development, pollination and fertilization. *En: W. C. Micke and D. E. Kester (eds.). Almond orchard management. Publ. 4092. Div. Agric. Sci. University of California, Berkeley.*
- Mulcahy, D. L., G. B. Mulcahy and E. Ottaviano. 1975. Sporophytic expression of gametophytic competition in Petunia hybrida. *En: D. L. Mulcahy (ed.). Gamete competition in plants and animals. North-Holland, Amsterdam. pp. 227-232.*
- Polyakov, I. M. 1964. New data on use of radioactive isotopes in studying fertilization in plants. *En: H. B. Linskens (ed.). Pollen physiology and fertilization. North-Holland, Amsterdam. pp. 194-199.*
- Primack, R. B. 1982. Longevity of individual flowers. *Abstracts Botanical Society of America.* pp. 41.
- Snow, A. A. 1982. Pollination intensity and potential seed set in Passiflora viti-flora. *Oecologia (Berl.)* 55:231-237.

- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 12:253-279.
- Ter-Avanesian, O. V. 1978. The effect of varying the number of pollen grains used in fertilization. *Theor. Appl. Genet.* 52:77-79.
- Wilken, H. O. 1982. The balance between chasmogamy and cleistogamy in Collomia grandiflora (Polemoniaceae). *Amer. J. Bot.* 69:1326-1333.