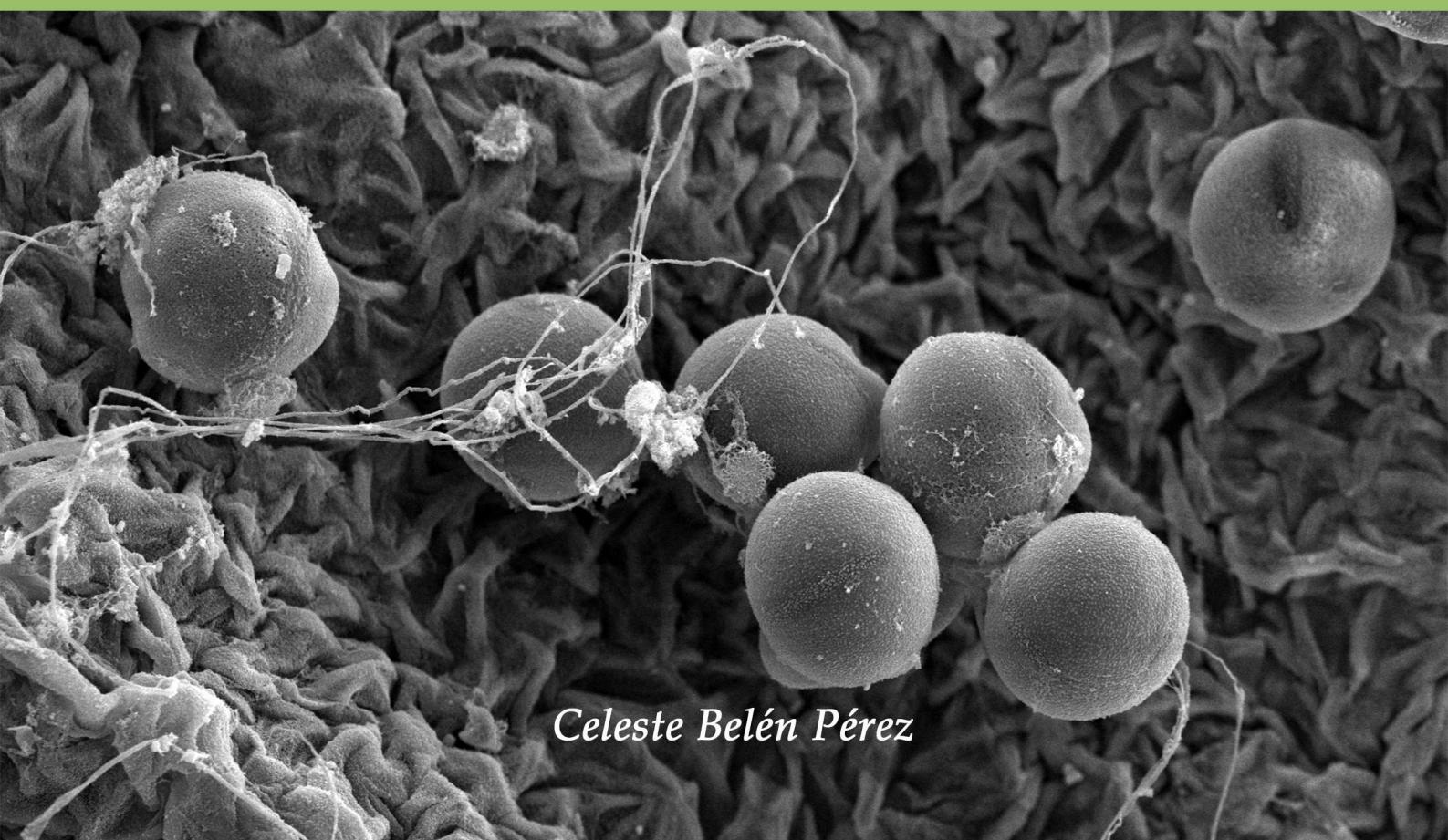




Caracterización morfoanatómica en diferentes aspectos de la biología reproductiva del género *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler (Cactaceae)



Celeste Belén Pérez



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Trabajo Final de Graduación



Caracterización morfoanatómica en diferentes aspectos la biología reproductiva del género *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler (Cactaceae)

Autora: Celeste Belén Pérez

Directora: Dra. Valeria Vanesa González

Codirectora: Dra. Stella Maris Solís

Laboratorio de Anatomía Vegetal
Instituto de Botánica del Nordeste UNNE-CONICET

2023



ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Objetivos generales.....	7
Objetivos particulares.....	7
Hipótesis del trabajo.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Revisión bibliográfica.....	8
Material estudiado.....	8
Anatomía reproductiva.....	11
Estudio de los granos de polen.....	11
Análisis exomorfológico de orbículas.....	11
Morfoanatomía del nectario floral.....	11
Histoquímica del nectario floral.....	12
RESULTADOS.....	13
<i>Gymnocalycium schroederianum</i>	13
Morfología floral.....	13
Morfoanatomía del androceo	13
Ontogenia de la antera	14
Microsporangio, microsporogénesis y microgametogénesis	14
Hilos que conectan granos de polen.....	21
<i>Gymnocalycium saglionis</i> , <i>G. schickendantzii</i> , <i>G. schroederianum</i> y <i>G. spegazzinii</i>	22
Orbículas.....	22
Granos de polen.....	23
Nectarios florales.....	27
DISCUSIÓN.....	29
Microsporangio, microsporogénesis y microgametogénesis.....	29

Hilos que conectan granos de polen.....	32
Orbículas.....	33
Granos de polen.....	33
Nectarios florales.....	34
CONCLUSIÓN.....	35
AGRADECIMIENTOS.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37
ANEXO.....	44
EVALUACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN.....	47
EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA.....	48
FINANCIAMIENTO.....	48

RESUMEN

Gymnocalycium es el género de Cactaceae más numeroso de Argentina, donde se distribuye alrededor del 80% del total de sus especies. A pesar de ello, poco se han explorado los caracteres morfoanatómicos florales asociados a la biología reproductiva del género. En este trabajo se han estudiado rasgos morfológicos y anatómicos en flores de cuatro especies del género *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*. En *G. schroederianum* se ha analizado el desarrollo del androceo, con énfasis en los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis, a través de observaciones en microscopía óptica de cortes histológicos seriados en secciones longitudinales y transversales de botones florales en diferentes estadios de desarrollo y flores en antesis. En *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*, se han estudiado las características de las unidades polínicas, la presencia de orbículas y las características morfoanatómicas e histoquímicas de nectarios florales, y se ha evaluado el valor taxonómico de las mismas. Para el análisis de las unidades polínicas se utilizó la técnica de acetólisis de Erdtman y las observaciones se realizaron con microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB). Las características exomorfológicas de los nectarios se observaron con lupa estereoscópica. Las características histológicas se observaron en preparados permanentes con microscopía óptica. Se realizaron pruebas histoquímicas para la detección de compuestos del metabolismo en los tejidos nectaríferos. A partir de los estudios realizados en *G. schroederianum* se comprobó que se trata de una especie con flores morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente femeninas, y flores funcionalmente perfectas. La microsporogénesis se interrumpe en dos momentos de su desarrollo: luego de que las tétrades de microsporas pierden la calosa, y cuando los granos de polen se encuentran formados. Adicionalmente, se han detectado hilos sin esporopolenina, formados a partir de derivados tapetales, que conectan granos de polen. Los caracteres estudiados de las unidades polínicas, orbículas y nectarios, en las cuatro especies de *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*, aparecen como rasgos conservados en el género, de manera que apoyan la monofilia del grupo.

INTRODUCCIÓN

Cactaceae es una familia de distribución casi exclusivamente americana, a excepción de una especie del género *Rhipsalis* Gaertn., que se extiende hasta África. En América, los centros de distribución se encuentran en las regiones más áridas del suroeste de Estados Unidos y México, y sur de Sudamérica (Barthlott y Hunt 1993). Cuenta con 200 géneros y unas 2000 especies que habitan generalmente en zonas áridas, pudiéndose encontrar también en ambientes húmedos como selvas tropicales o zonas templado-húmedas (Kiesling et al. 2011). Es un grupo monofilético dentro del gran orden Caryophyllales; se divide en cuatro clados principales: Pereskioideae, Opuntioideae, Maihuenoideae y Cactoideae (Guerrero et al. 2019). De acuerdo a estudios recientes, se estima que la familia se originó hace 32.11 millones de años (Eoceno tardío) en la región andina de Chile y Argentina, lugar de origen más probable también para las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae (Hernandez-Hernandez et al. 2014). Aun cuando las cactáceas son de origen sudamericano, la mayoría de los estudios se concentran en especies del hemisferio norte, lo que ha suscitado el desconocimiento de la biología básica de numerosas especies endémicas de América del Sur.

A lo largo de su historia evolutiva, este linaje ha sufrido modificaciones extremas en todos los niveles fenotípicos: morfo-anatómicos, histológicos y metabólicos. Estos cambios condujeron al denominado síndrome suculento (Gibson y Nobel 1986; Edwards y Osburn 2012; Guerrero et al. 2019). Algunas de las modificaciones morfoanatómicas que las destacan entre las angiospermas y, les han permitido conquistar ambientes áridos, son la presencia de hojas muy reducidas o ausentes, corteza y médula de los tallos adaptadas para el almacenamiento de agua, ramas laterales cortas que se modifican en grupos de espinas denominadas areolas, y ovarios “hundidos” en los receptáculos, que a su vez están cubiertos de brácteas y areolas (Nyffeler 2002). Estas características, junto con sus llamativas flores, son las que han atraído a numerosos investigadores y aficionados, a pesar de ello, aún existe un gran vacío en el conocimiento de este grupo en áreas de anatomía, biología reproductiva, ecología, relaciones evolutivas, fisiología, entre otras (Guerrero et al. 2019). En Argentina, la familia está representada por 250 especies, de las cuales 158 son endémicas (Ortega-Baes y Godínez-Alvarez 2006). Se distribuyen principalmente en las provincias fitogeográficas del Chaco, Espinal, Prepuna y del Monte (Barthlott y Hunt 1993; Kiesling et al. 2011). El noroeste de Argentina es una de las regiones más diversas en cactáceas del país, formando parte del segundo centro de variabilidad a escala global, el de Los Andes Centrales (Ortega-Baes et al. 2010). Esta diversidad incluye especies de las subfamilias Opuntioideae, Pereskioideae y Cactoideae. Esta última, incluye una gran diversidad taxonómica de formas de crecimiento como cilíndricas, columnares, globosas y globoso-deprimidas (Vázquez-Sánchez et al. 2012). En particular, la tribu Trichocereeae (Cactoideae) es la más diversa en esta región (Ortega-Baes et al. 2010; Gorostiague 2016).

Dentro de la subfamilia Cactoideae, tribu Trichocereeae, *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler es un linaje monofilético con alrededor de 50 especies (Demaio et al. 2011). Naturalmente distribuido en América del Sur, particularmente en el sur de Bolivia, suroeste y norte de Paraguay, sur de Brasil, Uruguay y Argentina (Kiesling 1975; Metzing et al. 1995; Pilbeam 1995; Anderson 2001; Hunt 2006; Charles 2009; Demaio 2011). Es el género de cactus más numeroso de Argentina, donde se distribuyen más del 80% del total de las especies (Kiesling y Ferrari 2005). Los individuos se caracterizan por su patrón de crecimiento globular o deprimido, solitario o cespitoso de 2-50 cm de diámetro, las costillas son continuas o parcialmente divididas en mamelones. Las flores surgen de areolas ubicadas en la parte superior o central del tallo, son

diurnas, acampanadas hasta casi infundibuliformes, de color blanco nacarado o rosa pálido. Son hermafroditas con estambres en dos series, una dispuesta en anillo en la base del tubo y otra a diferente altura, el estilo es más corto que los estambres (Kiesling 1975; Anderson 2001; Kiesling 2005; Kiesling y Ferrari 2005; Hunt 2006). El receptáculo y el tubo floral presentan escamas anchas y obtusas, más o menos espatuladas, mucronadas o no, típicamente desnudas, sin pelos, espinas ni cerdas axilares (Kiesling y Ferrari 2005). La biología reproductiva ha sido poco explorada en el género (Gorostiague 2016), sin embargo, de acuerdo a las características florales generales (tamaño, color y tiempo de antesis) sugieren que *Gymnocalycium* se trata de un linaje con especialización fenotípica a las abejas o típicamente melítófilo (Faegri y van der Pijl 1979). Algunas de las contribuciones más recientes llevadas a cabo en el género se han enfocado en analizar la fenología de cinco especies de *Gymnocalycium* endémicas de las Sierras de Córdoba: *G. bruchii* (Speg.) Hoss., *G. capillense* (Schick.), *G. monvillei* (Lem.) Britton et Rosse, *G. mostii* (Gürke) Britton et Rosse y *G. quehlianum* (F. Haage ex Quehl) Vaupel ex Hosseus, (Giorgis et al. 2015); la biología floral de *G. saglionis* (Cels) Britton & Rose (Gorostiague 2016); la anatomía del gineceo de *G. saglionis*, *G. schickendantzii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose y *G. spegazzinii* Britton & Rose (González et al. 2023); y el sistema reproductivo en *G. bruchii* (Speg.) Hosseus (Delbón et al. 2023).

El estudio de los órganos reproductivos es fundamental en las plantas con flores ya que permiten comprender los mecanismos subyacentes a la reproducción sexual y el consecuente éxito reproductivo de las especies. En Angiospermas, los caracteres morfológicos, anátomicos y ontogenéticos son valiosos en la definición de taxones en diferentes niveles (Dickison 1993). Un ejemplo es el de especies del género *Siparuna* Aubl., donde el análisis de caracteres que tienen que ver con el tipo de tapete y la microsporogénesis han aportado datos adicionales que ayudaron a aclarar las relaciones filogenéticas en Siparunaceae (Bello et al. 2002). Por otro lado, en Portulacaceae, un linaje cercano a Cactaceae, se revelaron interesantes patrones de apertura de los granos de polen que arrojan luz sobre la micromorfología y sus implicaciones taxonómicas (Santos et al. 2016). Este tipo de estudio, resulta necesario en familias de plantas con amplia variación morfológica, en las que hay ausencia de caracteres diagnósticos para muchas especies, lo que dificulta la identificación taxonómica. La combinación de una serie de caracteres morfoanatómicos como datos de polen, morfología de semillas y distribución geográfica de las especies, permitió la descripción de nuevas especies de Portulacaceae (Santos et al. 2016). Así, el análisis de caracteres reproductivos resulta imprescindible tanto para interpretar la estructura y el funcionamiento de las plantas y sus procesos reproductivos, como para aportar conocimientos básicos para encarar trabajos sistemáticos, ecológicos, de biología reproductiva y de conservación de especies.

En Cactaceae, las flores son importantes para la determinación taxonómica (Boke 1980), aunque en la literatura científica son escasos los aportes morfológicos o anátomicos enfocados en las estructuras florales (Boke 1963, 1966, 1968, 1980; Fuentes-Pérez et al. 2009; Almeida et al. 2010, 2013; González 2020). En cuanto a los estudios embriológicos, es importante mencionar contribuciones recientes en tres de las cuatro subfamilias. En la primitiva subfamilia Pereskioideae, se realizó una valiosa caracterización descriptiva en *Pereskia lychnidiflora* DC, donde las características embriológicas demostraron una homogeneidad entre miembros emparentados de *Pereskia* Mill., demostrando su valor taxonómico (Jiménez-Durán et al. 2014). En Opuntioideae, importantes aportes embriológicos en el género *Consolea* Lem, revelaron diferencias en el desarrollo y fertilidad de óvulos y granos de polen en un género con dioecia críptica (Strittmatter et al. 2002, 2006, 2008); similares resultados fueron reportados en

Cylindropuntia wolfii (L.D. Benson) M.A. Baker (Ramadoss et al. 2022). Por último, en Cactoideae, contribuciones realizadas en representantes de diferentes géneros como *Pachycereus* (A. Berger) Britton & Rose (Núñez-Mariel et al. 2001), *Pterocactus* K. Schum. (Gotelli et al., 2009), *Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose (Cisneros et al. 2011) y *Mammillaria* Haw. (Sánchez y Vázquez-Santana 2018) describen en detalle los procesos de formación de granos de polen y óvulos. En muchos casos, este tipo de estudios ha contribuido a dilucidar los mecanismos reproductivos que llevan a la separación funcional de los sexos y obligan a la alogamia en determinadas especies de cactus (Strittmatter et al. 2002, 2006, 2008; Sánchez y Vázquez-Santana 2018; Ramadoss et al. 2022). Así, estudios como los que se plantean en este proyecto de investigación, son importantes tanto para llenar los vacíos de información en esta área del conocimiento, como para generar información que contribuya a apoyar o refutar hipótesis filogenéticas para este género.

Dentro de las características florales estrechamente vinculadas con el éxito reproductivo, se destaca a los nectarios florales, estructuras secretoras encargadas de producir néctar como recompensa para los polinizadores (Faegri y van der Pijl 1979; Buchmann 1987; Baker y Baker 1990; Cocucci y Vogel 2001; Fenster et al. 2004; Neff y Simpson 2005) los cuales se encargan del transporte efectivo de los granos de polen y la consiguiente polinización. Es por ello que cumplen un papel fundamental en la biología reproductiva de las plantas, además de que brindan información importante que puede ser utilizada para inferir relaciones filogenéticas y dilucidar tendencias evolutivas (Almeida et al. 2013). Los nectarios florales fueron ampliamente estudiados en numerosas familias de angiospermas. Debido a la gran variabilidad anatómica, morfológica y ontogenética de estas estructuras secretoras, muchos investigadores utilizan la forma y la ubicación de los nectarios, como características taxonómicas mediante las cuales apoyan hipótesis sobre relaciones entre especies, géneros y familias (Brown 1938; Durkee 1983; Fahn 1988; Smets et al. 2000; Almeida et al. 2013; Solís et al. 2017). De acuerdo a Bernardello (2007), los estudios realizados en Cactaceae, revelan que el néctar se secreta en un receptáculo anular en los géneros *Pereskia* y *Rhipsalis* Gaertn., o a lo largo de la porción basal del hipantio (Zandonella 1977; Barthlott y Hunt 1993; Nassar et al. 1997). En este último caso, pueden aparecer cámaras de néctar, formadas por diferentes órganos (por ejemplo, apéndices filamentosos o hipantiales). En los últimos años, el estudio de los nectarios florales ha recibido mayor atención en este grupo de plantas (Stefano et al. 2001; Agüero et al. 2018; Camacho-Velázquez et al. 2019; González et al. 2021). Sin embargo, hasta el momento no se ha explorado en detalle la histoquímica de estas estructuras secretoras en *Gymnocalycium*.

Entre los antecedentes morfoanatómicos florales más relevantes en la familia, es importante mencionar la investigación realizada en especies mexicanas del género *Opuntia* Desv. donde se describe y compara la anatomía floral con el fin de contribuir al conocimiento del género (Fuentes-Pérez et al. 2009); el estudio de la morfoanatomía de flores esfingófilas en *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw., con una caracterización completa del gineceo, androceo y nectarios (Almeida et al. 2010); y el aporte más reciente, de Almeida et al. (2012), acerca de la morfología de nectarios florales y extraflorales del cactus epítito *Rhipsalis teres* Steud., y las respectivas concentraciones de néctar de cada estructura.

En la presente investigación, se han seleccionado cuatro especies del género *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler: *G. saglionis* (Cels) Britton & Rose, *G. schickendantzii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *G. schroederianum* Osten y *G. spegazzinii* Britton & Rose. De acuerdo con la filogenia molecular propuesta por Demaio et al. (2011), pertenecen a cuatro subgéneros distintos. *G. saglionis* pertenece al subgénero

Microsemineum caracterizado por sus raíces fasciculadas, flores cortas en forma de urna, y semillas muy pequeñas de 0,6 mm de diámetro. *G. schickendantzii* se encuentra incluida en el subgénero *Muscosemineum*, con raíces fasciculadas, flores campanuladas que surgen de areolas laterales (en los otros subgéneros tienden a ser centrales), semillas de testa marrón clara de 0,5-1 mm de diámetro. *G. schroederianum* pertenece al subgénero *Gymnocalycium* con raíces generalmente napiformes, a fasciculadas, flores campanuladas iguales o mayores a la longitud del tallo, semillas de 1 mm de diámetro de testa negra. Y, finalmente, *G. spegazzinii* perteneciente a *Scabrosemineum* con raíces generalmente fasciculadas a napiformes, flores campanuladas cercanas al ápice y semilla de 0,6-1 mm, de testa marrón a marrón claro. Por lo tanto, las especies estudiadas pertenecen a 4 de los 7 subgéneros reconocidos dentro de *Gymnocalycium*, siendo una muestra representativa del género, lo que permite evaluar el valor taxonómico de los caracteres estudiados en este trabajo.

Por todo lo expuesto, el género seleccionado representa un buen modelo de estudio para generar conocimiento sobre los procesos reproductivos y los diferentes aspectos florales involucrados en la reproducción y el éxito de este grupo de plantas en nuestro país.

Estos resultados contribuirán a caracterizar el sistema reproductivo de *G. schroederianum* y evaluar el valor taxonómico y filogenético de los nectarios, unidades polínicas y orbículas en *Gymnocalycium*.

OBJETIVOS GENERALES

El objetivo del presente trabajo es estudiar algunas características morfoanatómicas florales en taxones selectos del género *Gymnocalycium*, con énfasis en las estructuras nectaríferas, anatomía de antera, microsporogénesis, microgametogénesis, orbículas y unidades polínicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Interpretar la morfoanatomía del androceo en *G. schroederianum*.
- Estudiar los procesos de microsporogénesis y microgametogénesis en *G. schroederianum*.
- Analizar las orbículas y unidades polínicas en *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*.
- Estudiar la morfoanatomía y vascularización del nectario floral en *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*.
- Analizar la histoquímica de la epidermis y del tejido secretor de los nectarios florales y comparar las sustancias presentes en las cuatro especies mencionadas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La especie *G. schroederianum* presenta flores perfectas, con ambos verticilos fértiles, las anteras desarrollan granos de polen viables.

La especie *G. schroederianum* presenta dicogamia, debido a que los estambres y pistilos no alcanzan la madurez al mismo tiempo; y protandria, debido a que los granos de polen maduros se liberan antes de que el estigma sea receptivo, previo a la antesis floral.

Los nectarios florales de las cuatro especies de *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii* presentan características morfoanatómicas e histoquímicas similares en sus tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica en relación al tema de investigación propuesto. La recopilación de antecedentes se llevó a cabo utilizando bibliografía disponible en la Biblioteca del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-UNNE-CONICET), consultando obras generales, trabajos específicos y una importante colección de separatas. Adicionalmente, se buscaron obras en la Biblioteca Electrónica de la Secretaría General de Ciencia y Técnica y otras bases de datos disponibles en Internet, a los efectos de contar con la mayor cantidad de información actualizada.

MATERIAL ESTUDIADO:

Se ha estudiado material fijado en FAA (formol-alcohol-ácido acético) perteneciente a cuatro especies del género *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*. El material proviene de poblaciones naturales distribuidas en la provincia de Salta y Corrientes. *G. schroederianum* fue coleccionado en el año 2022 en Colonia Carlos Pellegrini, Esteros del Iberá, Corrientes, por el Dr. Javier E. Florentín. El material de *G. saglionis*, *G. schickendantzii* y *G. spegazzinii* fue coleccionado en Salta en el año 2016 por la Dra. González, directora de este proyecto de investigación (Figura 1 y Figura 2).

Cada taxón coleccionado cuenta con su respectivo ejemplar de herbario incorporado en el herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

Gymnocalycium saglionis (F. Cels) Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. et al. 3 (CTES).

Gymnocalycium schickendantzii (F.A.C. Weber) Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. et al. 6 (CTES).

Gymnocalycium schroederianum Osten

ARGENTINA. Prov. de Corrientes. Dep. San Martín, Colonia Carlos Pellegrini, Ruta Prov. 40, 18.X.22, Florentín J.E. et al. s/n (CTES).

Gymnocalycium spegazzinii Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cafayate, Ruta 68, El Obelisco, 7.XI.16, González V.V. et al. 13 (CTES).

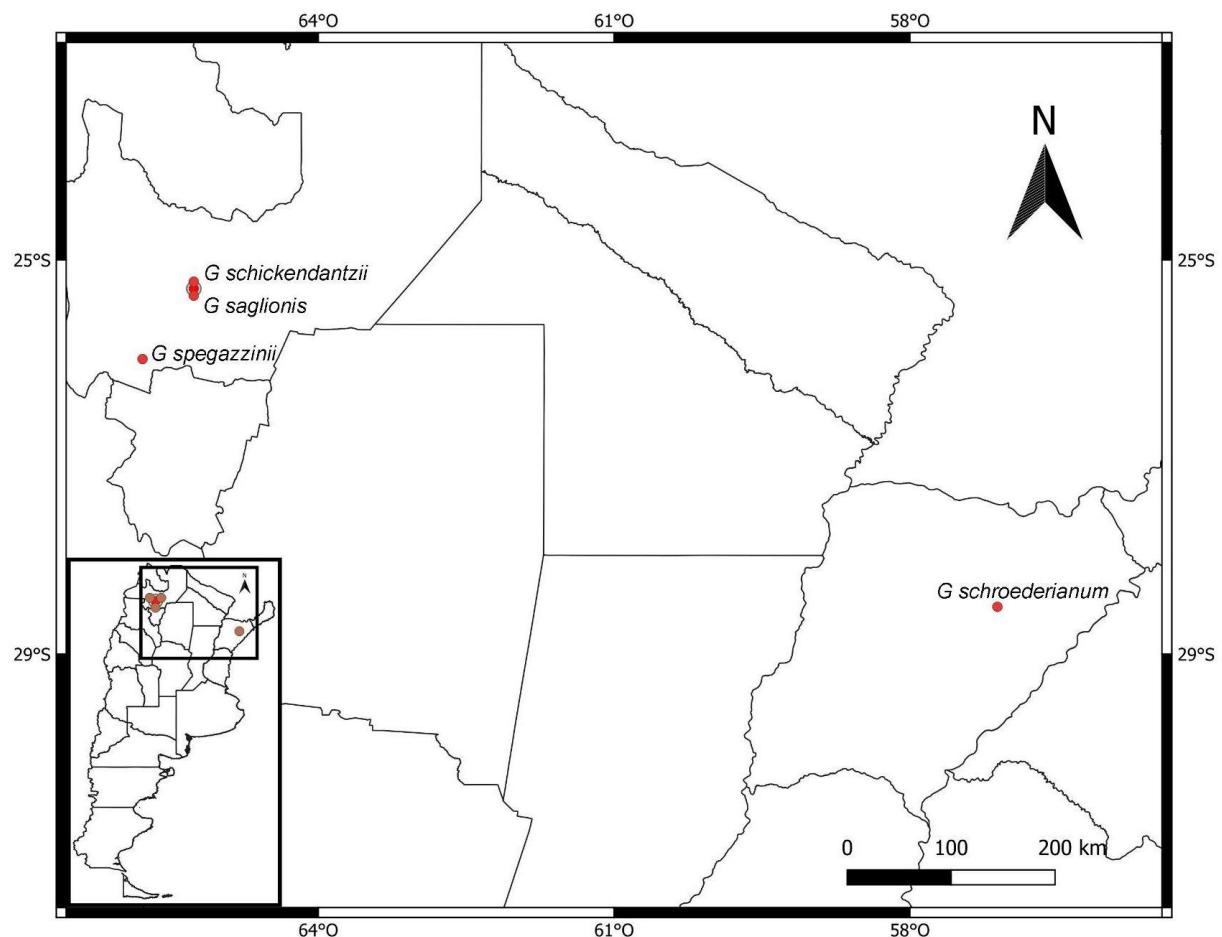


Figura 1. Localidades de colección del material analizado.



Figura 2. Especies de *Gymnocalycium* estudiadas. **A-B.** *G. saglionis*. **C-D.** *G. schickendantzii*. **E-F.** *G. schroederianum*. **G-H.** *G. spegazzinii*. **A, C, E, G.** Aspecto general de las plantas. **B, D, F.** Vista superior de una flor. **F.** Flor en vista lateral. Fotos **A-B, G- H:** Cecilia Sosa; **C-D,** Valeria V. González; **E-F:** Felipe L. Menéndez.

ANATOMÍA REPRODUCTIVA

Se analizaron flores fijadas en FAA de *G. schroederianum* en diferentes estadios de desarrollo. Para facilitar el estudio y procesamiento de las muestras, se crearon 5 categorías artificiales de acuerdo a la longitud de cada botón floral: estadio 1 (0,3-1 cm), estadio 2 (1,4-2 cm), estadio 3 (2,1-2,8 cm), estadio 4 (3-3,2 cm), estadio 5 (4,2-5,9 cm). Para los estudios anatómicos se realizaron preparados permanentes. La deshidratación del material se realizó con una serie de deshidratantes histológicos y aclarantes - preimpregnantes de Biopur ® (González y Cristóbal, 1997). La impregnación en parafina se llevó a cabo según la técnica de Johansen (1940), posteriormente el material se colocó en una mezcla de partes iguales de alcohol butírico terciario y aceite de parafina en estufa a 60° por 10 hs, seguido de dos cambios en parafina entre 10 y 12 hs cada uno. La inclusión se realizó en Histoplast ®. Los cortes se efectuaron con micrótomo rotativo en espesores entre 10-12 µm. Se realizaron cortes longitudinales y transversales seriados. Se colorearon con safranina-Astra blue (Luque et al. 1996). Los preparados fueron montados en bálsamo de Canadá sintético. Las observaciones e interpretaciones de los caracteres anatómicos e histológicos se efectuaron con microscopio óptico binocular Leica DM LB2 y microscopio óptico binocular Olympus BX 50F, ambos con cámara clara y cámara digital incluida. Los caracteres exomorfológicos de botones florales se observaron con microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incluida.

ESTUDIO DEL POLEN

Se estudiaron las unidades polínicas de los cuatro representantes del género *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*. Las muestras de granos de polen se obtuvieron de botones florales fijados en FAA. Para el procesamiento del polen se siguió la técnica de Erdtman (1966) para la acetólisis. Las mismas fueron montadas en gelatina glicerinada. Cabe mencionar que en la acetólisis numerosos granos de polen colapsaron por el procesamiento, por lo que es recomendable adaptar la técnica a granos de polen de pared delgada, como es el caso de las especies estudiadas. Para la descripción de la morfología polínica se adoptó la terminología propuesta por Punt et al. (2007), las mediciones se realizaron en 25 granos de polen de cada especie, utilizando el software ImageJ (Rasband 1996-2018). Para el análisis de la arquitectura de la pared se utilizaron fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de barrido, JEOL 5800 LV; se utilizaron granos acetolizados, metalizados con oro-paladio.

ANÁLISIS EXOMORFOLÓGICO DE ORBÍCULAS

Se tomaron muestras de anteras dehiscentes fijadas en FAA de las cuatro especies selectas. Las observaciones exomorfológicas de las orbículas se realizaron con Microscopio Electrónico de Barrido, para ello las muestras fueron sometidas a una serie creciente de acetona y secadas a punto crítico con CO₂. La metalización se llevó a cabo con un delgado baño de oro-paladio.

MORFOANATOMÍA DEL NECTARIO FLORAL

Se analizaron flores fijadas en FAA de los cuatro representantes del género *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*. Las características exomorfológicas

fueron observadas con microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incluida. Para los análisis anatómicos se realizaron preparados permanentes, la metodología fue la misma utilizada para el análisis de la anatomía reproductiva, descrito previamente.

HISTOQUÍMICA DEL NECTARIO FLORAL

Se realizaron tres pruebas histoquímicas en secciones transversales de nectarios florales obtenidas a partir de material embebido en parafina. Para cada reacción, se realizaron preparados semipermanentes que fueron montados con una gota de agua glicerinada. Se aplicaron los siguientes reactivos químicos para la detección de productos del metabolismo en tricomas epidérmicos, células del tejido nectarífero y tejido subnectarífero:

(1) Sudán Black B: la tinción con este reactivo tiene por objetivo detectar reservas de sustancias lipídicas. En una reacción positiva las estructuras que contengan lípidos deberán colorearse de azul oscuro a negro (Demarco 2017).

(2) Reactivo de lugol (Ioduro de potasio, Iodo sublimado y agua destilada): esta reacción se utiliza para detectar la presencia de almidón. Los granos de almidón se ven de color azul oscuro a negro, en caso de dar positivo. El resto de las estructuras aparecen de color amarillo, sin embargo, este color no tiene una significancia específica (Demarco 2017).

(3) Xilidina Ponceau 2R: esta reacción se utiliza para la detección de proteínas totales (Vidal 1970; Rocha et al. 2018). La reacción positiva se ve reflejada en una coloración roja a púrpura. La tinción intensa por Xilidina Ponceau puede sugerir una alta incidencia en la síntesis de proteínas y alta actividad metabólica de las células (Oliveira et al. 2017).

Las observaciones se realizaron con microscopio óptico binocular Leica DM LB2 y Olympus BX 50F.

RESULTADOS

Gymnocalycium schroederianum

MORFOLOGÍA FLORAL

La especie *G. schroederianum* presenta flores acampanadas, casi infundibuliformes de hasta 7 cm de longitud que surgen de areolas superiores. Externamente la flor se encuentra protegida por escamas anchas, mucronadas de tono grisáceo con un borde blanco. Exhibe tépalos sepaloïdes en tonos que van de marrón a amarillo, y tépalos petaloïdes amarillo pálido (Figura 2 E, F). En corte longitudinal de la flor se puede observar una tonalidad rosada en el interior del tubo floral (Figura 4 A, C). Todas las flores estudiadas poseen ambos sexos bien diferenciados exomorfológicamente. El ovario es ífero y se encuentra inmerso en el receptáculo, de placentación axilar modificada, con óvulos circinótropos dispuestos en funículos ramificados. Se denota la presencia de una cámara nectarífera reducida en la base del estilo. El estilo es recto de unos 9 cm, con estigma ramificado. El estigma presenta típicamente nueve lóbulos estigmáticos.

MORFOANATOMÍA DEL ANDROCEO

Las anteras se encuentran típicamente distribuidas en dos verticilos, el primero denominado verticilo interno rodea la base del estilo y consta de filamentos cortos con tricomias epidérmicos (Figura 3 A-C y Figura 4 A-C) que sobresalen por encima de la cámara nectarífera. El segundo, verticilo externo, se dispone de manera espiralada alrededor del estilo y estigma, con filamentos de mayor longitud, superando el nivel del gineceo (Figura 3B, C y Figura 4 A, B). Ambos verticilos presentan anteras bitecas, tetrasporangiadas, de inserción basifija.

En estadíos iniciales del desarrollo se puede observar una ligera diferencia de tamaño entre las anteras que conforman el verticilo interno y las del verticilo externo, las primeras son de menor tamaño (Figura 3A-B). Avanzado el desarrollo floral, se observa una mayor homogeneidad en el tamaño de las anteras de ambos verticilos (Figura 3C).

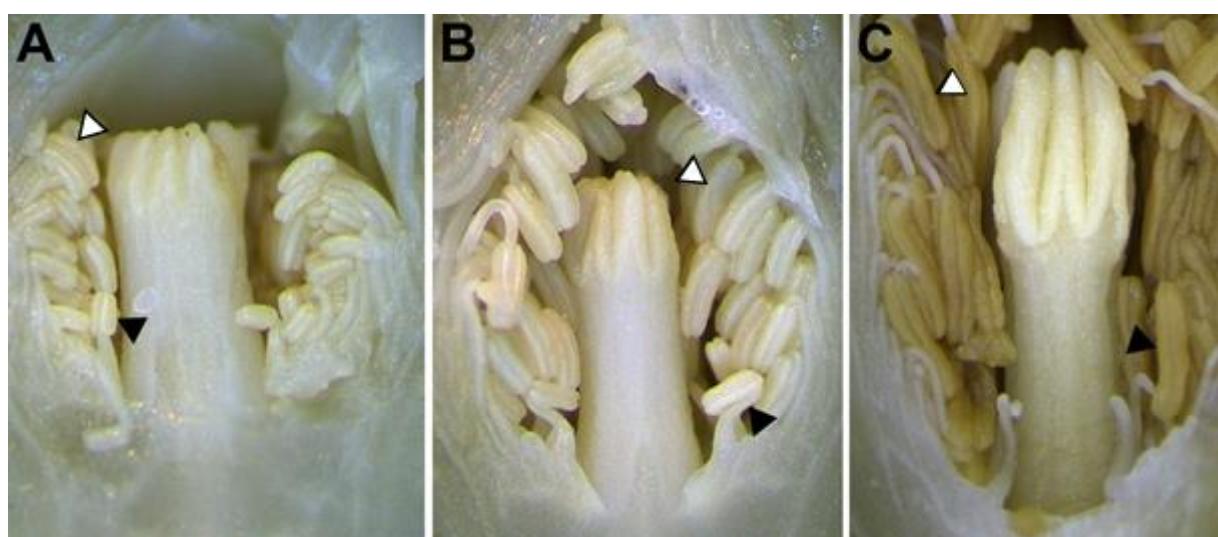


Figura 3. Corte longitudinal de botones flores en distintas etapas del desarrollo. **A.** Botón floral de 1,1 cm con verticilo externo con anteras de 0,4 mm (punta de flecha blanca) y verticilo interno con anteras de 0,2 mm (punta de flecha

negra). **B.** Botón floral de 1,5 cm con verticilo externo de 0,8 mm (punta de flecha blanca) y verticilo interno de 0,4-0,6 mm (punta de flecha negra). **C.** Botón floral de 2,5 cm, se puede observar una mayor homogeneidad de tamaños de las anteras entre ambos verticilos (puntas de flechas blanca y negra).

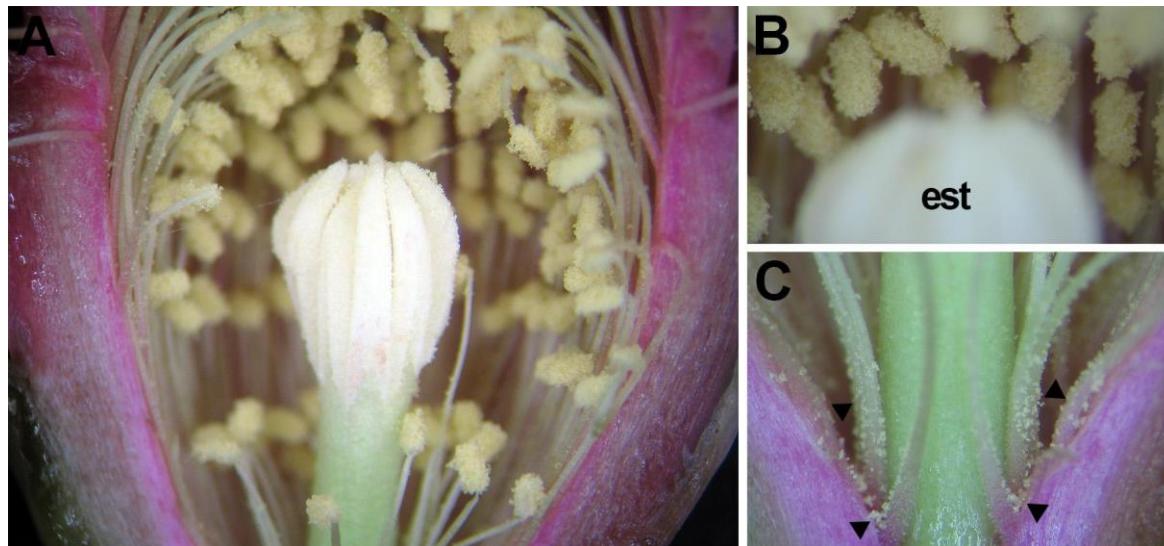


Figura 4. Corte longitudinal de flor en antesis de *G. schroederianum*. **A.** Aspecto general de la flor con anteras dehiscentes y gineceo con ramas estigmáticas retraídas, no receptivas. **B.** Detalle de anteras dehiscentes, por encima del estigma (est) no receptivo. **C.** Detalle del interior del tubo floral a nivel del techo de la cámara nectarífera, donde se pueden observar numerosos granos de polen libres en los filamentos anterales (puntas de flechas negras).

ONTOGENIA DE ANTERA

En el botón floral de *G. schroederianum* se puede observar los primordios de anteras como una protuberancia, constituida por una masa indiferenciada de células donde no es posible aún identificar estratos celulares (Figura 5A, B). En un estadío de desarrollo posterior las anteras comienzan a delimitar su forma típica, tetralobada, con tejido formado por células meristemáticas y una protodermis uniestratificada (Figura 5C), además, se pueden observar abundantes granos de almidón de grandes dimensiones en el tejido conectivo (Figura 5D). En un estadío más avanzado, es posible distinguir en la pared de la antera, desde afuera hacia adentro, una epidermis con células rectangulares y uninucleadas; una capa de endotecio con células de núcleo conspicuo; una delgada capa media; células tapetales uninucleadas con denso contenido citoplasmático. En el lóculo se observa tejido esporógeno compuesto por numerosas células madres de las microsporas (CMM) que se distinguen por su gran tamaño, citoplasma denso y núcleo prominente (Figura 5E, F). Este tipo de antera coincide con el tipo monocotiledóneo, donde la capa parietal secundaria más interna se divide para dar lugar al tapete y a una única capa media. El tapete es de tipo secretor, permanece íntegro durante la formación de los granos de polen, mientras que libera las sustancias nutritivas al lóculo de la antera.

MICROSPORANGIO, MICROSPOROGÉNESIS Y MICROGAMETOGÉNESIS

El inicio de la microsporogénesis en *G. schroederianum* es normal, las células esporógenas primarias sufren algunas divisiones mitóticas para dar lugar a células madres del polen o células madres de las microsporas (CMM) (Figura 5).

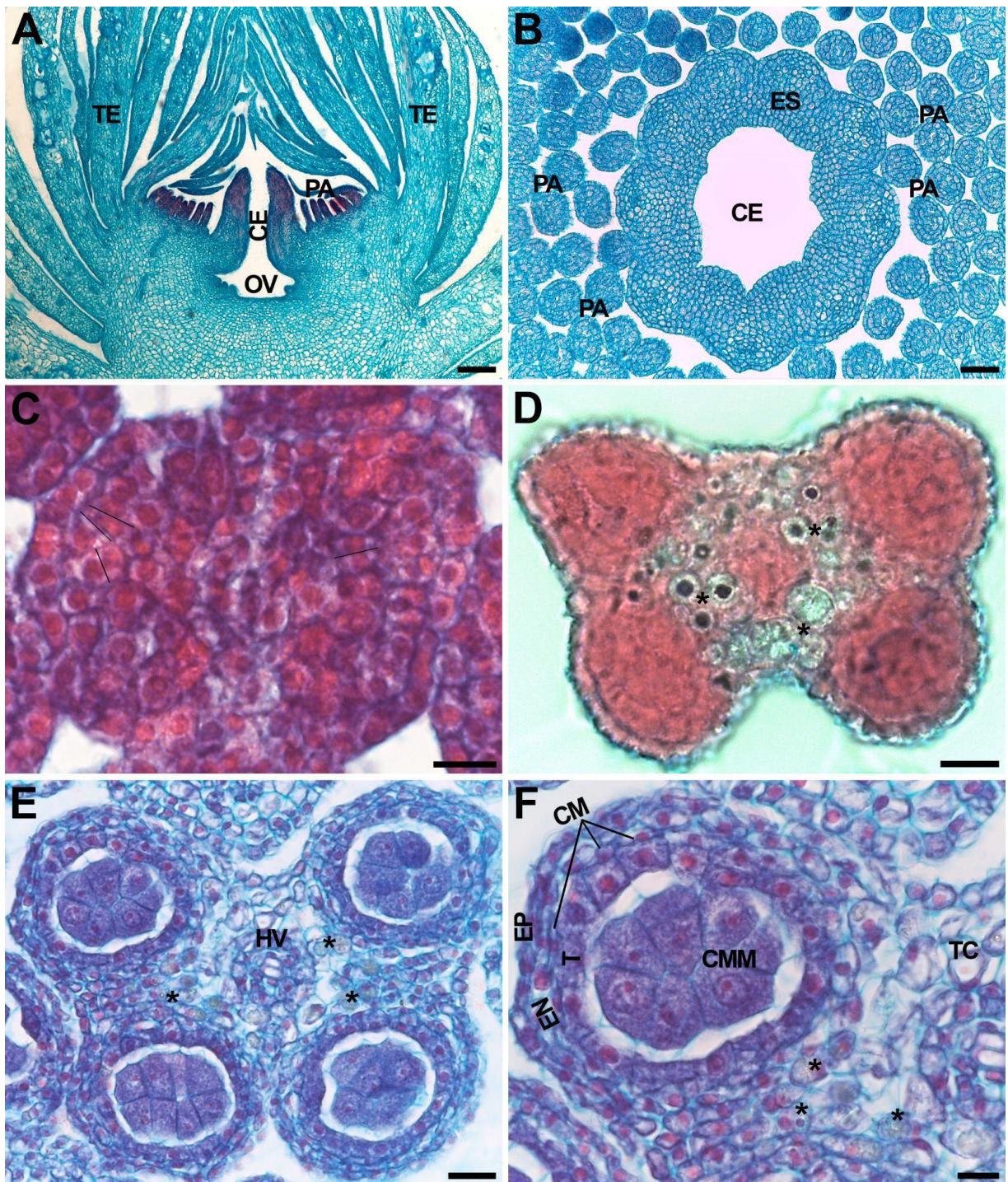


Figura 5. *Gymnocalycium schroederianum*. Fotomicrografías de anatomía de botones florales y anteras obtenidas con microscopio óptico. **A.** Corte longitudinal de botón floral con primordios de anteras. **B.** Sección transversal de botón floral con primordios de anteras. **C.** Microsporangio joven con células esporógenas primarias y diferenciación de capas parietales (líneas negras marcan divisiones celulares). **D.** Antera inmadura con abundantes granos de almidón en el tejido conectivo. **E.** Antera inmadura con capas parietales diferenciadas. **F.** Detalle de un lóculo de antera con células madres de las microsporas (CMM), rodeadas por el tapete secretor uninucleado, una fina capa media, el endotecio y epidermis con células cuadrangulares. Abreviaturas: CE= canal estilar; CM= capa media; CMM= células madres de la microspora; EN=endotecio; EP=epidermis; ES= estilo; HV= haz vascular; OV= ovario; PA= primordios de antera; TC= tejido conectivo; TE= tépalos; *= granos de almidón. Escalas: A= 100μm; B= 50μm; C, D, F= 10μm; E= 20μm.

A partir de este momento, el desarrollo puede seguir dos caminos diferentes:

1) Surgen anomalías que generan anteras abortivas:

Se han registrado numerosos botones florales en los que la microsporogénesis sufre un proceso anormal y no logra formar granos de polen viables. Aparentemente esto no ocurriría en un momento único del desarrollo, sino que la microsporogénesis se interrumpiría en al menos dos estadios.

Esta diferenciación funcional de las anteras se puede observar en un estadio de CMM tardío, la pared de la antera presenta sus cuatro capas típicas, con células turgentes. Sin embargo, tanto las células tapetales como las CMM, se encuentran vacuoladas (Figura 6 A, B). Continuando con el desarrollo, las CMM sufren divisiones meióticas simultáneas originando tétrades tetraédricas de microsporas que se rodean de calosa, asociadas a citocinesis simultánea (Figura 6 C, D). En la pared de la antera, las células están levemente degradadas, las células de la capa media se afinan y se tornan casi imperceptibles, las células del tapete se agrandan adquiriendo una forma cuadrangular, y están notablemente vacuoladas (Figura 6D). A partir de este momento, las microsporas sufren apoptosis en dos momentos de su desarrollo: cuando las tétrades de microsporas pierden la calosa, y cuando los granos de polen ya están formados.

En anteras con tétrades de microsporas rodeadas de calosa, se observa una mayor degradación de las células de la pared anteral. Las células epidérmicas pierden forma y turgencia, las células del endotecio no adquieren mayores dimensiones, y no forman los típicos engrosamientos fibrosos de lignina en la pared tangencial interna, por lo que las anteras son indehiscentes. Sin embargo, aunque las células del tapete siguen presentes sufren una notable vacuolización. En algunos botones, se ha detectado que cuando se degrada la calosa, al momento de separarse las microsporas de la tétrade, las mismas colapsan (Figura 6 E, F).

En otros casos, en anteras con los diferentes estratos celulares de las paredes desintegrados, se observan granos de polen maduros que van colapsando de manera centrípeta (Figura 7 A). Esto podría explicarse porque, a pesar de que las células epidérmicas y del endotecio colapsen, las células del tapete aún no han entrado en apoptosis, y continúan nutriendo a las microsporas hasta llegar a granos de polen maduros (Figura 7B). Por otro lado, cabe destacar que a pesar de la aparente funcionalidad de las células del tapete, se observan grandes vacuolas al igual que en las anteras que colapsan en estadio de tétrade de microsporas. Sin embargo, una vez que las células del tapete se desintegran, estos granos de polen inevitablemente colapsan y la antera nunca se vuelve dehiscente. (Figura 7C.)

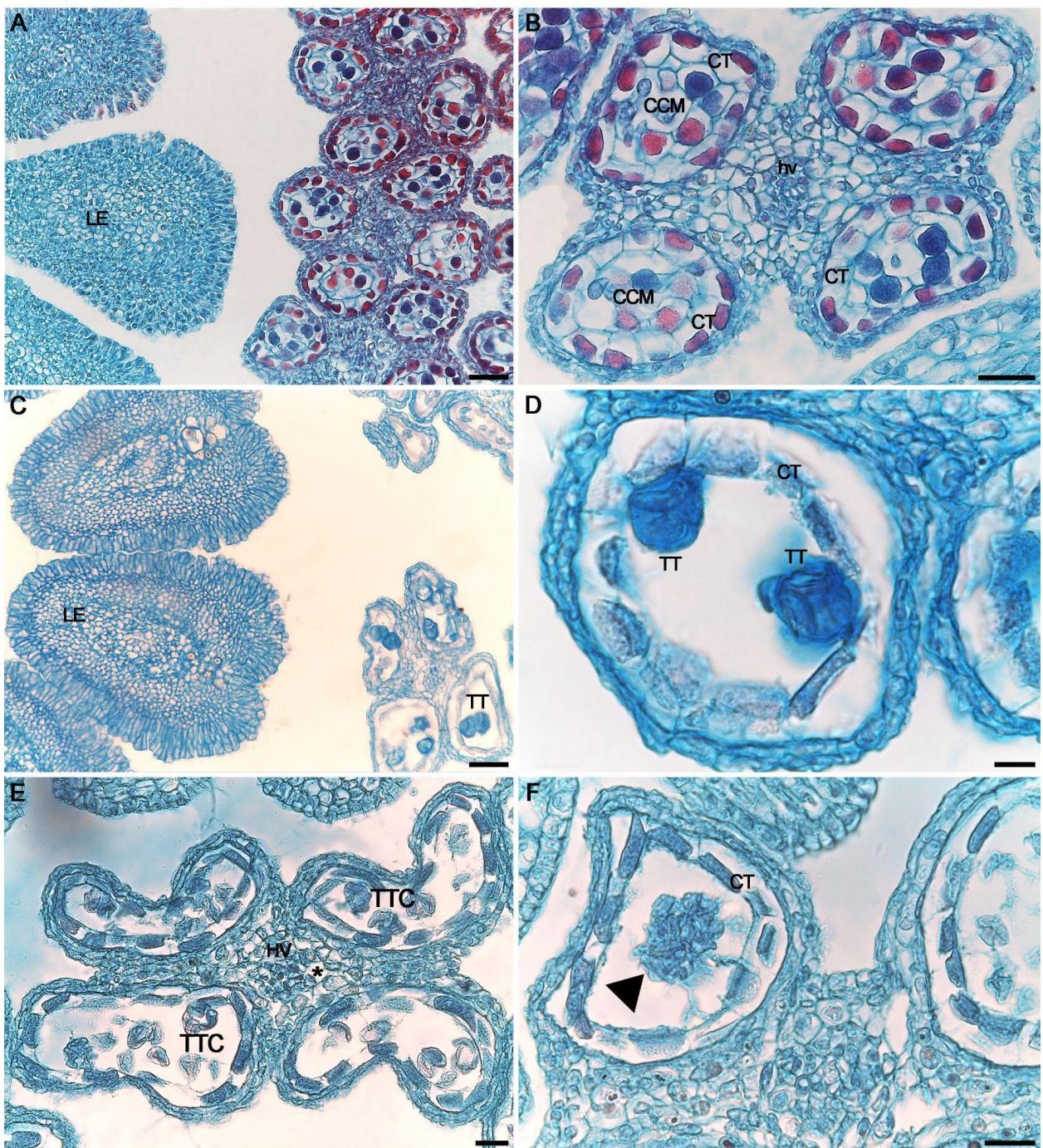


Figura 6. *Gymnocalycium schroederianum*. Fotomicrofotografías de anatomía de la antera obtenidas con microscopio óptico. **A.** Sección transversal de botón floral en estadio de CMM tardío, con lóbulos estigmáticos (LE) de características normales. **B.** Detalle de antera en estadio de CMM tardío, con células tapetales (CT) vacuoladas y CMM vacuoladas. **C.** Sección transversal de botón floral en estadio de tétradas tetraédricas (TT) de microsporas, lóbulos estigmáticos (LE) de características normales. **D.** Detalle de un lóculo de antera, con tétrades tetraédricas (TT) de microsporas rodeadas de calosa. Obsérvese células tapetales (CT) vacuoladas, y la pared anteral colapsada. **E.** Antera colapsada, note la pared anteral notablemente degenerada, tejido conectivo con grandes espacios intercelulares (*), tapete vacuolado, las tétrades de microsporas colapsadas (TTC) han perdido la calosa. **F.** Detalle de un lóculo de antera con células tapetales (CT) vacuoladas y microsporas colapsadas aglutinadas en el centro (punta de flecha negra). Escalas: A, C=50 µm, B=30 µm, D=10 µm, E, F=20 µm.

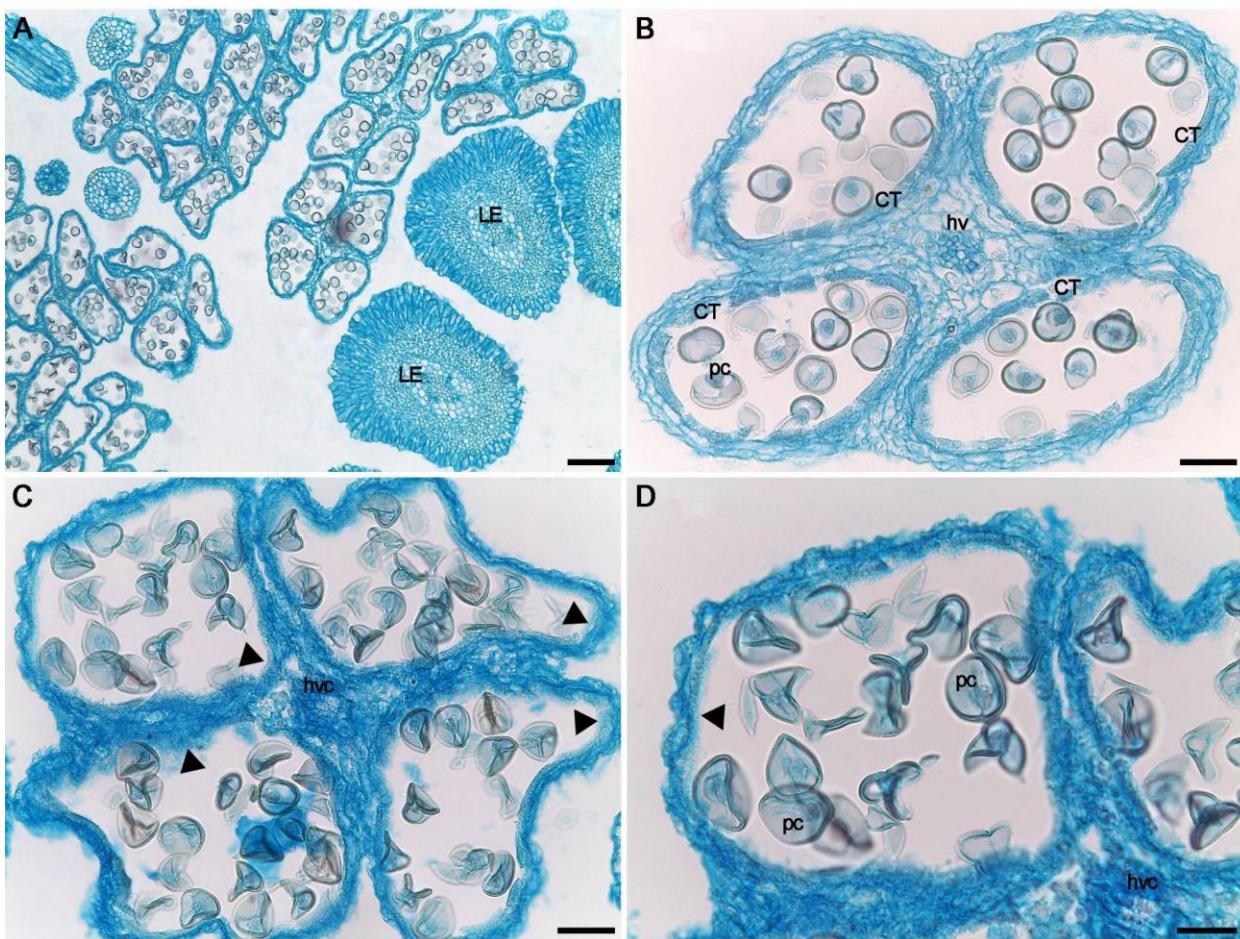


Figura 7. *Gymnocalycium schroederianum*. Fotomicrofotografías de anatomía de floral obtenidas con microscopio óptico. **A.** Sección transversal de botón floral, con anteras abortivas. Hacia el exterior del tubo floral se observan anteras con granos de polen colapsados, y hacia el centro de la flor, cerca de los lóbulos estigmáticos (LE), las anteras aún conservan los granos de polen íntegros. **B.** Detalle de antera cercana a los lóbulos estigmáticos, con pared anteral degenerada, haz vascular (hv), células tapetales (CT) y granos de polen formados (pc). **C.** Detalle de antera cercana al tubo floral con pared anteral, tejido conectivo y haz vascular colapsados (hvc), no se observa células del tapete (puntas de flechas negras) y granos de polen colapsados. **D.** Detalle de un lóculo de antera colapsada, con granos de polen colapsados (pc). Escalas: A=200 µm, B, C, D=30 µm.

Se ha registrado que el tejido conectivo de las anteras que abortan sufre ligeras modificaciones. A diferencia de las características presentes en las anteras viables, en las abortivas se observa una mayor dimensión de las células con grandes espacios intercelulares que rodean al haz vascular central (Figura 8 A, B). En las anteras con granos de polen colapsados, se observa que el haz vascular degenera junto con el tejido conectivo circundante (Figura 8A). Al mismo tiempo, los filamentos cercanos a las anteras abortivas colapsan (Figura 10C). En secciones transversales, los filamentos pierden su típico contorno redondeado, y muestran células desintegradas, solo es posible distinguir unas pocas células xilemáticas del haz vascular (Figura 10C). El filamento adquiere un contorno irregular. Esto podría explicar la desintegración paulatina de la pared de la antera, por falta de irrigación. En todos los casos en los que se registraron anteras abortadas en diferentes estadios de maduración, se ha observado que las características histológicas del gineceo permanecen conservadas (Figura 6A, 6C, 7A), de manera que este particular patrón de desarrollo aquí documentado, podría estar asociado a una diferenciación funcional de los sexos en esta especie.

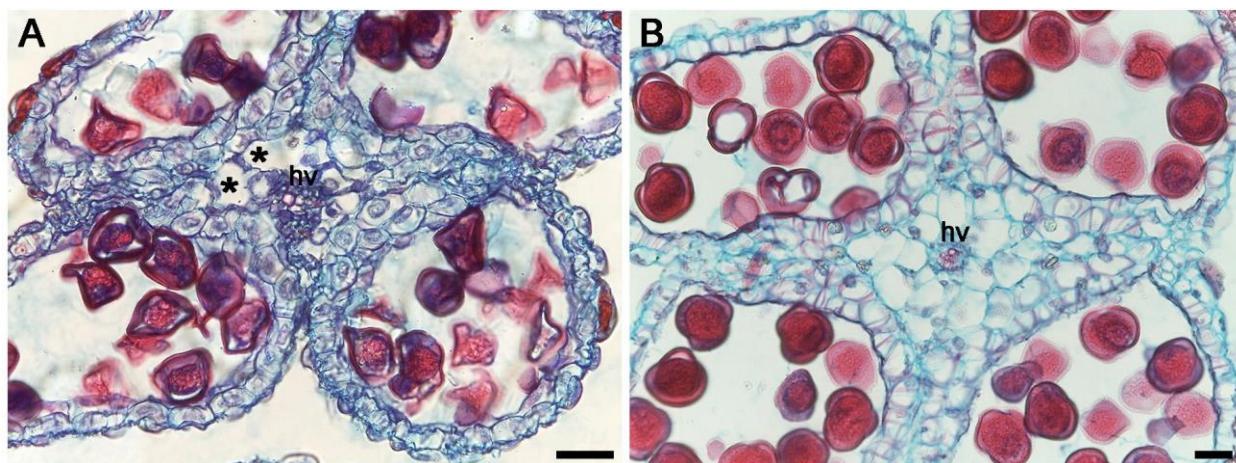


Figura 8. *Gymnocalycium schroederianum*. Fotomicrografías de anatomía de la antera obtenidas con microscopio óptico. **A.** Detalle de tejido conectivo en antera abortiva con granos de polen colapsados, observe el haz vascular (hv) degenerado y grandes espacios intercelulares en el tejido conectivo (*). **B.** Detalle de tejido conectivo en antera funcional con granos de polen viables, observe el haz vascular y el tejido conectivo conservados. Escalas: A=30 μm , B=20 μm .

2) Continúa el proceso de manera normal:

Luego que las CMM han sufrido divisiones meióticas simultáneas, que forman tétrades tetraédricas de microsporas que se rodean de calosa, la calosa de las tétradas se degrada y las microsporas jóvenes son liberadas en el lóculo. Una vez que se produjo la disolución de la calosa y la liberación de las microsporas, éstas comienzan a aumentar su tamaño, el tapete permanece íntegro aunque disminuye el tamaño de sus células. A medida que los granos de polen maduran, el tapete se consume y las células endotecio aumentan su tamaño y desarrollan engrosamientos fibrosos de lignina en las paredes radiales (Figura 9 A-D).

En la antera madura de botones florales pre-anthesis, los dos esporangios de cada teca confluyen debido a la desintegración de las células del tabique que los separa (Figura 9 B). Las células epidérmicas cercanas al estomio se tiñen de rojo, se vuelven globosas y de mayor tamaño, las restantes células epidérmicas reducen su tamaño (Figura 9 B, D, E y F). Las células del endotecio muestran engrosamientos fibrosos de lignina en las paredes radiales más conspicuos. Las células del tapete desaparecen, y se forman orbículas e hilos sin esporopolenina que conectan granos de polen, en la cara interna de la pared de la antera. En anthesis, la dehiscencia longitudinal de las anteras ocurre por degradación de las células del septo parenquimático a la altura del estomio (Figura 9E-F), los granos de polen maduros y viables se liberan en estado tricelular.

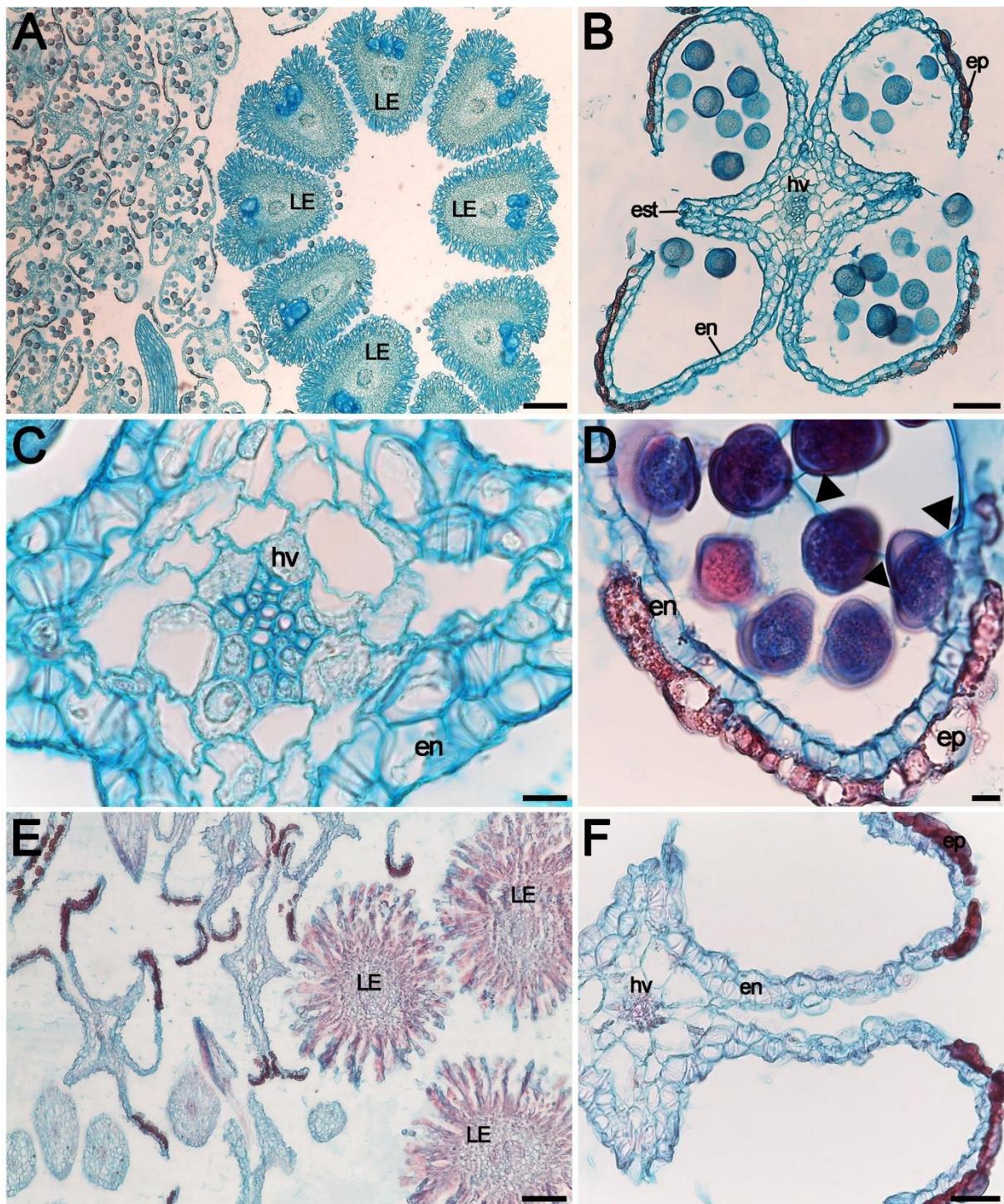


Figura 9. *Gymnocalycium schroederianum*. Fotomicrofotografías de anteras funcionales obtenidas con microscopio óptico. **A.** Aspecto general de flor en pre-antesis, con lóbulos estigmáticos (LE) de características conservadas y anteras dehiscentes con granos de polen viables. **B.** Detalle de antera dehiciente con ruptura de la pared anteral al nivel del estomio (est). **C.** Detalle de tejido conectivo de antera funcional, con haz vascular (hv) perifloemático, células del tejido conectivo con características conservadas, y dos capas de endotecio (en) con engrosamientos de lignina. **D.** Detalle de un lóculo con hilos que conectan granos de polen viables (punta de flechas negras), endotecio con engrosamientos de lignina y células epidérmicas (ep) globosas con contenidos tánicos. **E.** Aspecto general de corte transversal de flor en antesis, observe estigma receptivo con lóbulos estigmáticos (LE) de características conservadas, anteras dehiscentes sin granos de polen, filamentos de contorno redondeado. **F.** Detalle de antera dehiciente. Escalas= A=200 μm , B=50 μm , C, D=10 μm , E=100 μm , F=30 μm .

En todos los casos estudiados, los filamentos presentan características homogéneas. En corte transversal cada filamento está inervado por un único haz vascular de tipo concéntrico perifloemático. Rodeando al haz se encuentran células parenquimatosas de diferentes tamaños, con notables espacios intercelulares. La epidermis está formada por una única capa de células cuadrangulares de dimensiones relativamente grandes. El contorno de los filamentos tiende a ser redondeado (Figura 10A). Los filamentos del verticilo interno, que encierran a la cámara nectarífera, presentan tricomias epidérmicos unicelulares de base ancha y ápice delgado, distribuidos de manera irregular en el contorno del filamento (Figura 10B).

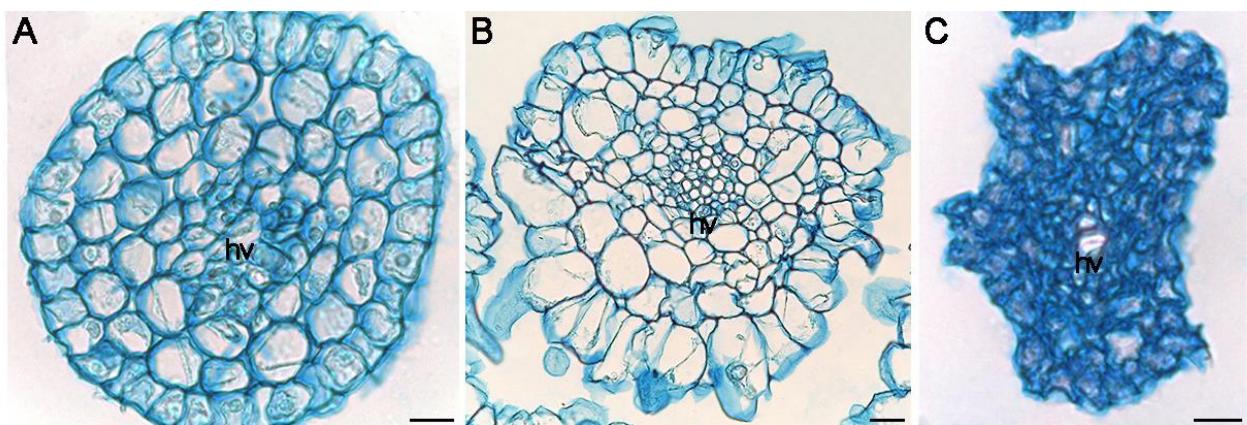


Figura 10. *Gymnocalycium schroederianum*. Microfotografía de sección transversal de filamentos obtenida con microscopio óptico. **A.** Filamento del verticilo externo de antera funcional con células turgentes, y contorno redondeado. **B.** Filamento de verticilo interno en antera funcional, con células turgentes y tricomias epidérmicos. **C.** Corte transversal de filamento de antera abortiva, con células colapsadas, de contorno piramidal irregular. Abreviaturas: hv=Haz vascular. Escalas= A, C=10 µm, B=20 µm.

Al momento de la antesis floral de *G. schroederianum*, las anteras son dehiscentes, con granos de polen presentados en las anteras y un porcentaje menor de ellos dispersos en el interior del tubo floral (Figura 4 A-C). Mientras que el estigma se encuentra totalmente desarrollado pero con las ramas estigmáticas retráidas, indicando que aún no se encuentra receptivo (Figura 4A, B).

Tanto en la microsporogénesis normal como en la que sufre anomalías, el desarrollo no aparenta estar relacionado con la clasificación artificial en estadíos de acuerdo a la longitud del botón floral, propuestos en materiales y métodos. Esto es debido a que en botones de longitudes similares, clasificados como un mismo estadío, se registraron diferentes estadíos de desarrollo ontogenético (por ejemplo, botón con CMM, con tétrades de microsporas rodeadas de calosa, o incluso con microsporas sin calosa). Por lo tanto, el tamaño de un botón floral no refleja su avance en el desarrollo de la microsporogénesis.

HILOS QUE CONECTAN LOS GRANOS DE POLEN

En anteras dehiscentes de *G. schroederianum* se ha registrado la presencia de estructuras filiformes que conectan y agrupan a varios granos de polen, estas estructuras reciben el nombre de hilos o *threads*. Estos hilos son observables tanto en microscopio óptico como en MEB (Figura 9 D y Figura 11 A, B). Los mismos no resistieron el proceso de acetólisis, por lo que carecen de esporopolenina, y están formados de derivados de células del tapete. Se encuentran casi exclusivamente en la región del estomio, lugar de

dehiscencia de las tecas (Figura 11 A). Estos hilos pueden formarse antes o durante la dehiscencia de la antera. En la especie analizada, *G. schroederianum* los hilos presentan un espesor variable (Figura 11 B). Son visibles en una etapa de pre-anthesis floral, es decir cuando la flor aún no está completamente abierta pero las anteras empiezan su proceso de dehiscencia.

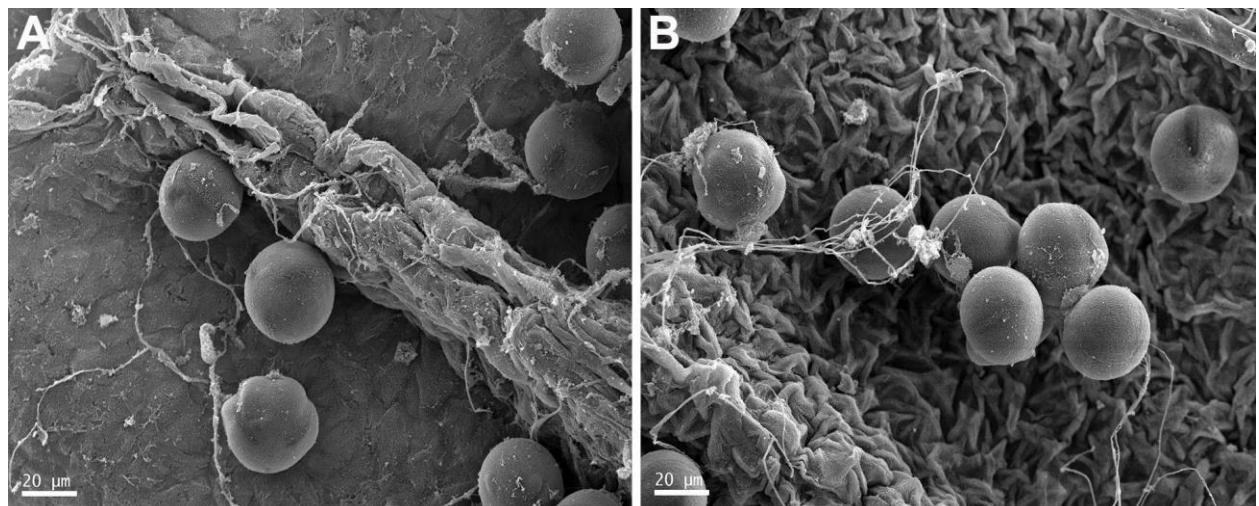


Figura 11. Fotomicrografías obtenidas con MEB de anteras dehiscentes con hilos que conectan granos de polen en *G. schroederianum*. **A.** Vista del interior de la antera a la altura del estomio. **B.** Detalle de hilos conectando un grupo de granos de polen.

Gymnocalycium saglionis, G. schickendantzii, G. schroederianum y G. spegazzinii

ORBÍCULAS

Las cuatro especies de *Gymnocalycium* estudiadas: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. schroederianum* y *G. spegazzinii*, presentan orbículas en la pared de la antera dehiscente (Figura 12 A-D). Al igual que los hilos que conectan los granos de polen, las orbículas tienen su origen en el tapete secretor. Todas las especies presentan orbículas esféricas de superficie lisa, pero con una diferencia notable en el tamaño entre especies, y en la distribución sobre la pared de la antera. *G. saglionis* posee orbículas esféricas ligeramente grandes, de 0,5-0,7 μm de diámetro, en agrupaciones distribuidas de manera uniforme sobre la pared de la antera (Figura 12 A). *G. schickendantzii* posee las orbículas de mayor tamaño, de 0,2-0,8 μm de diámetro, en agrupaciones de mayor número de orbículas, dispuestas densamente, cubriendo casi toda la pared de la antera (Figura 12 B). *G. schroederianum* posee las orbículas más pequeñas, esféricas a subesféricas, de 0,2 μm de diámetro, solitarias o en ocasiones en agrupaciones de hasta 3 orbículas, distribuidas laxamente (Figura 12 C). Por último, *G. spegazzinii* posee orbículas de 0,4-0,5 μm de diámetro solitarias o en agrupaciones de 3 orbículas, distribuidas de manera uniforme (Figura 12 D).

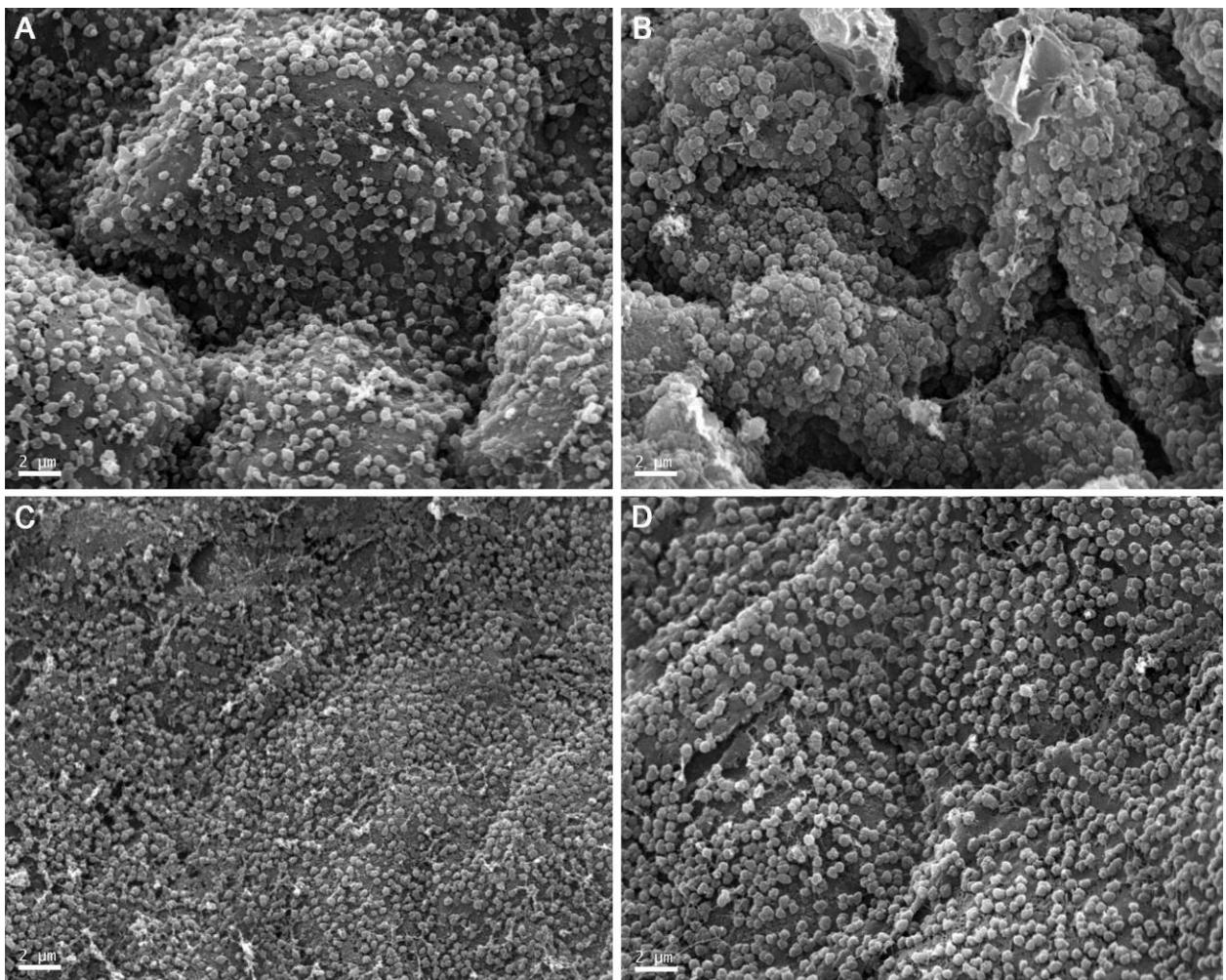


Figura 12. Fotomicrografías obtenidas con MEB de vista superficial de orbículas en el interior de la pared anteral. **A.** *G. saglionis*. **B.** *G. schickendantzii*. **C.** *G. schroederianum*. **D.** *G. spegazzinii*.

GRANOS DE POLEN

Los estudios polínicos indican que todas las especies presentan unidades polínicas que se liberan en móndades, con granos de polen isopulares, radiosimétricos, trizonocolpados de colpos angostos y largos de extremos más o menos ahusados con la misma ornamentación que el resto de la exina (Figura 13 y Figura 14). *G. schroederianum* posee granos de forma prolato esferoidal ($P/E=1,02$) con un eje ecuatorial de 34,50 μm a 51,70 μm , un eje polar de 38,09 μm a 50,98 μm y de ámbito circular; *G. saglionis* posee granos de forma prolato esferoidal ($P/E=1,03$), con un eje ecuatorial de 40,12 μm a 50,93 μm y un eje polar de 41,20 μm a 49,76 μm , y de ámbito circular; *G. spegazzinii* por otro lado posee granos de forma oblato esferoidal con un eje ecuatorial de 42,01 μm a 50,23 μm y un eje polar de 40,85 μm a 48,85 μm , de ámbito circular; y *G. schickendantzii* con granos esferoidales, con un eje ecuatorial de 37,75 μm a 48,52 μm y un eje polar de 40,11 μm a 50,75 μm , de ámbito circular. Para mayor detalle de las mediciones de las unidades polínicas, ver Tabla 1 y Anexo.

Todas las especies poseen exina tectada, punteada, con perforaciones de tipo punteadas circulares-subcirculares de márgenes lisos, de menos de 1 μm . La exina de las cuatro especies presenta ligeras diferencias en su escultura: *G. schroederianum* exhibe una superficie densamente nanoespinulada (0,01

μm) (Figura 13 A, B); mientras que *G. saglionis*, *G. spegazzinii* y *G. schickendantzii* presentan microespínulas de diferentes tamaños, siendo *G. spegazzinii* las de menor tamaño (0,5 μm) (Figura 13 C-D); a su vez que *G. schickendantzii* y *G. saglionis* poseen microespínulas más conspicuas (0,8 μm) (Figura 13 E-I). La pared del grano de polen de todas las especies tiene alrededor de 1 μm a 3 μm de espesor. Por otro lado, solo se pudo observar la estructura de la exina en Microscopio electrónico de barrido (MEB) en *G. saglionis*: el infractectum es columelar, con columelas distribuidas irregularmente (Figura 13 G).

Tabla 1. Mediciones de los granos de polen en las cuatro especies de *Gymnocalycium* analizadas.

Medidas (μm) / Especies	Eje polar (mín.-máx.)	Eje ecuatorial (mín.-máx.)	P/E	Forma	Aperturas (longitud)	Exina (espesor)	Espínulas (longitud)	Puncta
<i>G. saglionis</i>	41,20 - 49,76	40,12 - 50,93	1,03	Prolato esferoidal	36	1,2 - 3	0,5-0,8	0,28 - 045
<i>G. schickendantzii</i>	40,11 - 50,75	37,75 - 48,52	1,00	Esféroidal	32	1 – 2,2	0,5-0,7	0,19 - 0,38
<i>G. Schroederianum</i>	38,09 - 50,98	34,50 - 51,70	1,02	Prolato esferoidal	33	1,1 – 2,5	0,01	0,09 - 0,4
<i>G. spegazzinii</i>	40,85 - 48,85	42,01 - 50,23	0,98	Oblato esferoidal	30	1,2 – 3,3	0,5	0,09 - 0,31

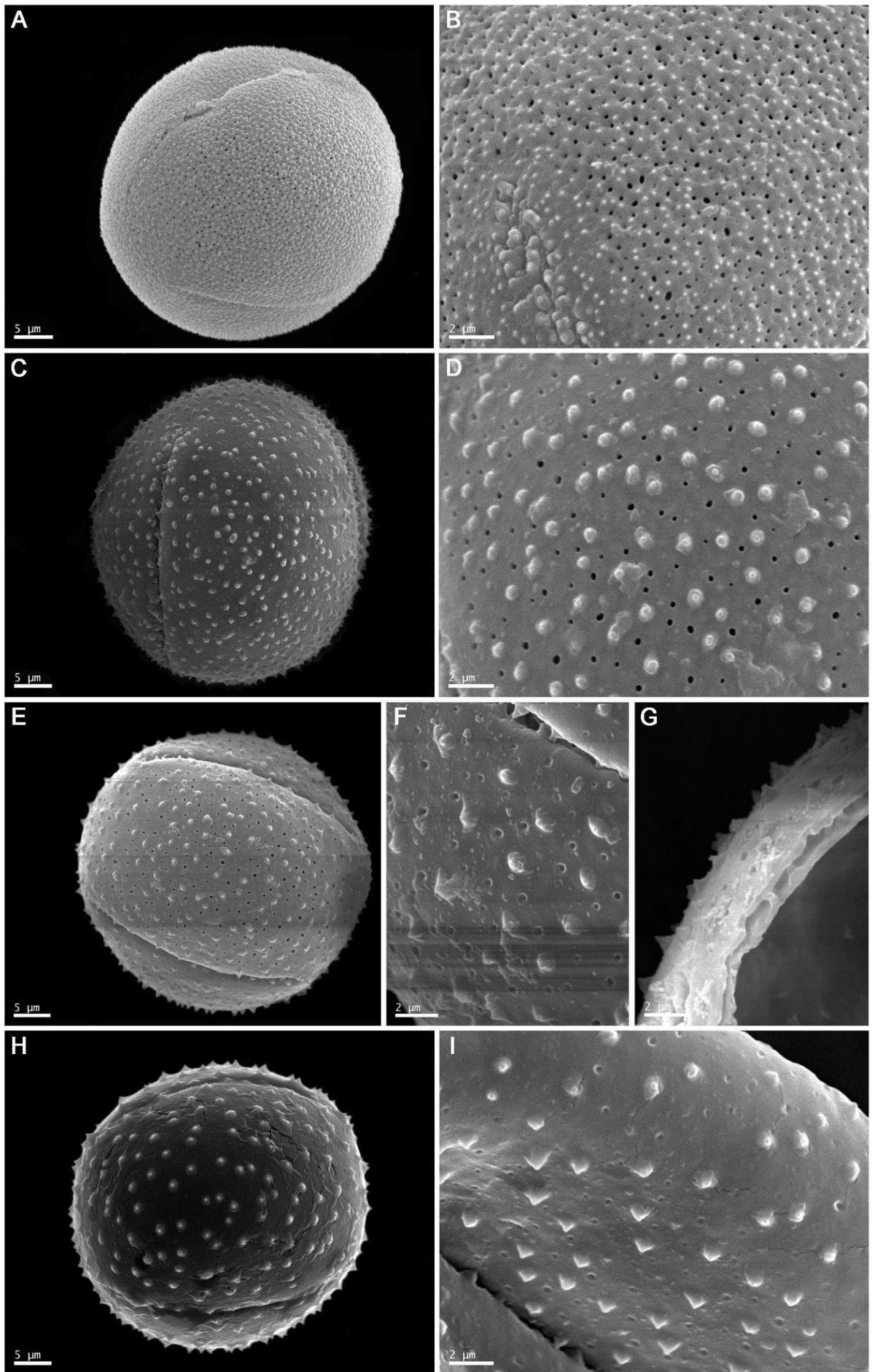


Figura 13. Fotomicrografías de unidades polínicas de *Gymnocalycium* con MEB. **A.** Vista ecuatorial de *G. schroederianum*. **B.** Detalle de la exina, con puncas y nanoespínulas densamente distribuidas. **C.** Vista ecuatorial de *G. spegazzinii*. **D.** Detalle de la exina con microespículas y puncas. **E.** Vista ecuatorial de *G. saglionis*. **F.** Detalle de la exina con microespículas más notorias y puncas. **G.** Vista de la estructura de la exina, infractectum baculado. **H.** Vista ecuatorial de *G. schickendantzii*. **I.** Detalle de la exina, con puncas y microespínulas conspicuas.

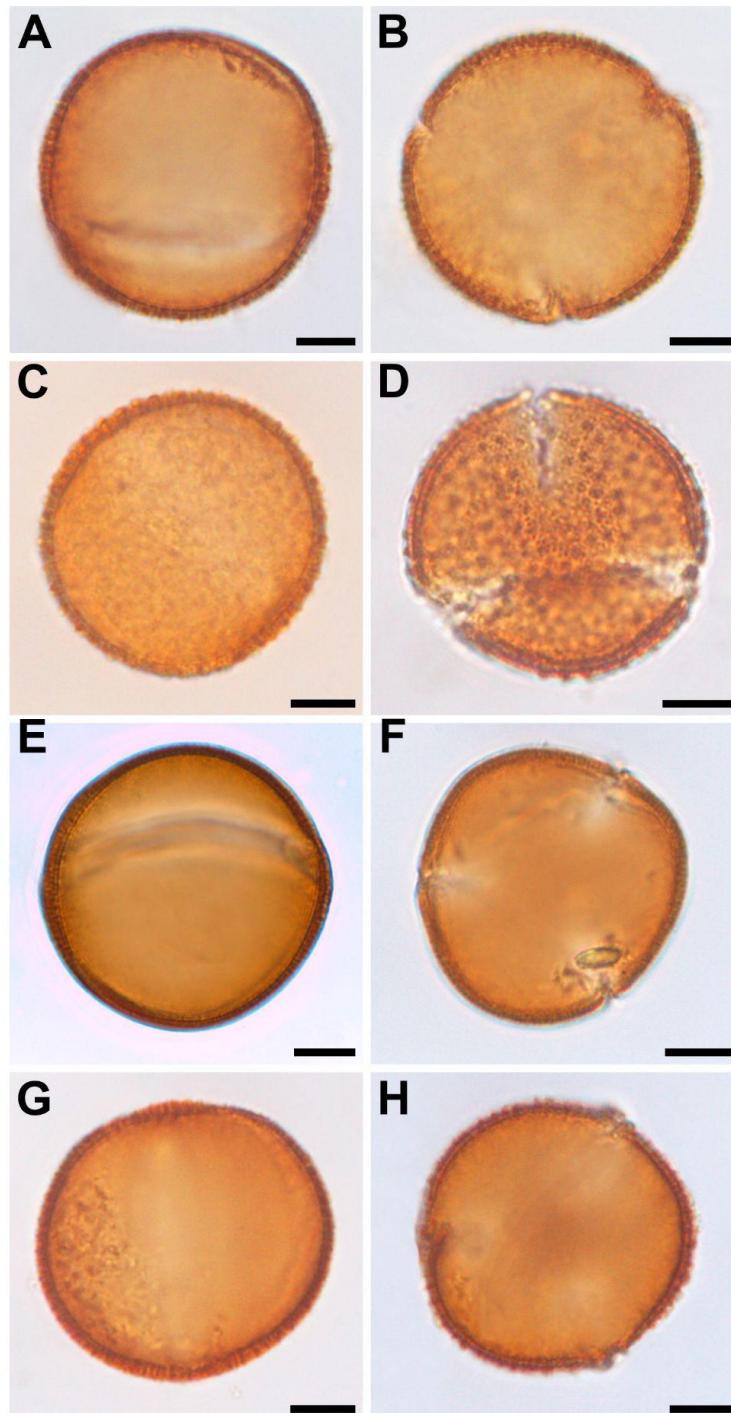


Figura 14: Granos de polen acetolizados en corte óptico de las especies estudiadas de *Gymnocalycium*. **A, C, E y G.** Vista ecuatorial. **B, D, F y H.** Vista polar. **A, B.** *G. saglionis*. **C, D.** *G. schickendantzii*. **E, F.** *G. schroederianum*. **G, H.** *G. spegazzinii*. Escala: 20 μm .

NECTARIOS FLORALES

Las cuatro especies estudiadas: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. Schroederianum* y *G. spiegazzinii*, presentan cámaras nectaríferas en el interior del hipanto, por encima del ovario, asociados a la base de los filamentos rodeando al estilo. Existe una diferencia notable de tamaño entre las cámaras nectaríferas en las cuatro especies: *G. saglionis* exhibe la cámara nectarífera más conspicua mientras que *G. Schroederianum* posee la cámara menos desarrollada (Figura 15 A, 15 D, 15 G, 15 J). La pared de la cámara nectarífera está compuesta típicamente por 3 tejidos: epidermis, parénquima nectarífero y parénquima subnectarífero. La epidermis es uniestratificada y está modificada en tricomas y papilas. *G. saglionis*, *G. schickendantzii* y *G. spiegazzinii* poseen tricomas epidérmicos pluricelulares y uniseriados, mientras que *G. Schroederianum* presenta una mayor proporción de papilas (Figura 15 C, 15 F, 15 I, 15 L). Además, se ha observado la presencia de tricomas pluricelulares ramificados en *G. spiegazzinii* y *G. schickendantzii* (Figura 15 F, 15 I). Las cuatro especies analizadas exhiben nectarostomas, estomas no funcionales a partir de los cuales se secreta el néctar (Figura 15 E, 15 L). En todas las especies el parénquima nectarífero es un tejido homogéneo con células isodiamétricas pequeñas, con una alta actividad metabólica y densas reservas citoplasmáticas, asociadas a su función secretora. Está inervado por numerosos haces vasculares perifloemáticos que ingresan desde el parénquima subyacente no secretor. Por otro lado, el parénquima subnectarífero, es un tejido no secretor con células de mayores dimensiones en relación al tejido nectarífero y con espacios intercelulares notables (Figura 15 B, 15 E, 15 H, 15 K).

Los resultados de las pruebas histoquímicas se resumen en la Tabla 2. Todas las especies almacenan almidón en el tejido subnectarífero, además *G. spiegazzinii* y *G. Schroederianum* también exhiben reservas en el parénquima nectarífero. Las cuatro especies muestran una elevada actividad metabólica en el parénquima nectarífero que involucra la presencia de proteínas. También se observan proteínas en el interior de los tricomas epidérmicos. En todos los casos, se observó la presencia de cera en la cutícula de la epidermis (Figura 15 C, 15 F, 15 I, 15 L).

Tabla 2. Principales características histoquímicas de nectarios florales en las cuatro especies analizadas.

Nectario/especies	Tricomas epidérmicos	Tejido nectarífero	Tejido subnectarífero
<i>G. saglionis</i>	Lugol:(-)	Lugol:(-)	Lugol:(+)
	Sudan Black:(+)	Sudan Black:(-)	Sudan Black:(-)
	Xilidina:(+)	Xilidina:(+)	Xilidina: (+)
<i>G. schickendantzii</i>	Lugol:(-)	Lugol:(-)	Lugol:(+)
	Sudan Black:(+)	Sudan Black:(-)	Sudan Black:(-)
	Xilidina:(+)	Xilidina:(+)	Xilidina:(-)
<i>G. Schroederianum</i>	Lugol:(-)	Lugol:(+)	Lugol:(+)
	Sudan Black:(+)	Sudan Black:(-)	Sudan Black:(-)
	Xilidina:(+)	Xilidina:(+)	Xilidina:(-)
<i>G. spiegazzinii</i>	Lugol: (-)	Lugol:(+)	Lugol:(+)
	Sudan Black:(+)	Sudan Black:(-)	Sudan Black:(-)
	Xilidina:(+)	Xilidina:(+)	Xilidina:(-)

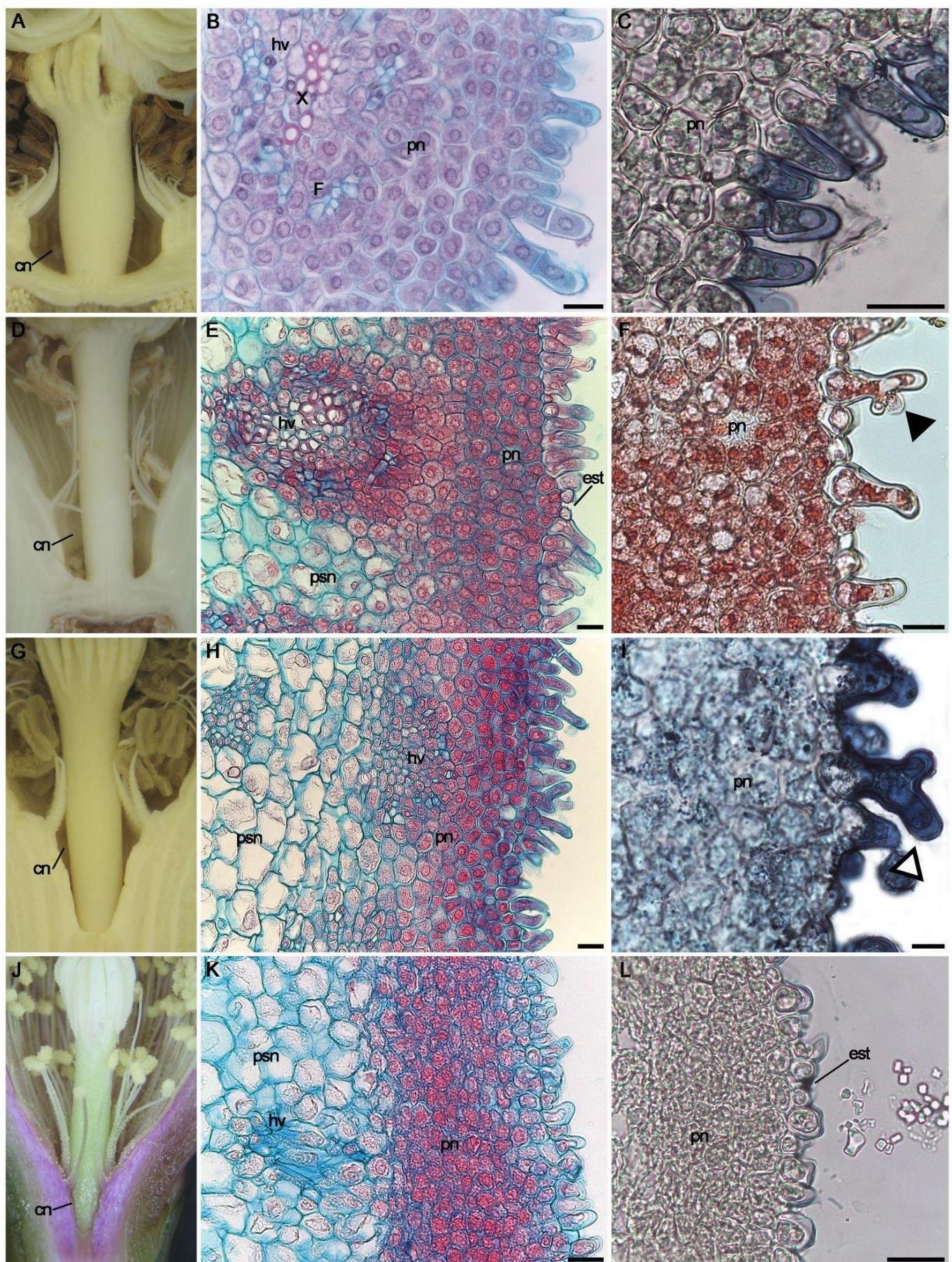


Figura 15. Fotomicrografía de nectarios florales de cuatro especies de *Gymnocalycium* obtenidas con microscopio estereoscópico y microscopio óptico. **A-C.** *G. saglionis*. **D-F.** *G. spegazzinii*. **G-I.** *G. schickendantzii*. **J-L.** *G.*

schroederianum. **A.** Aspecto general de cámara nectarífera en vista lateral. **B.** Sección transversal de pared de cámara nectarífera. **C.** Prueba histoquímica de Sudán Black, tinción positiva en tricomas epidérmicos pluricelulares. **D.** Aspecto general de cámara nectarífera en vista lateral. **E.** Sección transversal de pared de cámara nectarífera. **F.** Prueba histoquímica de Xilitina, tinción positiva en tricomas epidérmicos pluricelulares ramificados y parénquima nectarífero. **G.** Aspecto general de cámara nectarífera en vista lateral. **H.** Sección transversal de pared de cámara nectarífera. **I.** Prueba histoquímica de Sudán Black, tinción positiva en tricomas epidérmicos pluricelulares. **J.** Sección transversal de pared de cámara nectarífera. **K.** Sección transversal de pared de cámara nectarífera. **L.** Prueba histoquímica de Sudán Black, tinción positiva en papillas epidérmicas. Abreviaturas: cn= cámara nectarífera; est= nectarostoma; F= floema; hv= haz vascular; pn= parénquima nectarífero; psn= parénquima subnectarífero; X= xilema. Escalas: B, C, E, F, H, K, L=20μm; I=10μm.

DISCUSIÓN

MORFOLOGÍA FLORAL, MICROSPORANGIO, MICROSPOROGÉNESIS Y MICROGAMETOGENESIS

De acuerdo a los resultados morfo-anatómicos y embriológicos obtenidos, se ha detectado que la especie *G. schroederianum* presenta 2 morfotipos florales: flores perfectas, con gineceo y androceo fértiles; y un segundo morfotipo con flores morfológicamente perfectas, pero funcionalmente pistiladas. Esta diferenciación funcional ocurre debido a que el androceo aborta en algún momento de su desarrollo, pero la anatomía del estilo y estigma muestran características normales, por lo que el gineceo continúa siendo funcional. Además, en flores en pre-antesis y antesis, las anteras son totalmente dehiscentes, liberando granos de polen dentro del tubo floral, mientras que el gineceo presenta un estilo y estigma completamente desarrollado pero con sus ramas estigmáticas retraídas, lo que indica que aún no es receptivo. Por lo tanto, *G. schroederianum* es protándrica.

Tradicionalmente, las cactáceas han sido descritas como una familia con flores perfectas (Anderson 2001; Kiesling et al 2005; Kiesling et al. 2012), sin embargo, se han reportado numerosos casos de flores unisexuadas funcionalmente que habrían surgido de forma independiente en casi todas las subfamilias, a excepción de Maihuenoideae. De acuerdo a la recopilación de antecedentes realizada por Sánchez y Vázquez-Santana (2018), en Pereskioideae, la subfamilia más basal, se han reportado cuatro casos de especies dioicas en el género *Pereskia* (Leuenberger 1986; Areces-Mallea 1992). En Opuntioideae el sistema reproductivo se diversifica un poco más presentando especies dioicas, en *Consolea macracantha* (Griseb.) A. Berger, *C. moniliformis* (L.) A. Berger, *Opuntia stenopetala* Engelm. y *Opuntia quitensis* F.A.C. Weber (Bravo-Hollis 1978; Anderson 2001; Strittmatter et al. 2006, 2008); especies subdioicas a dioicas en *Consolea spinosissima* (Mill.) Lem. (Strittmatter et al. 2006, 2008); ginodioicas en cuatro especies de *Cylindropuntia* (Engelm.) F.M. Knuth y *Opuntia quimilo* K. Schum. (Rebman 1998; Rebman y Pinkava 2001; Díaz y Cocucci 2003; Baker y Cloud-Hughes 2014); y una especie con la mayor variabilidad intraespecífica, *Opuntia robusta* H.L. Wendl. ex Pfeiff., con hermafroditismo, dioecia, ginodioecia y trioecia (Del Castillo y González-Espinosa 1988; Janczur et al. 2014). En Cactoideae, se ha detectado tres tipos de unisexualidad: dioecia en cinco especies de *Echinocereus* Engelm. (Hoffman 1992; Baker 2006; Sánchez et al. 2013; Hernández-Cruz et al. 2018); dioecia a trioecia en *Mammillaria dioica* K. Brandegee, *M. neopalmeri* R.T. Craig y *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Rose. (Lindsay y Dawson 1952; Fleming et al. 1994; Sánchez y Vázquez-Santana 2018) y ginodioecia en *Selenicereus innessii* Kimnach (Kimnach 1982). En

particular, en la tribu Trichocereeae, este fenómeno es poco común, sin embargo la dioecia ha sido recientemente reportada en *Gymnocalycium bruchii* (Delbón et al. 2023), siendo el primer reporte de unisexualidad funcional para todo el género. Si bien las especies citadas en Cactaceae, junto con *G. schroederianum*, sólo constituyen un total de veintiséis casos de unisexualidad con morfotipos florales especializados funcionalmente, sobre las casi 2000 especies de cactáceas reconocidas, estos hallazgos evidencian la importancia de aumentar estudios morfoanatómicos y embriológicos con énfasis en la biología reproductiva, a fin de determinar si este fenómeno se encuentra más extendido de lo que se piensa dentro de la familia.

La existencia de variaciones en la expresión sexual a nivel de individuo (monoecia o dioecia), a nivel morfológico (hercogamia, distilia o heterostilia) o fisiológico (autoincompatibilidad, dicogamia -por ejemplo protandria-) de la función sexual femenina o masculina, se han propuestos como mecanismos que han evolucionado de manera independiente para promover la alogamia (Madujano et al. 2010).

De acuerdo a Simpson (2006), las plantas polígamias son definidas como individuos con flores perfectas y unisexuales en un mismo pie, estas pueden ser andromonoicas (si las flores unisexuales son masculinas) o ginomonoicas (si las flores unisexuales son femeninas). Por otra parte, la ginodioecia se refiere al fenómeno en que una especie presenta flores pistiladas en un individuo, y flores perfectas en otro. Las flores pistiladas pueden surgir de distintas maneras, en flores con ambos sexos esto ocurre por algún tipo de esterilidad masculina. En *G. schroederianum* la esterilidad masculina se desencadena en al menos dos momentos del desarrollo del androceo, uno de ellos ocurre luego de la formación las tétrades de microsporas rodeadas de calosa, la pared anteral degenera, y al momento de la desintegración de la calosa las microsporas finalmente colapsan. Un proceso similar se describe para otra especie del género, *G. bruchii* (Delbón et al. 2023), y para *Opuntia robusta*, una especie dioica, donde en las anteras de las flores pistiladas, luego de la meiosis, las microsporas presentan anomalías, se rodean de calosa de forma irregular y colapsan al poco tiempo (Silva 2007). En cambio, existen otras especies donde el proceso de esterilidad ocurre al inicio del desarrollo. Tal es el caso de *Opuntia stenopetala*, una especie dioica con flores pistiladas donde las células madres de las microsporas (CMM) sufren una muerte celular temprana y nunca llegan a formar las tétrades de microsporas (Flores-Rentería et al. 2013). En *Mammillaria dioica*, las flores pistiladas también sufren una interrupción temprana de la microsporogénesis pero bajo un fenotipo de esterilidad masculina diferente, las CMM y las del tapete se vacuolizan, el tapete adquiere grandes dimensiones y sufre divisiones pericliniales anormales, las CMM colapsan al poco tiempo y nunca forman tétrades (Sánchez y Vázquez-Santana 2018).

El segundo momento de esterilidad masculina en *G. schroederianum* ocurre casi al final de la microsporogénesis, cuando los granos de polen se encuentran completamente formados, pero la pared anteral presenta células colapsadas, las células del tapete presentan notables vacuolas, y al momento que se degenera el tapete, los granos de polen colapsan por completo. Hasta el momento, no hay antecedentes en la familia donde las anteras abortan con granos de polen completamente formados, constituyendo este trabajo el primer reporte de un nuevo fenotipo de esterilidad masculina para Cactaceae.

Por otro lado, en ambos tipos de anteras abortivas de *G. schroederianum* existen características comunes: pared anteral degenerada, células del tapete muy vacuoladas y filamentos con constricciones

apicales. Los filamentos colapsados apicalmente aparecen ser un patrón común entre algunas especies unisexuales de Cactaceae, (Silva 2007; Flores-Rentería et al. 2013; Hernández-Cruz et al. 2018; Sánchez y Vázquez-Santana 2018; Delbón et al. 2023) en todas ellas también se reporta una degeneración de la pared anteral, que podría tener su origen en la falta de irrigación, que provoca que la antera se vuelva indehiscente. Anormalidades en el tapete parecieran tener un rol protagónico en la esterilidad masculina, han sido reportadas en numerosas especies dentro de la familia, tales como, *Opuntia stenopetala*, *Opuntia robusta*, *Mammillaria dioica*, *Consolea spinosissima*, *Cylindropuntia wolfii*, y especies de *Echinocereus* (Strittmatter et al. 2002; Flores-Rentería et al 2013; Sánchez y Vázquez-Santana 2018; Hernández-Cruz et al. 2018, 2019; Ramadoss et al. 2022). En *Consolea spinosissima*, las células del tapete se agrandan y vacuolizan momentos antes de que la CMM entre en profase 1 y degenera al poco tiempo (Strittmatter et al. 2002). En *Echinocereus* spp. la esterilidad masculina tiene un origen genético, está dada por una muerte celular programada temprana de las células tapetales, en una etapa premeiótica, lo que provoca el colapso de las CMM (Hernández-Cruz et al. 2018).

Con respecto a las anteras funcionales, las mismas exhiben una pared anteral de tipo monocotiledóneo, también reportada en diferentes especies dentro de la familia como *Pereskia lynchidiflora*, *Opuntia stenopetala*, *O. robusta*, y *Pachycereus militaris* (Orozco 2002; Núñez 2004; Silva 2007; Jiménez-Durán et al. 2014), que junto con el tapete de tipo secretor y la meiosis simultánea que da origen a tétrades tetraédricas de microsporas, se consideran características conservadas para la familia Cactaceae (Johri et al. 2013).

La antesis es el momento de la apertura de flores, donde se exhiben partes florales para los polinizadores. El momento relativo de desarrollo del gineceo frente al androceo puede ser una característica importante en la biología reproductiva (Simpson 2006). La separación temporal en la maduración entre el gineceo y el androceo se denomina dicogamia (Pimienta-Barrios y del Castillo 2002). Existen diferentes tipos de dicogamia, en particular, la protandria hace referencia a la liberación de granos de polen antes de que los estigmas sean receptivos, lo que promueve la alogamia y evita la autofertilización dentro de los individuos de una especie (Simpson 2006).

Gymnocalycium schroederianum ha demostrado poseer flores hermafroditas protándricas, en las que al inicio de la antesis, las anteras son completamente dehiscentes y las ramas estigmáticas se encuentran retráctiles, por lo que el gineceo aún no es receptivo para evitar la autopollinización. La protandria en el género *Gymnocalycium* ha sido previamente reportada para *G. saglionis*, *G. schickendantzii* y *G. spegazzinii* (González 2020). De manera que podría tratarse de una estrategia conservada y extendida en el género. Existen estudios que evalúan la posibilidad de que la protandria sea el estado ancestral de la ginodioecia, un sistema sexual dimórfico en el que las poblaciones se componen de plantas hermafroditas y femeninas (Wang et al. 2020). Relacionado a ello, Wang et al. (2020) han estudiado a una especie ginodioica de la familia Campanulaceae, *Cyananthus delavayi* Franch., donde han demostrado utilizando flores manipuladas experimentalmente, que en las flores hermafroditas, la duración más corta del gineceo proporcionó oportunidades más reducidas para la importación de polen, que se asoció con un conjunto de semillas de hermafroditas significativamente reducido en comparación con las producidas en flores pistiladas unisexuales, donde el gineceo tiene una función más prolongada. Por lo tanto, una duración más

corta del gineceo resulta en un costo de fertilidad significativo para las plantas hermafroditas, y que esto establece condiciones que favorecen una transición evolutiva del hermafrotitismo a la ginodioecia.

Si bien las flores de las cactáceas son descritas como hermafroditas, la alogamia es el mecanismo más común de reproducción sexual. De los 55 taxones estudiados por Ross (1981), las semillas se producen por autopolinización en solo 11 taxones y por polinización cruzada en los 44 taxones restantes (Pimienta-Barrios y del Castillo 2002). Para promover el entrecruzamiento existen diferentes mecanismos, uno de ellos es la protandria, como es el caso de *G. schroederianum*. En Cactaceae, existen algunos otros ejemplos de especies protándricas, como *Ariocarpus* spp., *Hylocereus* spp., *Pilosocereus royenii* (L.) Byles & G.D. Rowley y *Thelocactus leucacanthus* ssp. *schmollii* (Werderm.) Mosco & Zanov (Pimienta-Barrios y del Castillo 2002; Rivera-Marchand y Ackerman 2006; Martínez-Peralta et al. 2014; Delgado-Ramírez et al. 2021). Por otro lado, la autoincompatibilidad es una barrera genética que puede tener lugar entre el polen y el estigma o durante el desarrollo de los tubos polínicos en el estilo (Pimienta-Barrios y del Castillo 2002). En otras especies del género *Gymnocalycium*, *G. saglionis*, también se ha visto autoincompatibilidad sexual, lo cual obliga a la fertilización cruzada, y la vuelve fuertemente dependiente de sus polinizadores, abejas y avispas, para su éxito reproductivo (Gorostiague 2016).

El estudio de la microsporogénesis de *Gymnocalycium schroederianum*, ha resultado en importantes descubrimientos para el género. La presencia de flores funcionalmente unisexuales y hermafroditas dicogámicas demuestran que la especie presenta diferentes mecanismos que promueven la alogamia sobre la autofecundación, lo que aumenta la variabilidad genética en las poblaciones. Sin embargo, son necesarios más estudios poblacionales de la especie para confirmar la ginodioecia o eventual ginomonoecia o dioecia. Por otro lado, sería interesante investigar si existe algún grado de autoincompatibilidad en la especie, y si así fuera, determinar a qué nivel ocurre.

HILOS QUE CONECTAN LOS GRANOS DE POLEN

Mediante observaciones en microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica se confirma la presencia de hilos que conectan granos de polen en *Gymnocalycium schroederianum*. En *Gymnocalycium* su presencia ha sido confirmada en 11 especies por Halbritter et al. (1997), y en *G. saglionis* y *G. spegazzinii* por González (2020). Este rasgo pareciera ser una característica exclusiva del género debido a que, no se ha reportado su presencia en géneros emparentados dentro de la tribu Trichocereeae, ni en la tribu Notocactaceae (Halbritter y Till 1996; González 2020). Por otro lado, los hilos que conectan granos de polen han sido estudiados en otras familias de angiospermas. En Annonaceae, se ha reportado la presencia de hilos que conectan granos de polen en 23 especies del género *Pseuduvaria* Miq. los cuales presentan irregularidades en el diámetro, característico de hilos sin esporopolenina, formados a partir de derivados del tapete como el pollenkit (Su y Saunders 2003). De acuerdo con Halbritter et al. (1997) los hilos se originan en parte de células modificadas del estomio, más precisamente de paredes celulares divididas, y en parte del pollenkit producido por la desintegración de las células del tapete. En *G. schroederianum* los hilos no resistieron el proceso de acetólisis, por lo que los mismos carecen de esporopolenina, y estarían formados de derivados tapetales. No existe una certeza acerca de su función en *Gymnocalycium* debido a que solo conectan un pequeño número de granos de polen, por cada microsporangio, por lo que se cree que no tienen un papel significativo en la polinización (Halbritter et al. 1997). En distintas especies de Onagraceae, se han detectado hilos de viscina que conectan granos de

polen, los cuales serían una de las causas de la alta eficiencia en la polinización, y una baja proporción del número de polen/óvulos (Cruden y Jensen 1979). En los grupos más basales de Ericaceae, relacionados con el género *Rhododendron* L., no se registran hilos que conectan granos de polen, sin embargo si se encuentran presentes en 13 especies de *Rhododendron* L., lo que sugiere que la agregación extensiva de granos de polen es probablemente un rasgo derivado para Ericaceae (Song et al. 2019). En *Pseuduvaria* spp. se propone que los hilos forman parte de un mecanismo para mejorar la eficacia de la polinización, al permitir la fecundación de múltiples óvulos tras una única visita del polinizador, pero que no es un carácter taxonómico debido a que se encuentra presente de manera esporádica entre las especies del género (Su y Saunders 2003). Por su parte, en *Gymnocalycium* constituyen un carácter taxonómico que apoya la monofilia del género, aunque sería interesante realizar más estudios para dilucidar posibles funciones o ventajas que puedan proporcionar los hilos que conectan granos de polen durante la polinización.

ORBÍCULAS

La presencia de orbículas se ha reportado en las cuatro especies de *Gymnocalycium* estudiadas: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. Schroederianum* y *G. spegazzinii*, siendo este el primer informe de orbículas en todo el género. Al igual que los hilos que conectan los granos de polen, las orbículas tienen su origen en el tapete secretor. Estas estructuras se encuentran presentes en 72 familias de angiospermas y 314 especies, aunque su función aún es desconocida, sin embargo podrían estar relacionadas con el tipo de polinización (Galati et al. 2011). Si bien la caracterización de los polinizadores efectivos de varias especies de *Gymnocalycium* aún no está investigada, se ha reportado que *G. saglionis* es polinizada por abejas y avispas (Gorostiague 2016), mientras que las características florales morfológicas en *G. schickendantzii*, *G. Schroederianum* y *G. spegazzinii*, de acuerdo a Faegri y van der Pijl (1979), indican que también se tratan de especies melítófilas. Todas las especies estudiadas presentan orbículas circulares a subcirculares, de superficie lisa. Estas características también se encuentran en otras especies melítófilas de angiospermas como *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, Malvaceae y *Jacaranda mimosifolia* D. Don, Bignoniaceae (Galati et al. 2011). Una hipótesis acerca de la función de las orbículas es que las mismas estarían relacionadas con la dispersión del polen, brindando una superficie de la que pueden desprenderse fácilmente (Galati et al. 2011). Por otro lado, las orbículas tienen un valor taxonómico en algunas familias de angiospermas. En Rubiaceae, han sido ampliamente estudiadas, presentando distintos morfotipos de orbículas de valor taxonómico a nivel de tribu y género (Nuñez-Florentin et al. 2023). Por su parte, en Cactaceae, han sido escasamente abordadas: en *Pterocactus* spp. (subfamilia Opuntioideae), se han visto orbículas esféricas a subesféricas de superficie lisa (Gotelli et al. 2009), que coinciden con las características de *Gymnocalycium* aquí documentadas, por lo que sería interesante determinar la presencia y características de orbículas en las distintas subfamilias de Cactaceae, para determinar su valor taxonómico.

GRANOS DE POLEN

Las características palinomórficas brindan valiosa información sobre las tendencias evolutivas y la determinación filogenética de los grupos de angiospermas. En la mayoría de las familias, los granos de polen presentan una similitud general proporcional al grado de interrelación dentro del grupo (Wodehouse 1928; Walker y Doyle 1975). En particular, en Cactaceae, existen tres tendencias palinomórficas de

acuerdo con Leuenberger (1976): (1) en Pereskioideae los granos son colpados, punteados a foveolados con espínulas de diferente tamaño, las perforaciones del tectum son en forma de cráter; (2) Opuntioideae constituye un grupo heterogéneo con granos poliporados y con exinas de diversas esculturas de acuerdo al género; (3) en Cactoideae las características de la exina son constantes entre las tribus, con espínulas más pequeñas en los grupos que probablemente sean más especializados, el tipo dominante de perforación es en forma de cráter, a partir de la cual se habría originado la exina finamente punteada y la exina reticulada de manera independiente tanto en Norteamérica como en Sudamérica. Dentro de Cactoideae, se cuenta con algunas descripciones polínicas más modernas: en *Mammillaria* Haw., con granos tricolpados reticulados (Sánchez y Vázquez-Santana 2018), en especies del género *Arthrocereus* A. Berger con granos 3-6 colpados microequinados (Gonzaga et al. 2019), en *Monvillea* Britton & Rose y *Cereus* Mill. con granos grandes tricolpados con tectum microperforado con engrosamientos anulares, microequinados (Lattar y Cuadrado 2010) y, pertenecientes a la tribu Trichocereeae, en los géneros *Browningia* Britton & Rose, *Cleistocactus* Lem., *Copiapoa* Britton & Rose, *Corynocactus* Britton & Rose, *Denmoza* Britton & Rose, *Echinopsis* Zucc., *Eulychnia* Phil., *Eriosyce* Phil., *Haageocereus* Backeb. y *Oreocereus* (A. Berger) Riccob. con granos tricolpados microequinados (Lattar y Cuadrado 2010; Miesen et al. 2015). Por lo tanto, dentro de la tribu Trichocereeae se observa una notable tendencia a que los granos de polen sean tricolpados microequinados, como es el caso de las especies estudiadas en el presente trabajo. Este carácter podría apoyar la monofilia de la tribu. Escasas descripciones se han realizado sobre los granos de polen en especies de *Gymnocalycium* (Meregali et al. 2002) los mismos apuntan, junto con los resultados obtenidos en este trabajo, a que *Gymnocalycium* es un género estenopalínico con unidades polínicas liberadas en móndades, trizonocolpadas, con exina finamente punteada, microespinulada, solo con ligeras diferencias en los tamaños de los granos de polen y en la longitud de las espínulas.

NECTARIOS FLORALES

Las cuatro especies de *Gymnocalycium* estudiadas presentan cámaras nectaríferas, este es el tipo de nectario floral más común en la familia Cactaceae (Bernardello 2007; González et al. 2021). Las características de la cámara nectarífera de las especies analizadas, concuerdan con lo observado en *Gymnocalycium bruchii* (Delbón et al. 2023). Por otro lado, la presencia de tricomas epidérmicos también ha sido reportada en otros géneros de Cactoideae (Stefano, 2001; Almeida et al. 2010; González et al. 2021), sin embargo esta es la primera vez que se reporta para toda la familia la presencia de tricomas pluricelulares ramificados en *G. spegazzinii* y *G. schickendantzii*. Según Neppi (2007), los tricomas epidérmicos podrían tener una función secretora y estar involucrados en un tipo de secreción mixta. En el caso de las especies estudiadas, además de tricomas secretores se ha visto la presencia de nectarostomas. Para corroborar la posibilidad de un tipo de secreción mixta, será necesario realizar estudios de ultraestructura de los tejidos nectaríferos que permitan dilucidar secreción a través de tricomas epidérmicos. La presencia de nectarostomas ha sido previamente reportada en otras especies de la familia: *Strombocactus* Britton & Rose, *Cleistocactus* Lem., *Denmoza* Britton & Rose, *Echinopsis* Zucc., y en especies de las tribus Hylocereeae y Rhipsalideae (Camacho-Velázquez et al. 2019; González et al. 2021; Almeida et al. 2013). Sin embargo, en algunas especies, en las que no se han registrado estomas, se sugiere que el néctar se secreta a través de la epidermis directamente por fisuras en *Polaskia chende* (Rol.-Goss.) A.C. Gibson & K.E. Horak o mediante poros en *P. chichipe* (Rol.-Goss.) Backeb. (Gudiño et

al. 2015). Se piensa que las abejas, equipadas con un raspador de cerdas, fuerzan los aceites a través de poros en la cutícula (Simpson y Neff 1981; Stefano et al. 2001). En *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose, no se han registrado poros o estomas, por lo que se sugiere que el néctar es liberado por ruptura de las células epidérmicas debido a la acción mecánica de los polinizadores (Stefano et al. 2001). En cuanto a las pruebas histoquímicas, las cuatro especies estudiadas muestran caracteres conservados. Los estudios histoquímicos de los nectarios florales son escasos en la familia, sin embargo, se encontraron ligeras diferencias con otras especies. En *Strombocarpus*, no se encontraron lípidos de reserva y almidón, aunque se destaca la presencia de proteínas y componentes céreos en los tricomas (Camacho-Velázquez et al. 2019). Mientras que en *Polaskia chende*, *P. chichipe* y *Stenocereus quevedoni* (J.G. Ortega) Buxb. se encontraron reservas de almidón y polisacáridos insolubles en el tejido nectarífero, con diferencias de concentraciones entre las tres especies (Gudiño et al. 2015).

CONCLUSIÓN

El estudio embriológico de *G. schroederianum* ha permitido identificar dos morfotipos florales: flores morfológicamente perfectas pero con esterilidad masculina, y flores morfológica y funcionalmente perfectas y protándricas. Sin embargo, serán necesarios estudios ecológicos y anatómicos que abarquen diferentes poblaciones, junto a estudios minuciosos de la esporogénesis y gametogénesis comparativamente, para confirmar la ginodioecia o eventual ginomonoecia o dioecia en la especie. Que una especie presente unisexualidad, ya sea morfológica o fisiológica, implica que para su reproducción sexual se ven obligadas a la alogamia, lo que la vuelve fuertemente dependiente de sus polinizadores. Estos hallazgos tienen fuertes repercusiones en la conservación de las especies, debido a que en ambientes degradados o antropizados, la diversidad de polinizadores se puede ver gravemente afectada. Por lo tanto, los esfuerzos de conservación deberán ser mayores en las especies unisexuales fuertemente dependientes de sus polinizadores.

Se ha reportado un nuevo tipo de esterilidad masculina para Cactaceae, donde la microsporogénesis llega hasta el estadío de granos de polen, pero las células de la pared anteral presentan una notable degeneración, y al momento en que el tapete finalmente se desintegra, el citoplasma de los granos de polen colapsa. Por otro lado, este tipo de descubrimientos resaltan las pocas investigaciones morfoanatómicas y embriológicas dentro de la familia, debido a que gradualmente se van registrando más casos de unisexualidad, lo que podría indicar que sea un fenómeno más extendido de lo que tradicionalmente se pensaba. Además, se han reportado nuevas características anatómicas para la familia, como la presencia de tricomas pluricelulares ramificados en las cámaras nectaríferas de *G. spegazzinii* y *G. schickendantzii*, y nuevos reportes como la presencia de orbículas, nunca antes citadas para el género *Gymnocalycium*. Las características de las orbículas podrían estar relacionadas con el tipo de polinización melítófilo, que se infiere que poseen las especies estudiadas de acuerdo a sus características florales. Serán necesarios más estudios sobre la presencia de orbículas en Cactaceae para determinar su valor taxonómico. Las cámaras nectaríferas presentan una notable diferencia de tamaño entre las cuatro especies analizadas, esto podría indicar que las mismas que presentan una cámara nectarífera reducida, como *G. schroederianum*, la secreción de néctar no sea la principal recompensa que ofrecen a sus polinizadores. Para confirmar esta hipótesis es necesario profundizar en los conocimientos sobre la

relación planta-polinizador, para obtener una mejor comprensión. Los caracteres morfoanatómicos relacionados a la biología reproductiva aquí estudiados como la presencia de hilos que conectan granos de polen, orbículas, granos de polen esféricos trizonocolpados punteados microespinulados, las cámaras nectaríferas hipantiales junto con sus características histoquímicas, son caracteres conservados que apoyan la monofilia de *Gymnocalycium*.

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras Valeria González y Stella Solís por introducirme en el mundo de la Anatomía Vegetal y la investigación científica, por ser generosas en sus conocimientos y brindarme apoyo durante tantos meses de trabajo, por enseñarme las técnicas de laboratorio, brindarme material biológico y bibliográfico, ayudarme en la confección de láminas científicas, y sobre todo por la buena onda y predisposición.

A Javier E. Florentín y a Felipe L. Menéndez por el material biológico de *Gymnocalycium schroederianum* y las fotografías. A Mariela Nuñez Florentín, Laila M. Miguel y Tomás Larroquette por su ayuda en las técnicas palinológicas.

A Rocío Retamozo por el hermoso diseño de la carátula.

A mis padres Daniela y Javier, abuelos y familia por el incommensurable apoyo durante los años de carrera. A mis amigos Brenda, Lourdes, Paula, Fran, Lucila, Eli, Sofia, Lucas, Mel, Flor y Mili por la contención y sostén que me brindaron en tiempos difíciles. A las amistades que formé durante los años de carrera, sobre todo a Cami, Felipe, Judit y Juan por la ayuda con las materias difíciles y las tantas tardes de estudio. A Griselda por las oportunidades que me brindó.

A Tommy, Ágata, Mini, Simón y todas mis mascotas, por el cariño y la compañía de todos los días a lo largo de la carrera.

BIBLIOGRAFÍA

- Agüero J.I., Galati B.G. y Torreta J.P. 2018. Structure and ultrastructure of floral nectaries of two *Opuntia* species (Cactaceae) in relation to their floral visitors. *Plant Systematic and Evolution*, 304: 1057-1067.
- Almeida O.J.G., Sartori-Paoli A.A. y Souza L.A.D. 2010. Morfo-anatomía de la flor de *Epiphyllum phyllanthus* (Cactaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81: 65-80.
- Almeida O.J.G., Sartori-Paoli A.A. y Cota-Sánchez J.H. 2012. A macro- and micromorphological survey of floral and extrafloral nectaries in the epiphytic cactus *Rhipsalis teres* (Cactoideae: Rhipsalideae). *Flora*, 207: 119-125.
- Almeida O.J.G., Cota-Sánchez J.H. y Sartori-Paoli A.A. 2013. The systematic significance of floral morphology, nectaries, and nectar concentration in epiphytic cacti of tribes Hylocereeae and Rhipsalideae (Cactaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 15: 255-268.
- Anderson E.F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Areces-Mallea A.E. 1992. *Pereskia marcanoi*, a new species of *Pereskia* from Hispaniola. *Brittonia*, 44: 423–428.
- Baker H.G. y Baker I. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 39: 157-166.
- Baker M.A. 2006. A new florally dimorphic hexaploid, *Echinocereus yavapaiensis* sp. nov. (section Triglochidiatus, Cactaceae) from central Arizona. *Plant Systematics and Evolution*, 258: 63-83.
- Baker M.A. y Cloud-Hughes M.A. 2014. *Cylindropuntia chuckwallensis* (Cactaceae), a new species from Riverside and Imperial Counties, California. *Madroño*, 61(2): 231-243.
- Barthlott W. y Hunt D.R. 1993. Cactaceae. En: *Flowering Plants Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 161-197.
- Bello M.G., González F. y Romero de Pérez G. 2002. Morfología del androceo, tapete y ultraestructura del polen de *Siparuna aspera* (Ruiz & Pavón) A.DC. (Siparunaceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 26: 155-167.
- Bernardello G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. En: Nicolson S.W., Nepi M. y Pacini E. (Eds) *Nectaries and nectar*. Springer, Dordrecht. 19-128.
- Boke N.H. 1963. Anatomy and development of the flower and fruit of *Pereskia pititache*. *American Journal of Botany*, 50: 843-858.
- Boke N.H. 1966. Ontogeny and structure of the flower and fruit of *Pereskia aculeata*. *American Journal of Botany*, 53: 534-542.
- Boke N.H. 1968. Structure and development of the flower and fruit of *Pereskia diaz-romeroana*. *American Journal of Botany*, 55: 1254-1260.
- Boke N.H. 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. *BioScience*, 30: 605-610.
- Bravo-Hollis H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 1: 338-340.
- Brown W.H. 1938. The bearing of nectaries on the phylogeny of flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 79: 549-595.
- Buchmann S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 343-369.
- Camacho-Velázquez A., Arias S., Márquez-Guzmán J. y Vázquez-Santana S. 2019. The structure of nectaries in the genus *Strombocactus* (Cactaceae). *Botanical Science*, 97: 100-109.

- Charles G. 2009. *Gymnocalycium* in habitat and culture. Published by the author, Ketton, Standford, UK.
- Cisneros A., Benega Garcia R. y Tel-Zur N. 2011. Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). Flora, 206: 1076-1084.
- Cocucci A.A. y Vogel S. 2001. Oil producing species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) and their pollination by oil-collecting bees in subtropical South America. Flora, 196: 26-46.
- Cruden R.W. y Jensen K.G. 1979. Viscin threads, pollination efficiency and low pollen-ovule ratios. American Journal of Botany, 66(8): 875-879.
- Delbón N.E., Aliscioni N.L., Lorenzati M., García S., Singer R.B. y Gurvich D.E. 2023. Looking for non-hermaphrodite cacti: multidisciplinary studies in *Gymnocalycium bruchii* endemic to central Argentina. Plant Reproduction, 1-14.
- Del Castillo R. y González-Espinosa M. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). Agrociencia, 71: 185–196.
- Delgado-Ramírez V., Camacho-Velázquez A. y Vázquez-Santana S. 2021. Biología reproductiva de *Thelocactus leucacanthus* ssp. *schmollii* (Cactaceae), un cactus microendémico de Querétaro, México. Botanical Sciences, 99(4): 791-806.
- Demaio P.H., Barfuss M.H.J., Kiesling R., Till W. y Chiapella J.O. 2011. Molecular phylogeny of *Gymnocalycium* (Cactaceae): assessment of alternative infrageneric systems, a new subgenus, and trends in the evolution of the genus. American Journal Botany, 98: 1841- 1854.
- Demarco D. 2017 Histochemical Analysis of Plant Secretory Structures. Methods in Molecular Biology, 1560: 313-330.
- Díaz L. y Cocucci A.A. 2003. Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. Plant Biology, 5(5): 531-539.
- Dickison W.C. 1993. Floral anatomy of the Styracaceae, including observations on intraovarian trichomes. Botanical Journal of the Linnean Society, 112: 223-255.
- Durkee L.T. 1983. The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. En: Bentley B. y Elias T. (Eds) The biology of nectaries. Columbia University Press, New York. 1-29.
- Edwards E.J., y Ogburn R.M. 2012. Angiosperm responses to a low-CO₂ world: CAM and C4 photosynthesis as parallel evolutionary trajectories. International journal of plant sciences, 173(6): 724-733.
- Erdtman G.1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. New York.
- Faegri K. y van der Pijl L.1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, London, UK.
- Fahn A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. New Phytologist, 108: 229-257.
- Fenster C.B., Armbruster W.S., Wilson P., Dudash M.R. y Thomson J.D. 2004 Pollination syndromes and floral specialization. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 35: 375-403.
- Fleming T.H., Maurice S., Buchmann S.L. y Tuttle M.D. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). American Journal of Botany, 81(7): 858-867.
- Flores-Rentería L., Orozco-Arroyo G., Cruz-García F., García-Campusano F., Alfaro I. y Vázquez-Santana S. 2013. Programmed cell death promotes male sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). Annals of Botany, 112(5): 789-800.
- Fuentes-Pérez M., Terrazas T. y Arias S. 2009. Anatomía floral de cinco especies de *Opuntia* (Opuntioideae, Cactaceae) de México. Polibotánica, 27: 89-102.

- Galati B.G., Gotelli M.M., Rosenfeldt S., Torretta J.P. y Zarlavsky G. 2011. Orbicules in relation to the pollination modes. En: Kaiser B.J. (ed.) Pollination: Mechanisms, Ecology and Agricultural Advances, 149-164.
- Gibson A.C. y Nobel P.S. 1986. The cactus primer. Harvard University Press.
- Giorgis M.A., Cingolani A.M. y Gurvich D.E. 2015. Flowering phenology, fruit set and seed mass and number of five coexisting *Gymnocalycium* (Cactaceae) species from Córdoba mountain, Argentina. The Journal of the Torrey Botanical Society, 142(3): 220-230.
- Gonzaga D.R., de Souza M.A., Neto L.M., Peixoto A.L., Mendonça C.B.F. y Goncalves-Esteves V. 2019. The systematic value of pollen morphology in *Arthrocereus* A. Berger (Cactaceae, Cactoideae). Review of Palaeobotany and Palynology, 269: 33-41.
- González A.M. y Cristóbal C.L. 1997. Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteris ihotzkyana* (Sternuliaceae). Bonplandia, 9: 287-294.
- González V.V. 2020. La estructura floral en la familia Cactaceae: diversidad y evolución en la tribu Trichocereeae. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste.
- González V.V., Gorostiague P., Ortega-Baes P., Galati B.G. y Ferrucci M.S. 2021. Nectary structure is not related to pollination system in Trichocereeae cactus from Northwest Argentina. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 93: 1-20. DOI10.1590/0001-3765202120201401
- González V.V., Zini L.M., Ortega-Baes P. y Ferrucci, M.S. 2023. Gynoecium structure and pollen tube pathway in the cactus family with emphasis on tribe Trichocereeae (Cactaceae: Cactoideae). Botanical Journal of the Linnean Society, 202(2): 166-180.
- Gorostiague P. 2016. Las cactáceas y sus polinizadores en el Noroeste de Argentina: distribución geográfica, cambio climático y conservación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Universidad Nacional de La Plata.
- Gotelli M.M., Scambato A., Galati B., y Kiesling R. 2009. Pollen development and morphology in four species of *Pterocactus* (Cactaceae). Annales Botanici Fennici, 46(5): 409-415.
- Gudiño W., Márquez-Guzmán J. y De La Barrera E. 2015. Structural implications for nectar secretion by nectaries of three columnar cacti. Maejo International Journal of Science & Technology, 9: 156-164.
- Guerrero P.C., Majure L.C., Cornejo-Romero A. y Hernández-Hernández T. 2019. Phylogenetic Relationships and Evolutionary Trends in the Cactus Family. Journal of Heredity, 110: 4-21
- Halbritter H. y Till W. 1996. Morphologie und Feinstrukturen des Pollens von *Gymnocalycium*. *Gymnocalycium*, 9: 1-22.
- Halbritter H., Hesse M. y Buchner R. 1997. Pollen-connecting threads in *Gymnocalycium* (Cactaceae): Their origin, function, and systematic relevance. Grana, 36(1): 1-10.
- Hernández-Cruz R., Barrón-Pacheco F., Sánchez D., Arias S. y Vázquez-Santana S. 2018. Functional dioecy in *Echinocereus*: ontogenetic patterns, programmed cell death, and evolutionary significance. International Journal of Plant Sciences, 179(4): 257-274.
- Hernández-Cruz R., Silva-Martínez J., García-Campusano F., Cruz-García F., Orozco-Arroyo G., Alfaro I. y Vázquez-Santana S. 2019. Comparative development of staminate and pistillate flowers in the dioecious cactus *Opuntia robusta*. Plant Reproduction, 32: 257-273.

- Hernandez-Hernandez T., Brown J.W., Schlumpberger B.O., Eguiarte L.E. y Magallón S. 2014. Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist*, 202: 1382-1397.
- Hoffman M.T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): breeding system, sex ratios, and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany*, 79(12): 1382-1388.
- Hunt D. 2006. The new cactus lexicon. DH Books, Milborne Port, UK. 373-526.
- Janczur M.K., León S.H.J., Solache R.L.T., Mendoza R.C.H., Oro Cerro M.d.C., Mariezcurrena B.M.D., Rivas M.I.V., Manjarrez J.J.L., Villareal B. y Czarnoleskie M. 2014. Chemical and physical defense traits in two sexual forms of *Opuntia robusta* in Central Eastern Mexico. *PLoS One* 9 (3), e89535. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089535>.
- Jiménez-Durán K., Arias-Montes S., Cortés-Palomec A. y Márquez-Guzmán J. 2014. Embryology and seed development in *Pereskia lynchidiflora* (Cactaceae). *Haseltonia*, 19: 3-12.
- Johansen D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. New York.
- Johri B.M., Ambegaokar K.B. y Srivastava P.S. 2013. Comparative embryology of angiosperms vol. 1/2 (Vol. 1). Springer Science & Business Media. 1221 pp.
- Kiesling R. 1975. Los géneros de Cactaceae de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 16: 197-227.
- Kiesling R. 2005. Cactaceae. En Burkart A. y Bacigalupo N.M. (eds.). *Flora Ilustrada de Entre Ríos* (Argentina), 4(5): 440-44.
- Kiesling R. y Ferrari O. 2005. 100 Cactus Argentinos. Editorial Albatros, Buenos Aires, Argentina.
- Kiesling R., Saravia M., Oakley L., Muruaga N., Metzing D. y Novara L. 2011. Cactaceae Juss. En: *Flora del Valle de Lerma*, Buenos Aires. 10: 177-4400.
- Kimnach M. 1982. *Selenicereus innesii*, an aberrant new species from the West Indies [Caribbean]. *Cactus and Succulent Journal (USA)*, 54: 3-7.
- Lattar E.C. y Cuadrado G. 2010. Estudios palinológicos de especies de los géneros *Cereus*, *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis* y *Monvillea* (Cactaceae, Cactoideae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 45(1-2): 93-107.
- Leuenberger B.E. 1976. Pollen morphology of the Cactaceae: An SEM-Survey of exine sculpturing and its tentative implications for taxonomy and phylogeny. *The Cactus and Succulent Journal of Great Britain*, 38(4), 79-94.
- Leuenberger B.E. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 41: 1–141.
- Lindsay G. y Dawson E.Y. 1952. Mammillarias of the islands off northwestern Baja California, Mexico. *Cactus and Succulent Journal US*, 24: 76-84.
- Luque R., Sousa H.C. y Kraus J.E. 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) modificado- E Kropp (1972), visando a substituição do Azul de Astra por Azul de Alcião 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica*, 10: 199-212.
- Madujano M.D., Carrillo-Angeles I., Martínez-Peralta C. y Golubov J. 2010. Reproductive biology of Cactaceae. En: *Desert plants: biology and biotechnology*, 197-230.
- Martínez-Peralta C., Molina-Freaner F., Golubov J., Vázquez-Lobo A. y Mandujano M.C. 2014. A comparative study of the reproductive traits and floral morphology of a genus of geophytic cacti. *International Journal of Plant Sciences*, 175(6): 663-680.

- Metzing D., Meregalli M. y Kiesling R. 1995. An annotated checklist of the genus *Gymnocalycium* Pfeiffer ex Mittler (Cactaceae). *Allionia*, 33: 181-228.
- Meregalli M., Metzing D., Kiesling R., Tosatto S. y Caramiello R. 2002. Systematics of the *Gymnocalycium paraguayense-fleischerianum* group (Cactaceae): morphological and molecular data. *Candollea*, 57(2): 299-315.
- Miesen F., De Porras M.E. y Maldonado A. 2015. Pollen morphology of Cactaceae in Northern Chile. *Gayana Botánica*, 72(2): 258-271.
- Nassar J.M., Ramirez N. y Linares O. 1997. Comparative pollination biology of Venezuelan columnar cacti and the role of nectar-feeding bats in their sexual reproduction. *American Journal of Botany*, 84: 918-927.
- Neff J.L. y Simpson B.B. 2005. Other rewards: oils, resins, and gums. En: Dafni A., Kevan P.G. y Husband B.C. (Eds.) Practical pollination biology. Ontario, Enviroquest. 314-328.
- Nepi M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. En: Nicolson S.W., Nepi M. y Pacini E. (eds.) Nectaries and Nectar. Springer, 129-166.
- Nuñez-Florentin M., Verstraete B., Salas R.M., y Dessein S. 2023. Insights into the morphology and evolution of orbicules in the Spermacoce clade (Spermacoeeae-Rubiaceae) and implications for systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 203(3): 253-270.
- Núñez-Mariel C., Engleman E. M. y Márquez-Guzmán J. 2001. Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae). *Botanical Sciences*, 68: 5-13.
- Núñez M.C. 2004. Cactáceas columnares de México: estudio embriológico comparativo de cinco especies de la tribu Pachycereeae. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Nyffeler R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences. *American Journal of Botany*, 89(2): 312-326.
- Oliveira E.J., Koehler A.D., Rocha D.I. et al. 2017. Morpho-histological, histochemical, and molecular evidences related to cellular reprogramming during somatic embryogenesis of the model Grass *Brachypodium distachyon*. *Protoplasma*, 254: 2017–2034.
- Orozco A.G. 2002. Sistemas reproductivos de *Opuntia stenopetala* Engelmann (Cactaceae). Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ortega-Baes P., y Godínez-Alvarez H. 2006. Global diversity and conservation priorities in the Cactaceae. *Biodiversity & Conservation*, 15: 817-827.
- Ortega-Baes P., Sühring S., Sajama J., Sotola E., Alonso-Pedano M., Bravo S. y Godínez-Alvarez H. 2010. Diversity and conservation in the cactus family. En: Ramawat KG (Ed.) Desert plants: Biology and Biotechnology. Springer, 157-173.
- Pandey A.K. 2022. Reproductive Biology of Angiosperms. 1 ed. CRC Press. 362 pp.
- Pilbeam J. 1995. *Gymnocalycium*. A collector's guide. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Pimienta-Barrios E. y del Castillo R.F. 2002. Reproductive biology. En: Nobel P.S. (Ed.) Cacti: biology and uses. University of California Press, Berkeley, 75-90.
- Punt W., Hoen P.P., Blackmore S., Nilsson S. y Le Thomas A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology*, 143: 1-81.
- Ramadoss N., Orduño-Baez A., Portillo C., Steele S., Rebman J. y Flores-Rentería L. 2022. Unraveling the development behind unisexual flowers in *Cylindropuntia wolfii* (Cactaceae). *BMC Plant Biology*, 22(1): 94.
- Rasband W.S. 1997-2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.net/ij/>

- Rebman J. 1998. A new cholla (Cactaceae) from Baja California, México. *Haseltonia*, 6: 17–21.
- Rebman J. y Pinkava D. 2001. *Opuntia* cacti of North America- an overview. *Florida Entomologist*, 84: 474–483.
- Rivera-Marchand B. y Ackerman J.D. 2006. Bat Pollination Breakdown in the Caribbean Columnar Cactus *Pilosocereus royenii*. *Biotropica*, 38(5): 635-642.
- Rocha D.I., Vieira L.M., Koehler A.D. y Otoni W.C. 2018. Cellular and morpho-histological foundations of in vitro plant regeneration. In *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, New York. 47-68.
- Ross R. 1981. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany*, 68(4): 463-470.
- Sánchez D., Arias S. y Terrazas T. 2013. Análisis morfométrico de las especies de *Echinocereus* sección Triglochidiati (Cactaceae) en México. *Brittonia*, 65: 368-385.
- Sánchez D. y Vázquez-Santana S. 2018. Embryology of *Mammillaria dioica* (Cactaceae) reveals a new male sterility phenotype. *Flora*, 241: 16-26.
- Santos T.V.A., Araújo D.O.A., Coelho P., Dórea M.D.C., Dos Santos F.D.A.R., Leite K.R.B. y Oliveira R.P. 2016. Micromorphological features revealing two new species of *Portulaca* (Portulacaceae) from Brazil, segregated from *P. hirsutissima*. *Phytotaxa*, 270: 103-115.
- Silva M.J. 2007. Embriología de *Opuntia robusta* Wendland (Cactaceae) Tesis de grado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Simpson B.B. y Neff J.L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 68: 301-322.
- Simpson M.G. 2006. Plant Systematics. Elsevier Academic Press. 590 pp.
- Smets E.F., Ronse De craene L.P., Caris P. y Rudall P.J. 2000. Floral nectaries in monocotyledons: distribution and evolution. En: Wilson K.L. y Morrison D.A. (Eds) *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO Publishing, Collingwood, Vic. 230-240.
- Solís S.M., Zini L.M., González V.V. y Ferrucci M.S. 2017. Floral nectaries in Sapindaceae ss: morphological and structural diversity, and their systematic implications. *Protoplasma*, 254: 2169-2188.
- Song Y.P., Huang Z.H. y Huang S.Q. 2019. Pollen aggregation by viscin threads in *Rhododendron* varies with pollinator. *New Phytologist*, 221(2): 1150-1159.
- Stefano M., Papin A., Andalò C. y Brighigna L. 2001. Ultrastructural aspects of the hypanthial epithelium of *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose (Cactaceae). *Flora*, 196: 194-203.
- Strittmatter L., Negrón-Ortiz V. y Hickey R.J. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany*, 89: 1373-1387.
- Strittmatter L., Negrón-Ortiz V. y Hickey R.J. 2006. Comparative microsporangium development in male fertile and male sterile flowers of *Consolea* (Cactaceae): When and how does pollen abortion occur. *Grana*, 45: 81-100.
- Strittmatter L., Hickey R.J. y Negrón-Ortiz V. 2008. Heterochrony and its role in sex determination of cryptically dioecious *Consolea* (Cactaceae) staminate flowers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 156: 305-326.
- Su Y.C. y Saunders R.M. 2003. Pollen structure, tetrad cohesion and pollen-connecting threads in *Pseuduvaria* (Annonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143(1): 69-78.
- Vázquez-Sánchez M., Terrazas T. y Arias S. 2012. El hábito y la forma de crecimiento en la tribu Cacteae (Cactaceae, Cactoideae). *Botanical Sciences*, 90(2): 97-108.

- Vidal B.C. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xyliidine-Ponceau 2R. *Annales d'histochimie*, 15:289–296.
- Walker J.W. y Doyle J.A. 1975. The Bases of Angiosperm Phylogeny: Palynology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62(3): 664-723.
- Wang H., Barrett S.C., Li X.Y., Niu Y., Duan Y.W., Zhang Z.Q. y Li Q.J. 2020. Sexual conflict in protandrous flowers and the evolution of gynodioecy. *Evolution*, 75(2): 278-293.
- Wodehouse R.P. 1928. The phylogenetic value of pollen-grain characters. *Annals of Botany*, 42(168): 891-934.
- Zandonella P. 1977. Apports de l'étude comparée des nectaires floraux à la conception phylogénétique de l'ordre des Centrospermales. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 90: 105-125.

ANEXO

Anexo. Tabla 1. Medidas de granos de polen de *G. saglionis*.

Medidas µm / <i>G. saglionis</i>	Eje polar	Eje ecuatorial	Espesor de pared
1	45,103	47,703	1,9
2	41,203	40,122	2
3	45,988	44,363	2,4
5	43,561	42,211	1,2
6	44,971	47,855	1,5
7	46,652	46,916	2,6
8	47,873	45,600	1,9
9	49,763	45,610	2,7
10	46,842	43,962	1,8
11	48,231	45,806	1,9
12	46,623	43,371	1,9
13	47,346	45,995	2,5
14	49,248	50,186	2,3
15	48,901	43,679	2,1
16	46,157	46,318	2,2
17	48,745	45,607	3,1
18	47,350	45,579	1,3
20	48,386	49,002	2,2
21	48,787	45,673	1,3
22	49,544	48,471	1,7
23	49,841	50,934	1,5
24	47,459	47,072	2,4
25	48,447	44,088	3
2'	48,672	44,347	1,3

Anexo. Tabla 2. Medidas de granos de polen de *G. schickendantzii*.

Medidas µm / <i>G. schickendantzii</i>	Eje polar	Eje ecuatorial	Espesor de la pared
1	46,173	43,910	2,1
3	44,683	42,836	2
4	46,398	45,400	1,9
5	43,024	43,839	1,9
6	41,948	45,677	1,6
7	50,757	48,528	2,2
8	40,119	37,759	1,6
9	44,083	45,613	2,4
10	45,580	43,125	1,7
11	45,449	43,743	1,5
12	44,363	42,667	1,5

13	46,236	44,083	1,2
14	43,572	44,374	1,5
15	43,637	45,595	1
16	43,096	44,386	1,7
17	41,575	43,558	1
18	45,183	45,763	2
19	44,322	46,192	1
20	44,348	45,794	1
21	47,327	46,795	2
22	45,461	45,483	2,2
23	44,554	43,188	2
24	46,990	44,311	1,3
26	43,711	44,184	1,6
27	44,311	40,933	1,3

Anexo. Tabla 3. Medidas de granos de polen de *G. schroederianum*.

Medidas µm / <i>G.</i> <i>schroederianum</i>	Eje polar	Eje ecuatorial	Espesor de la pared
1	47,475	43,989	1,6
2	47,507	47,941	1,5
3	45,795	46,679	1,7
4	52,176	50,671	2,1
6	46,373	44,500	1,1
7	46,510	46,106	2,1
8	47,383	47,122	2
9	45,959	44,283	2
10	48,742	50,183	1,7
11	47,838	48,705	2
13	47,474	42,681	2
14	45,212	46,277	2,5
15	46,167	46,099	1,8
16	40,135	39,303	1,9
17	46,279	41,667	2,1
18	50,000	44,283	1,5
19	45,443	45,886	2,1
20	38,092	34,503	2
21	47,091	45,966	1,4
22	47,283	51,701	1,2
23	49,261	45,823	1,8
24	45,081	41,960	1,1
26	47,642	47,425	2,3
27	45,648	45,233	1,9
28	50,894	47,716	2,1

Anexo. Tabla 4. Medidas de granos de polen de *G. spegazzinii*.

Medidas µm / <i>G. spegazzinii</i>	Eje polar	Eje ecuatorial	Espesor de la pared
1	41,223	42,252	2,8
2	43,650	44,922	1,9
3	43,747	43,237	2,3
4	43,265	43,438	1,6
6	45,315	42,261	2,7
7	48,059	50,233	2,3
8	41,261	42,974	2,2
10	43,673	47,627	1,7
11	43,090	42,512	2,3
12	40,852	44,121	1,6
13	42,705	43,893	1,6
14	45,510	44,863	1,9
15	43,095	46,106	1,3
16	45,081	46,386	1,3
18	44,899	45,820	1,8
19	47,242	45,096	1,4
21	48,856	46,729	2,1
22	45,918	42,617	1,5
23	48,470	47,744	2,1
24	41,387	42,017	1,8
25	45,664	44,458	1,5
26	43,486	44,056	1,5
27	43,993	47,077	2
28	43,638	46,980	1,2
29	47,197	48,197	3,3

EVALUACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Alumna: Celeste Belén Pérez

Directora: Dra. Valeria Vanesa González

Codirectora: Dra. Stella Maris Solís

Tema: "Caracterización morfoanatómica en diferentes aspectos de la biología reproductiva del género *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler (Cactaceae)"

El desarrollo de este trabajo de investigación se llevó a cabo en el marco de una Beca de Pregrado de la SGCyT de la Universidad Nacional del Nordeste, período 2023-2024 ("Caracterización morfoanatómica en diferentes aspectos de la biología reproductiva del género *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler (Cactaceae)". Res. 1011/22)

Durante el desarrollo de la misma, la alumna mostró mucho interés y gran dedicación. El trabajo realizado implicó el manejo de las técnicas histológicas, histoquímicas y palinológicas estandarizadas más importantes para realizar estudios anatómicos. La alumna manejó bibliografía específica, tanto obras clásicas como trabajos actualizados, la mayoría en inglés. Cabe destacar que se interiorizó e incorporó conocimientos sobre softwares que le permitieron realizar mediciones y láminas que acompañan la investigación.

Se destaca que la alumna Celeste Pérez, logró presentar algunos de los resultados obtenidos en su Trabajo Final de Graduación en recientes Reuniones Científicas Nacionales.

Presentaciones en Reuniones Científicas:

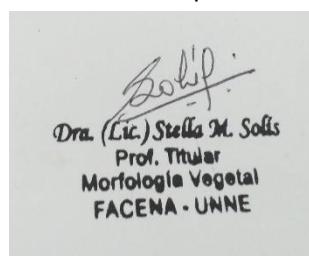
- 2023. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. "Morfo-anatomía e histoquímica de nectarios florales en especies selectas del género *Gymnocalycium* (Cactaceae). Autores: Pérez C.B., Solís S.M. y González V.V.
- 2023. Jornadas argentinas de Botánica. "Nectarios florales en especies melítófilas de cactus: estructura e histoquímica en cuatro taxones de *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler". Autores: Pérez, C.B., Solís S.M. y González V.V.

Para finalizar, consideramos que los objetivos oportunamente propuestos en el plan de Trabajo final de Graduación, se han cumplido satisfactoriamente. Los resultados de esta tesis serán publicados en el transcurso del próximo año.



Valeria Vanesa González

.....
Directora de TFG



.....
Codirectora de TFG

EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR REALIZADA

Durante la realización del presente Trabajo Final de Graduación consulté la bibliografía específica disponible en el Instituto de Botánica del Nordeste y en la biblioteca electrónica de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación, además de consultar trabajos científicos, libros, tesis de grado y doctorales disponibles en Internet.

Mi lugar de trabajo fue el laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto de Botánica del Nordeste, UNNE-CONICET, donde he realizado múltiples cortes histológicos seriados, en sección transversal y longitudinal de botones florales de las especies estudiadas. Los mismos fueron montados y coloreados siguiendo técnicas convencionales. Las observaciones exomorfológicas las realicé con microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incluida. Las observaciones histológicas las realicé con microscopio óptico binocular Leica DM LB2 y microscopio óptico binocular Olympus BX 50F, ambos con cámara clara y cámara digital incluida. Las observaciones con Microscopio electrónico de barrido (MEB) se realizaron en el servicio de Microscopía Electrónica del IBONE. Para cumplir con los objetivos del presente TFG utilicé botones y flores fijados en FAA de cuatro especies del género *Gymnocalycium*: *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. Schroederianum* y *G. spegazzinii*. He realizado descripciones morfoanatómicas de la ontogenia del microsporangio y microsporogénesis en *G. schroederianum*. Además, he realizado descripciones de la morfología de las orbículas, unidades polínicas, y descripciones morfoanatómicas e histoquímicas de las cámaras nectaríferas de las cuatro especies estudiadas. Las mediciones de granos de polen se realizaron con ImageJ. Las láminas se realizaron con Photoshop. No se presentaron mayores dificultades durante el desarrollo del TFG.

FINANCIAMIENTO

El presente Trabajo Final de Graduación fue subsidiado por el proyecto SGCyT-UNNE PI N°20-F013. Estudios morfoanatómicos, embriológicos y ecofisiológicos en plantas vasculares americanas. 2021-2024. Unidad académica: Facultad de Ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura. Directora: Dra. Solís, Stella Maris. Resol. N°454/20 C.S.