



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura

“La estructura floral en la familia Cactaceae: diversidad y evolución en la tribu Trichocereeeae”

Lic. Valeria Vanesa González

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la UNNE
en Biología

Dirección

Dra. María Silvia Ferrucci

Dr. Pablo Ortega Baes

Dra. Stella Maris Solís

Corrientes, Argentina

2019

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de doctorado, Dra. María Sílvia Ferruci, por sus consejos y enseñanzas, y por contagiar su entusiasmo, sus ganas, y su amor por el trabajo que hace.

A mi Codirector, Dr. Pablo Ortega Baes, por ofrecerme la oportunidad de trabajar con la familia Cactaceae, y por brindarme su apoyo en cada campaña de colección en la provincia de Salta.

A mi subdirectora, Dra. Stella Maris Solís, por haberme enseñado las técnicas de la anatomía vegetal, y por su acompañamiento en el laboratorio.

A mi familia, Mamá, Papá y Vero, por apoyarme en mi carrera, por alentarme a seguir persiguiendo mis sueños, por estar presentes siempre que los necesité, y acompañarme en viajes y experiencias que esta carrera me ha dado la oportunidad de tener.

A mis amigos y compañeros del IBONE por el excelente compañerismo, y por alentarme y ayudarme cada vez que lo necesité.

A mis amigos del LABIBO (Salta), por facilitarme la vida cada vez que iba de campaña, por la infaltable buena onda y por tantos momentos anecdóticos compartidos.

Trabajos derivados de la tesis

Presentaciones en Reuniones Científicas y Congresos

“Morfo-anatomía floral de *Echinopsis albispinosa*”. Autores: González, V.V., Solís, S.M., Ortega-Baes, P. & Ferrucci, M.S. Resumen publicado en Bol. Soc. Argent. Bot. (Supl.). I Reunión Argentina de Jóvenes Botánicos. Corrientes, 15-18/08/2014. Internet: <http://www.botanicargentina.com.ar>

“*Echinopsis tubiflora* Zucc. Ex. A. Dietr. (Cactaceae): Análisis de los verticilos florales”. Autores: González, Valeria V., Ortega-Baes, Pablo, Ferrucci, María S. XXI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, 3-4/06/2015. Internet: <http://www.unne.edu.ar>

“Morfo-Anatomía floral de tres especies de *Cleistocactus*”. Autores: González, V. V.; Ortega-Baes P.; Ferrucci, M. S. V Congreso Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas. Salta, Argentina, 23-26/09/2015.

"Análisis comparativo de nectarios florales en *Echinopsis* Lem. y *Cleistocactus* Zucc. (Trichocereae, Cactaceae)". Autores: González, V.V.; Ortega-Baes P.; Ferrucci M.S. XXIII Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, 15-16/06/2017. Internet: <http://www.unne.edu.ar>

“Estructura floral de una especie ornitófila: *Denmoza rhodacantha* (Cactaceae)”. Autores: González, V.V.; Ortega-Baes P.; Ferrucci M.S. XXIV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Corrientes, 21-22/06/2018. Internet: <http://www.unne.edu.ar>

“Bauplan floral del género *Cleistocactus* (Cactaceae)”. Autores: González, V.V.; Ferrucci M.S. XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE. Resistencia, 13-14/06/2019. Internet: <http://www.unne.edu.ar>

Índice

Resumen	1
Abstract	3
Capítulo 1. Introducción General	5
Antecedentes	6
La familia Cactaceae Juss.	6
Las flores en Cactaceae	9
Nectarios florales en Cactaceae	11
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	13
Hipótesis	13
Capítulo 2. Materiales y Métodos	14
Materiales	15
Campañas de colección	15
Localidades visitadas	15
Herborización del material	16
Colección de material para obtención de preparados histológicos	16
permanentes	
Especímenes analizados	16
Metodología	19
Técnicas para el análisis exomorfológico de la flor	19
Diafanización de tépalos sepaloideos y petaloideos	19
Morfometría floral	19
Análisis con microscopio electrónico de barrido (MEB)	20
Técnicas histológicas para el análisis anatómico de la flor	20
Preparados permanentes para microscopio óptico (MO)	20
Observaciones	21
Preparados temporarios de diafanización de óvulos para observaciones con	
microscopio de contraste diferencial interferencial (DIC)	21

Preparados temporarios para observar el crecimiento de tubos polínicos con microscopio de fluorescencia -----	21
Análisis con microscopio electrónico de transmisión (MET) -----	22
Mapeo de caracteres florales en base a la filogenia molecular publicada para <i>Echinopsis</i> s.l. y géneros afines -----	22
Ilustraciones -----	23
Capítulo 3. Bauplan floral del género sudamericano <i>Echinopsis</i> (Cactaceae): análisis morfológico y anatómico en siete especies del noroeste argentino -----	24
Introducción -----	25
Resultados -----	29
Morfología floral -----	29
Anatomía floral -----	38
Estructura del nectario floral -----	41
Ultraestructura del nectario floral -----	41
Discusión -----	46
Morfología floral -----	46
Anatomía floral -----	48
Estructura del nectario floral -----	52
Ultraestructura del nectario floral -----	53
Conclusiones -----	54
Capítulo 4. ¿Cuán conservada es la estructura del nectario floral en especies de diferentes géneros polinizadas por aves? -----	55
Introducción -----	56
Resultados -----	59
Morfología floral -----	59
Morfología de la cámara de néctar -----	62
Anatomía de la cámara de néctar -----	62
Epidermis nectarífera y secreción de néctar -----	62
Parénquima nectarífero -----	63
Parénquima subnectarífero -----	64
Vascularización -----	64

Discusión -----	70
Morfología floral -----	70
Morfología de la cámara de néctar -----	71
Anatomía de la cámara de néctar -----	73
Epidermis nectarífera y secreción de néctar -----	73
Parénquima nectarífero -----	73
Vascularización -----	74
Conclusiones -----	75
Capítulo 5. Análisis del androceo en tres especies de <i>Gymnocalycium</i>, con énfasis en la presentación secundaria del polen -----	76
Introducción -----	77
Resultados -----	78
Morfología floral -----	78
Anatomía de los estambres -----	81
Presentación secundaria del polen -----	86
Hilos conectando granos de polen -----	86
Discusión -----	89
Anatomía de los estambres -----	89
Presentación secundaria del polen -----	90
Hilos conectando granos de polen -----	91
Conclusiones -----	93
Capítulo 6. Morfo-anatomía del gineceo y recorrido del tubo polínico en especies de <i>Trichocereae</i> -----	94
Introducción -----	95
Resultados -----	96
Morfo-anatomía del gineceo -----	96
Pericarpelo, ovario y óvulos -----	96
Primer registro en Cactaceae de óvulos con pico nucelar -----	99
Estilo y estigma -----	102
Recorrido del tubo polínico -----	104
Discusión -----	110

Conclusiones -----	114
Capítulo 7. Mapeo de caracteres florales en la filogenia molecular del género	
<i>Echinopsis</i> s.l. y géneros afines -----	115
Introducción -----	116
Resultados -----	118
Discusión -----	134
Conclusiones -----	137
Conclusiones finales -----	138
Bibliografía -----	141

Índice de Figuras y Tablas

Capítulo 1. Introducción General	5
Figura 1. Relaciones intrafamiliares en Cactaceae	6
Figura 2. Esquema de una flor de <i>Echinopsis</i>	11
Capítulo 2. Materiales y Métodos	14
Figura 3. Localidades de colección del material analizado	15
Capítulo 3. Bauplan floral del género sudamericano <i>Echinopsis</i> (Cactaceae): análisis morfológico y anatómico en siete especies del noroeste argentino	24
Figura 4. Especies esfingófilas de <i>Echinopsis</i>	31
Figura 5. Especies melitófilas de <i>Echinopsis</i>	32
Tabla 1. Principales características florales de las especies de <i>Echinopsis</i> estudiadas	33
Tabla 2. Morfometría floral de <i>E. tubiflora</i>	34
Figura 6. Fotomicrografías con microscopio electrónico de barrido (MEB) de diferentes verticilos florales en especies de <i>Echinopsis</i>	35
Figura 7. Fotomicrografías con microscopio estereoscópico de piezas diafanizadas del perigonio de <i>Echinopsis tubiflora</i>	36
Figura 8. Fotomicrografías con microscopio estereoscópico de piezas diafanizadas del perigonio de <i>Echinopsis thionantha</i>	37
Figura 9. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de verticilos florales en secciones transversales de <i>Echinopsis tubiflora</i>	40
Figura 10. Cortes semifinos de secciones transversales del nectario floral de <i>E.</i> <i>terscheckii</i>	42
Figura 11. Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión (MET) de nectario floral en preantesis de <i>E. terscheckii</i>	44
Figura 12. Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión (MET) de nectario floral en antesis floral de <i>E. terscheckii</i>	45
Capítulo 4. ¿Cuán conservada es la estructura del nectario floral en especies de diferentes géneros polinizadas por aves?	55
Figura 13. Morfología floral de flores polinizadas por aves de la tribu Trichocereae	60

Tabla 3. Cuadro comparativo de características anatómicas de nectarios florales, fenotipos florales y biología reproductiva de las especies de la tribu Trichocereae del noroeste argentino analizadas -----	65
Figura 14. Morfo-anatomía del nectario floral en especies de <i>Cleistocactus</i> -----	67
Figura 15. Morfo- anatomía del nectario floral de <i>Denmoza rhodacantha</i> -----	68
Figura 16. Morfo-anatomía del nectario floral de <i>Echinopsis</i> -----	69
Capítulo 5. Análisis del androceo en tres especies de <i>Gymnocalycium</i>, con énfasis en la presentación secundaria del polen -----	76
Figura 17. <i>Gymnocalycium saglionis</i> -----	79
Figura 18. <i>Gymnocalycium schickendantzii</i> -----	80
Figura 19. <i>Gymnocalycium spegazzinii</i> -----	81
Figura 20. Fotomicrografías del androceo de <i>G. saglionis</i> en secciones transversales	83
Figura 21. Fotomicrografías del androceo de <i>G. schickendantzii</i> -----	84
Figura 22. Fotomicrografías del androceo de <i>G. spegazzinii</i> en secciones transversales -----	85
Figura 23. Representación esquemática del androceo en <i>Gymnocalycium</i> -----	87
Figura 24. Fotomicrografía obtenida con microscopio electrónico de barrido (MEB) de granos de polen conectados por hilos en especies de <i>Gymnocalycium</i> -----	88
Capítulo 6. Morfo-anatomía del gineceo y recorrido del tubo polínico en especies de Trichocereae -----	94
Figura 25. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de gineceo en <i>Cleistocactus baumannii</i> -----	97
Figura 26. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de óvulos en especies de la tribu Trichocereae -----	98
Figura 27. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico de óvulos con pico nucelar -----	100
Figura 28. Fotomicrografías obtenidas con microscopio de contraste diferencial interferencial (DIC) de óvulos con pico nucelar -----	101
Figura 29. Representación esquemática del gineceo en Trichocereae -----	102
Figura 30. Recorrido del tubo polínico en <i>Cleistocactus baumannii</i> -----	105
Figura 31. Recorrido del tubo polínico en <i>Denmoza rhodacantha</i> -----	106

Figura 32. Recorrido del tubo polínico en especies de <i>Echinopsis</i> -----	107
Figura 33. Recorrido del tubo polínico en especies de <i>Gymnocalycium</i> -----	108
Figura 34. Recorrido del tubo polínico en <i>Harrisia pomanensis</i> -----	109
Capítulo 7. Mapeo de caracteres florales en la filogenia molecular del género	
<i>Echinopsis</i> s.l. y géneros afines -----	115
Figura 35. Topología de árbol modificada de Schlumberger & Renner (2012), en base a la cual se mapearon los caracteres florales seleccionados -----	120
Tabla 4. Caracteres y estados de caracteres analizados en las especies de Trichocereae -----	121
Figura 36. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	123
Figura 37. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	124
Figura 38. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	125
Figura 39. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	126
Figura 40. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	127
Figura 41. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	128
Figura 42. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis</i> s.l. modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	129

Figura 43. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis s.l.</i> modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	130
Figura 44. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis s.l.</i> modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	131
Figura 45. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis s.l.</i> modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	132
Figura 46. Topología de árbol de la filogenia de <i>Echinopsis s.l.</i> modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia -----	133

RESUMEN

Las cactáceas son un grupo de plantas que se caracterizan por presentar una gran diversidad floral, que ha sido asociada a la polinización por animales. Esta diversidad se ha descrito con base en la forma, el tamaño y el color de las flores, pero pocas veces sustentada con caracteres morfológicos y anatómicos. En esta tesis se estudió la morfoanatomía floral de 19 especies de Cactaceae, que representan a tres clados de la subfamilia Cactoideae que presentan el espectro completo de especializaciones fenotípicas documentadas para el NOA: 1) flores ornitófilas, 2) flores melitófilas y 3) flores esfingófilas. Un total de 17 especies corresponden a la tribu Trichocereae: *Cleistocactus baumannii* (Lem.) Lem., *C. hyalacanthus* (K. Schum.) Rol.-Goss., *C. smaragdiflorus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose, *Echinopsis ancistrophora* Speg., *E. atacamensis* (Phil.) H. Friedrich & G.D. Rowley, *E. aurea* Britton & Rose, *E. haematantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. schickendantzii* F.A.C. Weber, *E. terscheckii* (Parm. ex Pfeiff.) Friedrich & G.D. Rowley, *E. thionantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. tubiflora* (Pfeiff.) Zucc. ex A. Dietr., *Gymnocalycium saglionis* (F. Cels) Britton & Rose, *G. schickendantzii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *G. spegazzinii* Britton & Rose, *Harrisia pomanensis* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Britton & Rose, y *Rebutia minuscula* K. Schum. Como grupo externo se analizaron las flores de *Parodia microsperma* (F.A.C. Weber) Speg. (tribu Browningiaee), y de *Stetsonia coryne* (Salm-Dick) Britton & Rose (tribu Notocactee). Con el objetivo de describir y comparar la estructura floral en Trichocereae en el contexto de la especialización fenotípica floral registrada, se analizaron caracteres morfológicos y anatómicos de los diferentes verticilos florales dentro del linaje, con el propósito de detectar posibles sinapomorfías que apoyen a los diferentes clados y subclados de las clasificaciones moleculares más recientes. En este contexto, se procesaron botones florales en preantesis y flores en antesis, fijadas en FAA, con técnicas convencionales para microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, en algunos taxones con rasgos particulares se emplearon técnicas para observaciones con microscopía electrónica de transmisión y microscopía de contraste de interferencia diferencial. El material analizado proviene de la provincia de Salta, donde se ubican las poblaciones naturales de las especies. Los resultados obtenidos se organizaron en cinco capítulos, se presenta a continuación una síntesis de cada uno de ellos. El género *Echinopsis* es el más diverso

dentro de Trichocereae, con flores infundibuliformes de diferentes tamaños y colores, polinizadas por aves, abejas y polillas. Sin embargo, presenta un Bauplan conservado, con patrones anatómicos similares en especies que difieren en la especialización fenotípica a diferentes polinizadores. Se estudió la estructura del nectario floral de especies con diferentes especializaciones fenotípicas florales para determinar si presentaban un patrón común en géneros relacionados evolutivamente (*Cleistocactus*, *Denmoza* y *Echinopsis*) que comparten el mismo tipo de polinizador, aunque no todas las especies muestran flores especializadas a la ornitofilia. Las especies analizadas exhiben nectarios hipantiales estructurados, en la base de los filamentos soldados al tubo se forma una cámara donde se acumula el néctar. Características epidérmicas permiten diferenciar los tres géneros. La estructura básica de la cámara nectarífera es relativamente conservada, y no es posible establecer una relación entre la anatomía del nectario floral, la especialización fenotípica de las flores y los polinizadores efectivos de este linaje. Se destaca la estructura de la cámara nectarífera en *Denmoza*, que presenta paredes muy desarrolladas, haces vasculares que penetran profundamente en el tejido nectarífero, un tapón de tricomas lanosos y estaminodios en la porción superior de la cámara. Las características ultraestructurales del nectario floral de *E. terscheckii*, sugieren que la secreción del néctar sigue un camino mixto, a través de estomas y a través de la cutícula de los tricomas epidérmicos. El androceo en el género *Gymnocalycium* reveló características que apoyan la monofilia del mismo, como la presencia de hilos que conectan a los granos de polen, la presentación secundaria del polen, y tricomas en los filamentos. El gineceo de los taxones de Trichocereae analizados presenta características conservadas, como por ejemplo, óvulos circinótrofos con tricomas en el funículo, estilo semicerrado, lóbulos estigmáticos con tricomas epidérmicos multicelulares, multiseriados. Se presenta el primer registro para la familia de presencia de picos nucelares en dos especies de *Echinopsis*. El análisis del recorrido del tubo polínico sugiere que los tubos crecen en la matriz intercelular del tejido de transmisión. Por último, el mapeo de caracteres florales en la filogenia molecular de *Echinopsis s.l.* reveló que la mayoría de los 43 caracteres analizados son homoplásicos, ya que sus estados de carácter aparecen de manera independiente en más de dos oportunidades en taxones no emparentados. Sin embargo, muchos de ellos son útiles para apoyar subclados dentro de esta filogenia. Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un aporte original a la caracterización morfológica y anatómica de las flores

en Cactaceae, que revela datos novedosos para la familia, y aportan información para comprender las relaciones filogenéticas en la tribu Trichocereae.

ABSTRACT

Cacti are a group of plants characterized by a great floral diversity, which has been associated with pollination by animals. This diversity has been described based on shape, size and color of the flowers, but rarely supported by morphological and anatomical characters. This thesis studied the floral morpho-anatomy of 19 species of Cactaceae, which represents three clades of the Cactoideae subfamily and presents the full spectrum of documented phenotypic specializations for NOA: 1) ornithophilous flowers, 2) melitophilous flowers and 3) sphingophilous flowers. A total of 17 species corresponds to the Trichocereae tribe: *Cleistocactus baumannii* (Lem.) Lem., *C. hyalacanthus* (K. Schum.) Rol.-Goss., *C. smaragdiflorus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *Denmoza rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose, *Echinopsis ancistrophora* Speg., *E. atacamensis* (Phil.) H. Friedrich & G.D. Rowley, *E. aurea* Britton & Rose, *E. haematantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. schickendantzii* F.A.C. Weber, *E. terscheckii* (Parm. ex Pfeiff.) Friedrich & G.D. Rowley, *E. thionantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. tubiflora* (Pfeiff.) Zucc. ex A. Dietr., *Gymnocalycium saglionis* (F. Cels) Britton & Rose, *G. schickendantzii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *G. spegazzinii* Britton & Rose, *Harrisia pomanensis* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Britton & Rose, and *Rebutia minuscula* K. Schum. As external group, *Parodia microsperma* (F.A.C. Weber) Speg. (Browningiaeeae tribe), and *Stetsonia coryne* (Salm-Dick) Britton & Rose (Notocacteeae tribe) were analyzed. With the aim to describe and compare the floral structure in Trichocereae, in the context of the floral phenotypic specialization recorded, morphological and anatomical characters of different floral whorls were analyzed, with the purpose of detect possible synapomorphies that support the different clades and subclades of the most recent molecular classifications. In this context, flower buds in pre-anthesis and flowers in anthesis, fixed in FAA, were processed with conventional techniques for optical microscopy, scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Additionally, in some taxa with particular features, were employed techniques for observations with transmission electron microscopy and differential interference contrast microscopy. The analyzed material comes from Salta province, where the natural populations of the species are located. The results obtained were organized in five chapters, a synthesis of them is presented as follows. The genus

Echinopsis is the most diverse within Trichocereae, with infundibuliform flowers of different sizes and colors, pollinated by birds, bees and moths. However, it presents a preserved Bauplan, with similar anatomical patterns in species that differ in phenotypic specialization to different pollinators. The structure of the floral nectary of species with different floral phenotypic specializations was studied to determine if they had a common pattern, in evolutionarily related genera (*Cleistocactus*, *Denmoza* and *Echinopsis*) that share the same type of pollinator, although not all species show specialized ornithophilous flowers. The analyzed species exhibit structured hypantial nectaries, at the base of the filaments welded to the tube a chamber is formed where the nectar accumulates. Epidermal characteristics allow distinguish the three genera. The basic structure of the nectar chamber is relatively conserved, and it is not possible to establish a relationship between the anatomy of the floral nectary, the phenotypic specialization of flowers and the effective pollinators. The structure of the nectar chamber in *Denmoza* stands out, because of its highly developed walls, vascular bundles that penetrate deep into the nectariferous tissue, a plug of woolly trichomes and staminodes in the upper portion of the chamber. The ultrastructural characteristics of the floral nectary of *E. terscheckii* suggest that the secretion of the nectar follows a mixed path, through stomata and through the cuticle of the epidermal trichomes. The androecium in *Gymnocalycium* revealed characteristics that support its monophyly, such as the presence of threads that connect pollen grains, secondary pollen presentation, and trichomes in filaments. The gynoecium of the Trichocereae taxa analyzed has conserved characteristics, such as, circumscissile ovules with trichomes in the funiculus, semi-closed style, and stigmatic lobes with multicellular, multiseriate epidermal trichomes. The first record for the family of presence of nucellar beaks in two species of *Echinopsis* is presented. The analysis of the pathway of the pollen tube suggests that tubes grow in the intercellular matrix of the transmission tissue. Finally, the mapping of floral characters in the molecular phylogeny of *Echinopsis* s.l. revealed that most of the 43 characters analyzed are homoplastic, since they appear independently on more than two occasions in unrelated taxa. However, many of them are useful to support subclades within this phylogeny. The results obtained in this thesis constitute an original contribution to the morphological and anatomical characterization of flowers in Cactaceae, which reveals novel data for the family, and provide information to understand the phylogenetic relationships in the Trichocereae tribe.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL



ANTECEDENTES

La familia Cactaceae Juss.

Los cactus han llamado la atención de botánicos y coleccionistas desde tiempos remotos debido a su gran diversidad, su morfología inusual y sus llamativas flores. El gran interés como plantas ornamentales, ha llevado a un incremento del número de especies descritas y un aumento de sinónimos (Anderson, 2001; Griffith, 2004; Hunt, 2006; Ritz *et al.*, 2007). Las clasificaciones tradicionales de Cactaceae se basan principalmente en la morfología; sin embargo, el alto nivel de convergencia dentro de la familia no permite clasificaciones confiables basadas en su morfología (Ritz *et al.*, 2007).

Conforme al APG IV (2016), Cactaceae forma parte del orden Caryophyllales, clado Superasterídeas. La diversidad actual de la familia incluye 1427 especies pertenecientes a unos 124 géneros (Hunt, 2006). Las clasificaciones más modernas reconocen cuatro subfamilias: Pereskioideae, Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae (Wallace, 1995a; Wallace & Dickie, 2002; Nyffeler, 2002; Edwards *et al.*, 2005; Anderson, 2005; Bárcenas *et al.*, 2011).

Se ha establecido que el origen de este linaje se produjo en América del Sur (Hernández-Hernández *et al.*, 2014, y referencias en el mismo), situando el origen más probable de la familia, así como el de las subfamilias Opuntioideae y Cactoideae, en la región Andina comprendida entre Argentina, Chile, y el sur de Bolivia. Las cuatro subfamilias de Cactaceae se encuentran a lo largo de los Andes, con una, Maihuenioideae, endémica del sur y de la meseta patagónica (Franck *et al.*, 2013). Además, el hecho de que muchas especies de Cactaceae filogenéticamente basales (Nyffeler, 2002; Crozier, 2005; Griffith & Porter, 2009; Korotkova *et al.*, 2010; Hernandez-Hernandez *et al.*, 2011) se encuentran a lo largo de los Andes, sumado a que varios géneros monotípicos están restringidos a esta región, respalda la hipótesis de un origen del linaje en el centro-oeste de Sudamérica. Probablemente este evento haya ocurrido finalizado el Cretácico (Anderson, 2001), aunque Arakaki *et al.* (2011) y Hernández-Hernández *et al.* (2014) estimaron el origen del clado a finales del Eoceno tardío, alrededor de 35 millones de años atrás. Los mismos autores coinciden que la mayor divergencia y radiación adaptativa fue aún más

reciente, ubicando el origen de los clados de mayor riqueza en el Mioceno tardío (10 a 5 millones de años atrás), momento en el que surgieron grandes extensiones de ambientes áridos (Arakaki *et al.*, 2011).

Se han postulado hipótesis robustas de relaciones profundas existentes para tres de las cuatro subfamilias; sin embargo, las relaciones entre éstas no han podido ser bien definidas en su totalidad (Edwards *et al.*, 2005; Bárcenas *et al.*, 2011). Todos los estudios han reconocido la monofilia de las subfamilias Maihuenioideae, Opuntioideae y Cactoideae, mientras que Pereskioideae aparece como la única subfamilia parafilética, reflejando varios eventos en la evolución temprana de la familia (Edwards *et al.*, 2005; Bárcenas *et al.*, 2011) (Fig. 1).

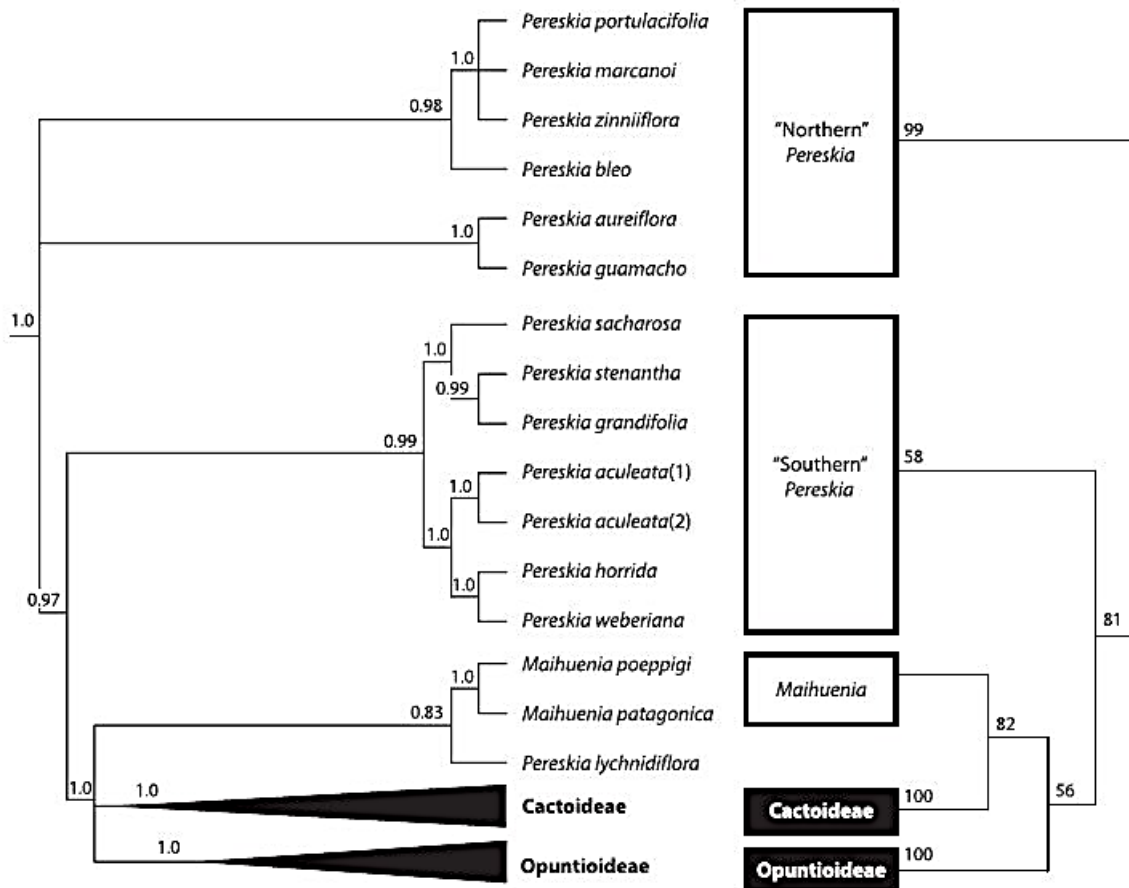


Figura 1. Relaciones intrafamiliares en Cactaceae. Cladograma modificado de Bárcenas *et al.* (2011), comparado con la topología del árbol resumen obtenido por Edwards *et al.* (2005).

La familia aparece como un linaje endémico del Nuevo Mundo, presente en la mayoría de los biomas, se extiende desde Canadá hasta Argentina (Gibson & Nobel, 1986). La mayor diversidad de especies se concentra principalmente en México, con dos centros secundarios de diversificación en Sudamérica, uno en la región sudoeste de los Andes, y el otro al este de Brasil (Ritz *et al.*, 2007; Hernández-Hernández *et al.*, 2011). El noroeste de Argentina forma parte del segundo centro de diversidad asociado a la Cordillera de los Andes, y representa un punto caliente de biodiversidad en la tierra o "hotspot" (Ritz *et al.*, 2007). Esta diversidad incluye especies de tres subfamilias, con excepción de la pequeña subfamilia patagónica Maihuenioideae.

Sólo una especie de Cactaceae, *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn, se encuentra naturalmente fuera de América, en regiones de África tropical, Madagascar y algunas islas del Océano Índico (Barthlott, 1983); este caso se ha explicado como un evento de reciente dispersión a larga distancia por las aves (Gibson & Nobel, 1986; Barthlott & Hunt, 1993).

La monofilia de Cactoideae está soportada molecularmente por una delección dentro del espaciador intergénico trnT-trnL (Applequist & Wallace, 2002). Esta subfamilia incluye al mayor número de géneros y especies (Anderson, 2001; Hunt, 2006), como así también la mayor diversidad de formas de crecimiento dentro de la familia (Hernández-Hernández *et al.*, 2011), presenta más del 80% de las especies descritas (Ritz *et al.*, 2007). Sin embargo, el arreglo tradicional de los géneros en diferentes tribus, la monofilia de grandes géneros y la monofilia de algunas tribus es un aspecto aún controvertido (Ritz *et al.*, 2007). Anderson (2001) ha reconocido nueve tribus dentro de la subfamilia, no obstante, análisis moleculares posteriores muestran que las tribus de Cactoideae no son monofiléticas (Nyffeler, 2002; Ritz *et al.*, 2007). Nyffeler (2002) y Ritz *et al.* (2007) han reconocido un grupo monofilético más amplio denominado "clado BCT", altamente soportado, conformado por las tribus Browningieae, Cereeae y Trichocereae, aunque ninguna de ellas se revela como monofilética.

La tribu Trichocereae, tradicionalmente reconocida por presentar flores con pericarpelo escamoso o piloso (Barthlott & Hunt, 1993; Anderson, 2001), ha diversificado en el hemisferio Sur (Nyffeler, 2002; Hernández-Hernández *et al.*, 2011), con cuatro formas de crecimiento, globosa, columnar, arborescente o rastrera. Se distribuye

principalmente en América del Sur y posee su centro de diversidad en los Andes (Ortega-Baes *et al.*, 2015). Representa la segunda tribu más numerosa de la subfamilia (Gibson & Nobel, 1986; Anderson, 2001). Es un grupo muy diverso que muestra una amplia variación en cuanto a la especialización fenotípica de las flores en relación a los diferentes agentes polinizadores: cuenta con especies clasificadas como ornitófilas (con flores con rasgos típicamente asociados a la polinización por aves, en los géneros *Cleistocactus* Lem., *Denmoza* Britton & Rose, y *Oreocereus* (A. Berger) Riccob.), especies melitófilas (con rasgos florales asociados a la polinización por abejas, por ejemplo en *Gymnocalycium* Pfeiff. ex Mittler), y especies esfingófilas (con caracteres en sus flores que se relacionan a la polinización por mariposas nocturnas, como en algunas especies de *Echinopsis* Zucc. y *Harrisia* Britton) (Anderson, 2001; Hunt, 2006). En el noroeste de Argentina, está representada por especies de los géneros *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis*, *Gymnocalycium*, *Harrisia*, *Oreocereus* y *Rebutia* K. Schum. (Hunt, 2006). Los estudios filogenéticos más recientes, basados en marcadores cloroplásticos y nucleares, no reflejan las delimitaciones tradicionales de las tribus y de los grandes géneros, y sugieren que las relaciones dentro de Trichocereae permanecen inconclusas, y que *Echinopsis*, en sentido amplio, no es monofilético y está cercanamente relacionado a *Harrisia* (Nyffeler, 2002; Ritz *et al.*, 2007; Korotkova *et al.*, 2010; Bárcenas *et al.*, 2011; Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Schlumberger & Renner, 2012).

Echinopsis es uno de los géneros más controversiales debido a la enorme diversidad en cuanto a formas de vida, y fenotipos florales que reflejan todos los modos de polinización descritos para la tribu. De acuerdo a la filogenia molecular de Schlumberger & Renner (2012), *Echinopsis s.l.* es un grupo monofilético que incluye géneros estrechamente relacionados, entre ellos *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Harrisia* (Anderson, 2001; Hunt, 2006). Dentro de este diverso linaje se destaca la presencia de especies polinizadas por abejas, aves, y mariposas nocturnas (de Viana *et al.*, 2001; Schlumberger & Badano, 2005; Gorostiague, 2015; Gorostiague & Ortega Baes, 2016; Gorostiague & Ortega Baes, 2017). Dadas estas particularidades, este linaje resulta interesante para evaluar diferencias estructurales en las flores, que podrían aportar datos para apoyar las filogenias moleculares más recientes.

Las cactáceas son un grupo de plantas que caracterizan a la flora de las regiones áridas y semiáridas del continente americano (Ortega-Baes *et al.*, 2010). Uno de los atributos más distintivos de los cactus es la presencia de espinas, tradicionalmente entendidas como hojas modificadas (Anderson, 2001), desarrolladas en respuesta a los ambientes áridos en donde han evolucionado. Además, han desarrollado sistemas intrínsecos de gestión del agua, como la recolección de agua a través de espinas, la absorción de agua a través de tricomas y el almacenamiento de agua mediante mucílago (Kim *et al.*, 2017).

En los ambientes donde se desarrollan, establecen interacciones positivas con otras especies de plantas y animales a través de los procesos de polinización, producción y dispersión de semillas, y establecimiento de plántulas (Godínez-Alvarez *et al.*, 2003). Con referencia al proceso de polinización se ha indicado que los diferentes tipos florales descritos tienen una relación estrecha con los animales que visitan las flores y las polinizan eficientemente (Gibson & Nobel, 1986; Pimienta-Barrios & del Castillo, 2002).

La polinización por abejas es el sistema más extendido en la familia, y es considerada la condición primitiva (Anderson, 2001). Mientras que, la polinización por aves, murciélagos y mariposas nocturnas son condiciones derivadas, menos comunes dentro de la familia, pero tienden a ser comunes en algunas tribus como Pachycereeae y Trichocereae (Grant & Grant, 1979; Gibson & Nobel, 1986). A pesar de ello, numerosas especies de cactáceas presentan sistemas de polinización generalistas, donde sus flores son visitadas por un amplio espectro de animales, incluyendo a visitantes no esperados de acuerdo al síndrome floral (Fleming *et al.*, 2001; Ortega-Baes *et al.*, 2011).

Las flores en Cactaceae

En la literatura sobre la familia, se conocen descripciones florales en trabajos taxonómicos (Britton & Rose, 1919-1923; Lawrence, 1951; Buxbaum, 1953; Kiesling, 1975; Anderson, 2001, Kiesling *et al.*, 2011), o en estudios de biología floral (Fleming *et al.*, 2001; de Viana *et al.*, 2001; Scobell & Scott, 2002; Nassar & Ramírez, 2004; Rivera-Marchand & Ackerman, 2006; Munguía-Rosas *et al.*, 2009; Ortega-Baes *et al.*, 2010; Walter 2010, Larrea-Alcázar & López, 2011, Alonso-Pedano & Ortega-Baes, 2012; Ortega-Baes & Gorostiague, 2013; Gorostiague & Ortega-Baes, 2014). Si bien se cuenta con

investigaciones sobre la embriología (Hernández-García & García-Villanueva, 1991; Núñez-Mariel *et al.*, 2001; Silva, 2007; Strittmatter *et al.*, 2002), sólo se conocen unos pocos estudios referidos a la morfo-anatomía de las flores (Buxbaum, 1953; Boke, 1963, 1966, 1968; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010).

Los miembros de Cactaceae se caracterizan por mostrar una amplia variedad de formas y tamaños en las flores (Cota Sánchez, 1996). Dentro del género *Rhipsalis* se encuentran las flores más pequeñas, con apenas 5 mm de diámetro, y las más grandes dentro de *Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose y *Selenicereus* (A. Berger) Britton & Rose con cerca de 40 cm de diámetro y tubos florales muy largos (Anderson, 2001). La estructura floral en la familia muestra una gran diversidad de caracteres relacionados a la adaptación a ambientes secos y diferentes modos de polinización. Tradicionalmente, se ha postulado que el color de las flores está asociado a la polinización por animales, y diferentes colores han sido relacionados a diferentes tipos de animales (Rowley, 1980; Anderson, 2001).

Las flores de las especies de Trichocereae del noroeste de Argentina pueden ser agrupadas en tres tipos básicos: 1) flores melitófilas, 2) flores ornitófilas, y 3) flores esfingófilas. Sin embargo, la evidencia actual indica que todas las especies estudiadas en esta región poseen sistemas de polinización generalistas, donde ensambles diversos de animales visitan las flores (Ortega-Baes *et al.*, 2010; Walter, 2010; Larrea-Alcázar & López, 2011; Alonso-Pedano & Ortega-Baes, 2012; Gorostiague, 2012; Barrionuevo, 2012; Ortega-Baes & Gorostiague, 2013; Gorostiague & Ortega-Baes, 2015). Esta particularidad es relevante para poner a prueba la idea de que, dentro de un linaje, las características florales están estrechamente relacionadas con los tipos de visitantes florales que acceden a las flores. Se presenta a modo ilustrativo el esquema de una flor de *Echinopsis* (Fig. 2).

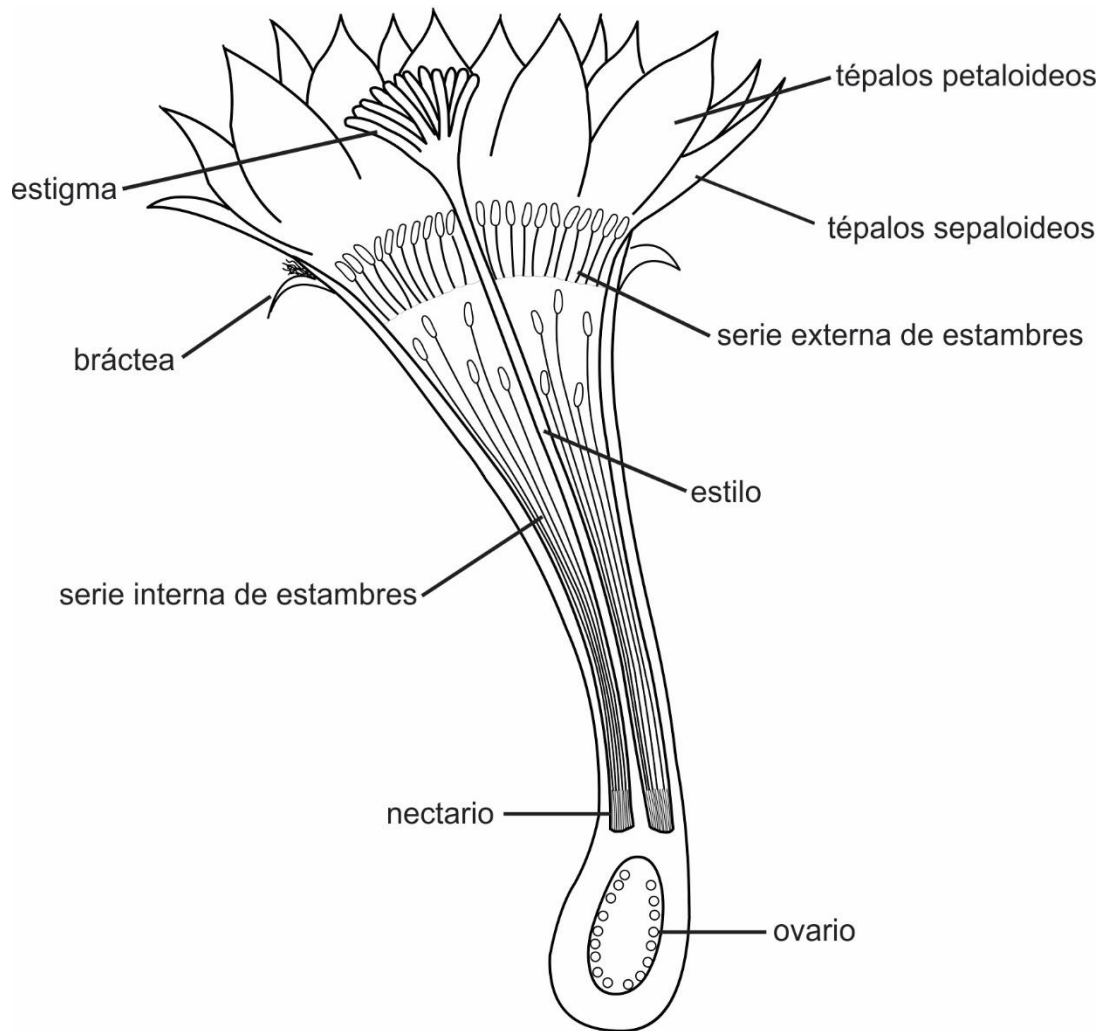


Figura 2. Esquema de una flor de *Echinopsis*, modificado de Kiesling (1975).

Nectarios florales en Cactaceae

De acuerdo a Bernardello (2007), los estudios realizados en la familia, revelan que el néctar se secreta en un receptáculo anular en los géneros *Pereskia* Mill. y *Rhipsalis* Gaertn., o a lo largo de la porción basal del hipantio (Zandonella, 1977; Barthlott & Hunt, 1993; Nassar *et al.*, 1997); en este último caso, pueden aparecer estructuras definidas como *cámaras de néctar*, formadas por diferentes órganos (p. ej., apéndices filamentosos o hipantiales). Entre los escasos antecedentes que presentan, es importante mencionar los más recientes, a saber: la investigación realizada en especies mexicanas del género *Opuntia* Mill. donde se describe y compara la anatomía floral con el fin de contribuir al conocimiento del género (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009); el estudio descriptivo de la morfo-

anatomía de la flor de *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. (Almeida *et al.*, 2010); la contribución de Almeida *et al.* (2012) acerca de la morfología de nectarios florales y extraflorales del cactus epífito *Rhipsalis teres* (Vell.) Steud., y las respectivas concentraciones de néctar de cada estructura. La investigación más reciente de Agüero *et al.* (2018), que versa sobre la estructura y ultraestructura de nectarios florales de dos especies de *Opuntia*, vincula estos atributos al funcionamiento de dicha estructura y a sus polinizadores.

OBJETIVOS

Objetivo General

Las cactáceas son un grupo de plantas que se caracterizan por presentar una gran diversidad floral, que ha sido asociada a la polinización por animales. Esta diversidad se ha descrito con base en la forma, el tamaño y el color de las flores, pero pocas veces con base en caracteres micro-morfológicos y anatómicos. El propósito principal de este proyecto de tesis fue estudiar la estructura floral en la tribu Trichocereae en el contexto de la especialización fenotípica floral registrada (flores de abejas, de aves y de mariposas nocturnas), analizando la evolución de esta estructura dentro de este linaje, con representantes de los géneros *Cleistocactus* (*C. baumannii* (Lem.) Lem., *C. hyalacanthus* (K. Schum.) Rol.-Goss., *C. smaragdiflorus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose); *Denmoza* (*D. rhodacantha* (Salm-Dyck) Britton & Rose); *Echinopsis* (*E. ancistrophora* Speg., *E. atacamensis* (Phil.) H. Friedrich & G.D. Rowley, *E. aurea* Britton & Rose, *E. haematantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. schickendantzii* F.A.C. Weber, *E. terscheckii* (Parm. ex Pfeiff.) Friedrich & G.D. Rowley, *E. thionantha* (Speg.) D.R. Hunt, *E. tubiflora* (Pfeiff.) Zucc. ex A.Dietr.); *Gymnocalycium* (*G. saglionis* (F. Cels) Britton & Rose, *G. schickendantzii* (F.A.C. Weber) Britton & Rose, *G. spegazzinni* Britton & Rose); *Harrisia* (*H. pomanensis* (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Britton & Rose); y *Rebutia* (*R. minuscula* K. Schum.).

Objetivos Específicos

- 1) Describir el plan general de organización de la flor en el género *Echinopsis*.
- 2) Comparar la morfología y anatomía entre flores de especies que difieren en su especialización fenotípica a la polinización, como así también entre linajes (géneros) dentro de la tribu.
- 3) Describir el nectario floral de los diferentes géneros presentes en la tribu.
- 4) Interpretar el valor taxonómico de los caracteres florales analizados en función de su variabilidad.
- 5) Analizar la evolución de la estructura floral, mapeando caracteres seleccionados, con base en la filogenia publicada para el género *Echinopsis*.
- 6) Analizar el plan general de organización de la flor de *Stetsonia coryne* (Salm-Dyck) Britton & Rose (tribu Browningieae) y *Parodia microsperma* (F.A.C. Weber) Speg. (tribu Notocactaceae), especies seleccionadas como grupo externo que se usarán para mapear los caracteres.

HIPÓTESIS

La anatomía floral de las especies de los géneros de la tribu Trichocereae presenta el mismo patrón de organización interna. Por lo tanto, los tipos florales definidos con base en la especialización fenotípica a la polinización dentro de un género están relacionados a diferencias en la forma y el color.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES

Campañas de colección

Se realizaron cuatro viajes de colección en la provincia de Salta, en los años 2014 (dos viajes), 2016 y 2018. Cada viaje fue realizado dentro del período de floración de las diferentes especies, comprendido entre los meses de julio-agosto hasta diciembre-enero.

Localidades visitadas

La distribución de las poblaciones de las cuales fueron tomadas las muestras de las 18 especies contempladas en esta investigación se muestra en la Fig. 3.

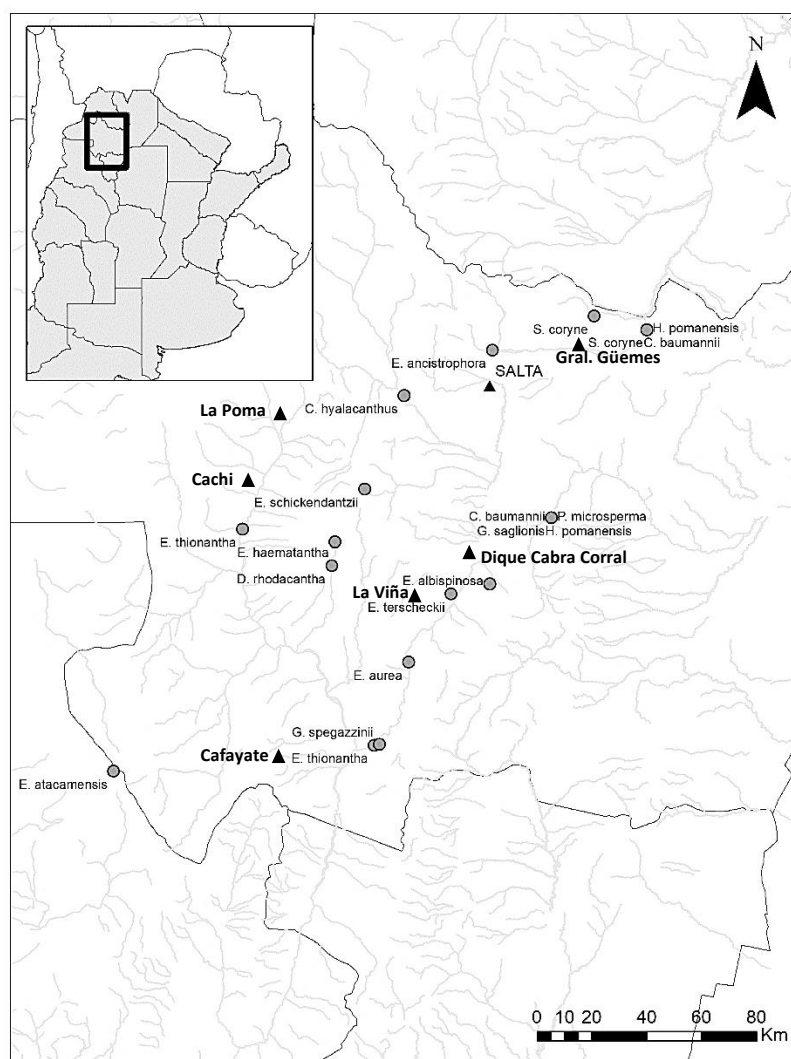


Figura 3. Localidades de colección del material analizado.

Se realizaron las siguientes actividades:

Herborización del material

Los especímenes fueron coleccionados por duplicado, prensados y secados para su posterior etiquetado, montaje e incorporación al herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

Se tomaron fotografías digitales de las diferentes plantas y flores en el campo para ilustrar el trabajo.

Colección de material para obtención de preparados histológicos

Se colectaron entre 3 a 5 botones florales con tamaño de preantesis y flores en antesis por cada especie en sus respectivas áreas de distribución natural. Las muestras se cortaron transversal y longitudinalmente. Cuando las flores fueron disecionadas transversalmente, se cortaron porciones de aproximadamente 1 cm de longitud, desde la región proximal a la región distal de la flor, para facilitar la penetración del fijador en los tejidos. Para los cortes longitudinales, las flores fueron divididas por la mitad. Todos los segmentos se colocaron en frascos con fijador, rotulados para cada especie, para su posterior aplicación en diferentes técnicas de anatomía vegetal.

Especímenes analizados

Para esta investigación se seleccionaron especies de la tribu Trichocereae, por tratarse de la segunda tribu más grande de la subfamilia Cactoideae que ha diversificado en el hemisferio Sur.

Las especies seleccionadas incluyen todo el espectro de flores de acuerdo a la especialización fenotípica descripta para la diversidad floral de las cactáceas del noroeste de Argentina: flores de abejas, de aves y de mariposas nocturnas. Las especies se citan de acuerdo al International Plant Names Index (IPNI - <http://www.ipni.org/>).

***Cleistocactus baumannii* (Lem.) Lem.**

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. *et al.* 5 (CTES).

Cleistocactus hyalacanthus (K. Schum.) Rol.-Goss.

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Los Andes, Ruta 51, 6.XI.16, González V.V. *et al.* s.n. (CTES).

Cleistocactus smaragdiflorus (F.A.C. Weber) Britton & Rose

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

Denmoza rhodacantha (Salm-Dyck) Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cachi, Parque Nacional Los Cardones, 8.XI.16, González V.V. *et al.* 17 (CTES).

Echinopsis ancistrophora Speg.

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Capital, Río Vaquero, 10.XI.16, González V.V. *et al.* 20 (CTES).

Echinopsis atacamensis (Phil.) H. Friedrich & G.D. Rowley

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cafayate, Ruta 2, Estancia Piatelli, Cafayate, 7.XI.16, González V.V. *et al.* 14 (CTES).

Echinopsis aurea Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cafayate, Ruta 68, Quebrada de Las Conchas, Puente Morales, 7.XI.16, González V.V. *et al.* 11 (CTES).

Echinopsis haematantha (Speg.) D.R. Hunt

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cachi, Parque Nacional Los Cardones, 8.XI.16, González V.V. *et al.* 16 (CTES).

Echinopsis schickendantzii F.A.C. Weber

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cafayate, Ruta 33, km 51, La Virgen, Cuesta del Obispo, 8.XI.16, González V.V. *et al.* 18 (CTES).

Echinopsis terscheckii (Parm. ex Pfeiff.) Friedrich & G.D. Rowley

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 68, La Viña, 7.XI.16, González V.V. *et al.* 10 (CTES).

Echinopsis thionantha (Speg.) D.R. Hunt

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Molinos, Ruta 40, Seclantás, 8.XI.16, González V.V. *et al.* 15 (CTES).

Echinopsis tubiflora (Pfeiff.) Zucc. ex A. Dietr.

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. *et al.* 9 (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 spegazzinii Britton & Rose

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

Harrisia pomanensis (F.A.C. Weber ex K. Schum.) Britton & Rose

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. *et al.* 8 (CTES).

Parodia microsperma (F.A.C. Weber) Speg.

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. La Viña, Ruta 52, La Bodeguita, 4.XI.16, González V.V. *et al.* 7 (CTES).

Rebutia minuscula K. Schum.

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. Cafayate, Ruta 33, Cuesta del Obispo, 8.XI.16, González V.V. *et al.* s.n. (CTES).

***Stetsonia coryne* (Salm-Dick) Britton & Rose**

ARGENTINA. Prov. Salta. Dep. General Güemes, Ruta 34, entre Güemes y Pampa Blanca, 10.XI.16, González V.V. *et al.* 19 (CTES).

Del listado original de especies propuestas en el plan de tesis doctoral, se decidió quitar a la especie *Echinopsis angelesiae* (R. Kiesling) G.D. Rowley, por tratarse de un taxón difícil de coleccionar debido a sus poblaciones pequeñas y poco abundante. Por otra parte, se decidió agregar al listado original a *Cleistocactus hyalacanthus* para abarcar a todas las especies del género que habitan en Argentina, y a *Rebutia minuscula*, como representante del género *Rebutia*, revelado como grupo externo cercanamente emparentado con *Echinopsis* s.l. (*sensu* Schlumpberger & Renner, 2012).

METODOLOGÍA

TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS EXOMORFOLÓGICO DE LA FLOR

Diafanización de tépalos sepaloideos y petaloideos

Para el estudio de la vascularización de las piezas del perigonio, se realizaron preparados histológicos temporales siguiendo la técnica de diafanización, según el protocolo propuesto por Johansen (1940); para ello los tépalos sepaloideos y petaloideos se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 6 %, hasta alcanzar su clarificación. Luego las muestras se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron en una solución de safranina diluida en agua y se montaron en una gota de agua.

Morfometría floral

Para el género *Echinopsis*, se seleccionó una especie (*E. tubiflora*), de acuerdo a la disponibilidad de material en el campo. Las flores fueron colectadas y fijadas en alcohol 70%. Se midieron 20 flores en antesis, elegidas al azar. Se registraron las siguientes características florales: diámetro de corola, longitud de flor, longitud de gineceo, longitud y diámetro del ovario, número de óvulos, longitud del estilo, longitud del estigma, número de lóbulos, longitud de estambres, número de estambres, número de granos de polen, y longitud y diámetro de la cámara nectarífera.

El análisis de los caracteres exomorfológicos de flores frescas y fijadas se llevó a cabo con microscopio estereoscópico Leica MZ6 con cámara digital incluida.

Análisis con microscopio electrónico de barrido (MEB)

Para las observaciones de caracteres exomorfológicos de los diferentes verticilos florales se aplicaron técnicas clásicas para microscopía electrónica de barrido (O'Brien & McCully, 1981). Las muestras previamente fijadas en FAA (formol-alcohol-ácido acético), fueron sometidas a una serie creciente de acetona posteriormente secadas a punto crítico con CO₂. La metalización se llevó a cabo con un delgado baño de oro-paladio. Las piezas florales fueron seccionadas y separadas por verticilos. Las fotomicrografías se obtuvieron con microscopio electrónico de barrido JEOL 5800 LV a 10 Kv. (JOEL USA, Peabody, MA, USA).

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA EL ANÁLISIS ANATÓMICO DE LA FLOR

Preparados permanentes para observaciones con microscopio óptico (MO)

Se analizaron botones en preantesis y flores en antesis fijados en FAA. La deshidratación de las muestras fue realizada en una serie de deshidratantes histológicos y aclarantes-preimpregnantes de Biopur®, se efectuaron cambios cada 20 minutos (Gonzalez & Cristóbal, 1997). La pre-impregnación se realizó con alcohol butírico terciario, dejando actuar 10 h y luego de un cambio 2 horas más. La impregnación en parafina se llevó a cabo según la técnica de Johansen (1940), el material fue colocado en una mezcla de partes iguales de alcohol butírico terciario y aceite de parafina en estufa a 60° por 10 h, seguido de dos cambios en parafina pura Paraplast® entre 10 y 12 h cada uno. Se efectuaron cortes longitudinales y transversales con micrótopo rotativo en espesores de 10-12 µm. Los cortes fueron teñidos con safranina-Astra blue (Luque *et al.*, 1996) y montados en Bálsamo de Canadá sintético (Biopur, Buenos Aires, Argentina).

Para las observaciones e interpretaciones de los caracteres anatómicos e histológicos se utilizaron microscopio óptico binocular Leica DM LB2 y microscopio óptico binocular Olympus BX 50F, ambos con cámara clara y cámara digital incluida.

Observaciones

Para realizar la descripción anatómica de la flor, se analizaron las características de los tejidos epidérmico, parenquimático y vascular del pericarpelo, de los verticilos florales fértiles y estériles (gineceo, androceo, tépalos externos e internos) y del nectario floral.

Preparados temporarios de diafanización de óvulos para observaciones con microscopio de contraste diferencial interferencial (DIC)

Se analizó la estructura de óvulos maduros y disposición de gametofitos femeninos en *Echinopsis aurea* y *E. haematantha*. Se siguió la técnica de clarificación de pistilos de Young *et al.* (1979), con los tiempos adaptados a las características y naturaleza del material. Con el fin de eliminar el contenido celular, partiendo de material previamente fijado en FAA, los óvulos fueron diseccionados de los ovarios y colocados en tubos Eppendorf con alcohol 70° durante 30 minutos. Posteriormente fueron deshidratados y clarificados con etanol 85° (30 minutos); etanol 100° (30 minutos); etanol: metilsalicilato 1:1 (15 minutos); etanol: metil salicilato 1:3 (15 minutos); 100% metil salicilato (15 minutos). Las soluciones fueron cambiadas con micropipeta. Los preparados se montaron en una gota de 100% metil salicilato y fueron observados por medio de un microscopio Leica DM2500 equipado con dispositivo de contraste de interferencia diferencial (DIC) y cámara fotográfica Leica EC3.

Preparados temporarios para observar el crecimiento de tubos polínicos con microscopio de fluorescencia

Para dilucidar el recorrido de los tubos polínicos, se analizaron flores de un representante por cada género analizado. Los pistilos, previamente fijados en FAA, se deshidrataron y embebieron en parafina. Se realizaron cortes transversales con micrótopo rotativo en espesores de 10µm, de estilos y estigmas de flores en anthesis, en los que previamente se observó la presencia de granos de polen. Los mismos se desparafinaron y tiñeron con azul de anilina al 0,05%. Las observaciones se realizaron con microscopio de fluorescencia Leica DM 1000 con filtro para calosa, y cámara digital Canon EOS Rebel TDi incluida.

Análisis con microscopio electrónico de transmisión (MET)

Para los estudios de ultraestructura de los nectarios florales, el material fresco fue pre-fijado en glutaraldehído 1%, formaldehído al 4% en buffer fosfato (pH 7,2) durante 48h y luego se fijaron en OsO₄ a 2°C en el mismo buffer por 3 h. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente de etanol y embebidas en resina de Spurr's (O'Brien & McCully, 1981). Se realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor con ultramicrotomo Reichert-Jung que fueron teñidos con azul de toluidina para su observación en microscopio óptico. Los cortes ultrafinos (750- 900 nm) fueron marcados con acetato de uranilo y citrato de plomo (Zarlavsky, 2014). Los cortes fueron observados y fotografiados usando microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM 1200 Ex II a 85kv. (JEOL USA, Peabody, MA, USA) del INTA de Castelar.

Mapeo de caracteres florales en base a la filogenia molecular publicada para *Echinopsis s.l* y géneros afines

La selección de caracteres y su codificación parten de una hipótesis de homología, la cual establece que la presencia de un carácter en dos o más taxones, puede ser explicada por ancestría común, e incluye una serie de transformación polarizada (De Luna & Mishler, 1996). Los caracteres cualitativos se codificaron como binarios o multiestado.

Para reconstruir la evolución de caracteres florales seleccionados, en los taxones de la tribu Trichocereae contemplados en esta tesis, se utilizó la metodología empleada por Avalos *et al.* (2019). Para visualizar una hipótesis de evolución de caracteres morfológicos y anatómicos florales, se utilizó una topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012). La topología se basa en un análisis de Máxima Verosimilitud, obtenida a partir de tres marcadores cloroplásticos (trnL-trnF, trnS-trnG y rpl16). La misma se ensambló a mano utilizando Mesquite v. 3.40 (Madison & Madison, 2018), y se enraizó en un grupo externo conformado por *G. saglionis*, *G. schickendantzii*, *G. spegazzinii*, *R. minuscula* de la tribu Trichocereae, *Stetsonia coryne* de la tribu Browningieae y *Parodia microsperma* de la tribu Notocactaeae. Para reconstruir el estado ancestral de los caracteres incluidos en la matriz de datos morfológicos y anatómicos florales, se empleó el criterio de Máxima Parsimonia, utilizando el Paquete Reconstrucción de Estados Ancestrales implementado en el programa Mesquite. Todos los caracteres

fueron tratados como desordenados. Los códigos de estado de caracteres y la matriz de datos se proporcionan en el capítulo 7.

Ilustraciones

Las imágenes fueron procesadas en computadora, para su ordenamiento, referencias, corrección de detalles e impresión. Las figuras con fotos de microscopio óptico, microscopio electrónico de barrido y microscopio electrónico de transferencia fueron procesadas y digitalizadas con los softwares Corel Draw y Corel Photo Paint X7. Las mediciones se realizaron con el software Image J. Los dibujos digitales se elaboraron utilizando el software Macromedia Flash.

CAPÍTULO 3

BAUPLAN FLORAL DEL GÉNERO SUDAMERICANO *ECHINOPSIS* (CACTACEAE): ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y ANATÓMICO EN SIETE ESPECIES DEL NOROESTE ARGENTINO



INTRODUCCIÓN

Las flores, definidas como dispositivos que permiten los procesos sexuales, son sistemas estructurales altamente plásticos, por lo que fueron capaces de adquirir una enorme diversidad de formas (Endress, 1994). Sin embargo, a pesar de la gran diversidad floral observada en angiospermas, generalmente las flores están construidas sobre un esquema básico con un número definido de órganos, establecidos en cuatro series, con dos verticilos estériles y dos verticilos fértiles: el cáliz (compuesto de sépalos), la corola (compuesta de pétalos), el androceo (compuesto de estambres) y el gineceo (compuesto de carpelos), aunque este esquema aparece modificado en algunos grupos de plantas, con límites poco definidos (Ronse de Craene, 2010).

Un enfoque práctico reconoce tres niveles en la estructura floral: (i) *Bauplan* hace referencia a la organización, basándose en patrones filogenéticamente conservados, que son los más difíciles de cambiar; (ii) *Gestalt* refiere a la construcción, es decir, a las proporciones que tienen que ver con propiedades mecánicas y características arquitectónicas, y (iii) *Modo* alude a adaptaciones relativamente superficiales, en términos de biología de polinización, como tamaño, color, fragancias e indumentos que son frecuentemente muy variables a niveles sistemáticos bajos (Endress, 1994). Los tres niveles no forman sistemas cerrados, mutuamente excluyentes, ya que están evolutivamente interconectados.

Tradicionalmente, los botánicos han atribuido a los diferentes tipos de agentes polinizadores la gran variedad de formas y tamaños de flores que se observan en la naturaleza (Galen, 1999). Esta idea es conveniente, en el sentido en que los visitantes florales y polinizadores ganan nutrientes y energía a través de la transferencia de polen, un paso clave en la reproducción sexual de la planta, ejerciendo selección sobre los caracteres florales de las plantas (Endress, 1994). Cuando la polinización se lleva a cabo a través de animales, generalmente las flores presentan sustancias o estructuras atractivas para los polinizadores. La gran diversidad taxonómica de polinizadores se ajusta con una amplia gama de morfología, modalidad sensorial y comportamiento para que coincida con la variación observada en la forma de las flores (Galen, 1999). Este hecho sugiere que ciertos grupos de animales, como abejas, mariposas, polillas, moscas, picaflores, murciélagos y

otros mamíferos pequeños, impulsaron la explosiva radiación y diversificación de las plantas con flores. Las diferentes características florales han sido asociadas a los polinizadores a través del concepto de *síndrome floral* (Fenster *et al.*, 2004). Sin embargo, una visión más holística sobre la morfología y el tamaño de las flores, basada en la premisa que los caracteres morfológicos de un organismo están sujetos a múltiples y conflictivas presiones de selección, considera además la selección ejercida en la interacción entre plantas y enemigos florales, y el costo de los recursos asociados con la exhibición floral (Galen, 1999). Por otro lado, investigaciones actuales sostienen que aún cuando las especies pueden presentar especialización fenotípica, la mayoría de los sistemas de polinización demostraron ser generalistas (Waser *et al.*, 1996; Ollerton *et al.*, 2007), es decir, que sus flores son visitadas por un amplio espectro de animales, inclusive visitantes no asociados a su síndrome floral.

Dentro de las características florales estrechamente vinculadas con el proceso de polinización podemos citar la forma floral, el ciclo floral, el color y la producción de sustancias que funcionan como atractivos o recompensas florales para los polinizadores, guías de néctar, producción de polen, aceites, néctar y olores o perfumes (Faegri & van der Pijl, 1979; Buchmann, 1987; Baker & Baker, 1990; Cocucci & Vogel, 2001; Fenster *et al.*, 2004; Neff & Simpson, 2005). Estos últimos caracteres, funcionan como señales de larga distancia para atraer polinizadores (Cota-Sánchez, 1996).

Los conocimientos morfo-anatómicos acerca de las características florales y los órganos reproductivos son imprescindibles para interpretar la morfología y el funcionamiento de las plantas. Los mismos, junto a los de ontogenia de órganos y estructuras, aportan conocimiento básico para encarar trabajos sistemáticos, ecológicos, de biología reproductiva y de conservación de especies.

Numerosos trabajos ilustran la importancia de los estudios anatómicos en Angiospermas. El análisis de caracteres que tienen que ver con el tipo de tapete y la microsporogénesis en las especies de *Siparuna* Aubl. han aportado datos adicionales que ayudaron a aclarar las relaciones filogenéticas en Siparunaceae (Bello *et al.*, 2002). El estudio de la anatomía floral en Xyridaceae, Eriocaulaceae y Mayacaceae, un clado débilmente soportado en Poales, contribuyó al conocimiento de la biología reproductiva,

taxonomía y filogenia (Oriani & Scatena, 2012). El estudio del desarrollo y morfología floral en linajes neotropicales tempranos y tardíos de Loranthaceae, con una amplia diversidad floral permitió testear homología de órganos y postular plesiomorfismos y apomorfismos florales en toda la familia (Suaza-Gaviria *et al.*, 2016). Otro ejemplo, es el análisis de patrones de fusión de órganos florales, que ha desempeñado un papel clave en el origen y posterior diversificación de las angiospermas (Sokoloff *et al.*, 2018), entre otros.

Las flores de los cactus en apariencia son casi idénticas a la típica flor de angiosperma; sin embargo, han representado un tema de discusión, dado que para algunos autores no son “flores verdaderas” sino partes especializadas de un tallo que contiene los órganos florales (Tiagi, 1955). De acuerdo a Mauseth (2006, 2016), las “flores” de los cactus deberían ser llamadas “ramas florales”, debido a que los órganos reproductivos se encuentran hundidos o embebidos en tejido del tallo. De esta manera, las brácteas o escamas que recubren el pericarpelo y el tubo floral, son interpretadas como hojas verdaderas de la rama floral, semejantes a las hojas del resto de las angiospermas. Así, los botones florales de casi todos los cactus aún retienen los genes que producen hojas en la mayoría de las angiospermas (Mauseth, 2006). De acuerdo a esta interpretación Almeida *et al.* (2018) proponen un nuevo término para definir a la compleja estructura que representa el fruto de estas plantas.

Este linaje, usualmente exhibe flores vistosas, grandes, solitarias y coloridas, con numerosos segmentos mostrando una transición gradual desde brácteas a sépalos y a pétalos, y cada flor bisexual, con un pistilo y varios estambres (Anderson, 2001), aunque se ha reportado que por atrofia de estambres, las flores pueden ser unisexuales (Bravo-Hollis & Scheinvar, 1995; Strittmatter *et al.*, 2002).

El género *Echinopsis* Zucc., problemático taxonómicamente, es uno de los más grandes y diverso morfológicamente dentro de la subfamilia Cactoideae (Schlumpberger & Renner, 2012). Incluye aproximadamente 128 especies nativas de Sudamérica, distribuidas en Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay, Uruguay, Chile y Argentina (Anderson, 2001), desde el sureste de Brasil a la costa de Chile y norte de Ecuador, con un centro de diversidad de especies en los Andes orientales del norte de Argentina y Bolivia (Schlumpberger & Renner, 2012). Las relaciones filogenéticas de *Echinopsis* son

controversiales. La filogenia de ADN de cloroplasto revela la polifilia de este género, además demuestra evolución más convergente en rasgos florales que se relacionan con los modos de polinización y una evolución menos convergente en las formas de crecimiento de las plantas (Schlumberger & Renner, 2012).

Las flores típicas del género *Echinopsis* pueden nacer en los tallos subapicalmente o lateralmente, son de antesis diurna o nocturna, con forma de embudo, las escamas del pericarpelo y tubo floral a menudo llevan un conjunto de pelos o cerdas (Anderson, 2001). Internamente, despliegan un arreglo de un gran número de estambres dispuestos en dos verticilos, el inferior en espiral sobre la cámara de néctar y el superior en un anillo en la fauce floral (Kiesling, 1975). Este Bauplan o modelo básico que caracteriza al género, presenta variaciones en las diferentes especies, reflejando especialización a diferentes síndromes de polinización. La diversidad de las flores vistosas que presenta *Echinopsis* se refleja especialmente en la forma, el tamaño y el color de las mismas. *Echinopsis* incluye ejemplares con flores polinizadas por aves, abejas y mariposas nocturnas (de Viana *et al.*, 2001; Schlumberger & Badano, 2005; Ortega-Baes *et al.*, 2011; Gorostiague, 2015; Gorostiague & Ortega Baes, 2016; Gorostiague & Ortega Baes, 2017). En el grupo de flores esfingófilas, las flores infundibuliformes exhiben tubos florales desarrollados, y presentan tépalos internos de color blanco, mientras que las flores melitófilas, presentan embudos notablemente más cortos y tépalos color crema, amarillo o anaranjado (Anderson, 2001).

Por todo lo expuesto, la evolución de la diversidad floral desde el punto de vista anatómico, en Cactaceae, y particularmente en *Echinopsis*, es altamente intrigante y aún resulta enigmática. A pesar del gran interés que generan las flores de los cactus, la información sobre la morfología y especialmente la anatomía comparada de las flores es fragmentada. Con el objetivo de generar conocimiento sobre el Bauplan floral a nivel anatómico en especies del género *Echinopsis*, en este capítulo se estudió por primera vez la morfo-anatomía de los verticilos florales en siete representantes del género.

RESULTADOS

Morfología Floral

A pesar de presentar diferentes síndromes de polinización, las flores de *Echinopsis ancistrophora*, *E. atacamensis*, *E. aurea*, *E. haemathanta*, *E. terscheckii*, *E. thionantha* y *E. tubiflora*, comparten numerosas características morfológicas. Son epíginas, solitarias, sésiles, perfectas, infundibuliformes, con corola colorida (Figs. 4A-H y 5A-F). En apariencia son actinomorfas, se las podría considerar zigomorfas por la curvatura del pericarpelo, sin embargo, en sentido estricto por la disposición helicoidal de las piezas estériles y de los estambres internos son asimétricas.

El receptáculo o pericarpelo es el tejido del tallo en el que se embute la flor, forma junto a otros verticilos florales que se fusionan, un tubo floral muy desarrollado en las especies esfingófilas (*E. ancistrophora*, *E. atacamensis*, *E. terscheckii* y *E. tubiflora*), mientras que es más corto en las especies melitófilas (*E. aurea*, *E. haematantha* y *E. thionantha*) (Figs. 4A-H y 5A-F). En ambos casos, el ovario ínfero queda totalmente inmerso en dicho tejido. El tubo floral está formado, además, por la cohesión y adnación de las piezas del perigonio y la parte basal de los estambres; es largo, tubular y estrecho en *E. ancistrophora* y *E. tubiflora* (Fig. 4A y G), más amplio en *E. atacamensis* y *E. terscheckii* (Fig. 4C y F), y más corto en *E. aurea*, *E. haematantha* y *E. thionantha* (Fig. 5A, C, E). Estos rasgos florales se reflejan en las diferentes medidas de longitud floral y diámetro de corolas de las especies (Tabla 1). Tanto el pericarpelo como el tubo floral, típicamente están recubiertos en todas las especies por brácteas triangulares, lanceoladas, que llevan pelos lanosos en las axilas (Fig. 6A, B).

En todas las especies, el perigonio es espiralado, formado por numerosas piezas lanceoladas, las exteriores, denominadas tépalos sepaloideos, de color verde, mientras que los tépalos petaloideos más internos, presentan color blanco en *E. tubiflora*, *E. atacamensis*, *E. terscheckii* y *E. ancistrophora*, amarillo en *E. aurea* y *E. thionantha* y rojo-anaranjado en *E. haematantha* (Figs. 4A-H y 5A-F). El ápice de los tépalos sepaloideos es acuminado con la vena media prolongada en un mucrón (Figs. 7A, C y 8A-B), en *E. thionantha* estas piezas se distinguen claramente por mostrar el ápice lignificado (8A-B). El ápice de los tépalos petaloideos es mucronado, termina en una punta aguda que es la prolongación de la

vena media y los márgenes son levemente aserrados (Figs. 7B, D y 8C-D). Estas piezas están soldadas por su base formando el tubo floral.

El androceo está formado por numerosos estambres dispuestos en dos series (más de 400 estambres en la serie interna, y más de 100 en la externa, en *E. tubiflora* tomada como modelo de estudio, Tabla 2). La serie más externa muestra mayor adnación al tubo floral, los filamentos se liberan en la garganta de la flor y sobrepasan la fauce floral (Figs. 4A-H y 5A-F). La serie más interna de estambres no sobrepasa la fauce floral, los filamentos de diferente longitud están adnatos al tubo solo en la base, delimitando las paredes de la cámara nectarífera por encima del ovario. Las anteras son bitecas, tetrasporangiadas y de dehiscencia longitudinal (Fig. 6D, F). La inserción de las mismas es basifija (Fig. 6E).

El gineceo es pluricarpelar (9-14 carpelos), sincárpico, pluriovulado (Fig. 6G), con más de 1000 óvulos por flor en *E. tubiflora* (Tabla 2), de placentación parietal. En el momento de antesis, el estigma en todas las especies es exerto, y sobrepasa las dos series de estambres. Presenta un número de lóbulos lineares que varía en cada especie, representan la porción libre del gineceo y se corresponden con el número de carpelos fusionados que forman el ovario unilocular (Fig. 6J, K).

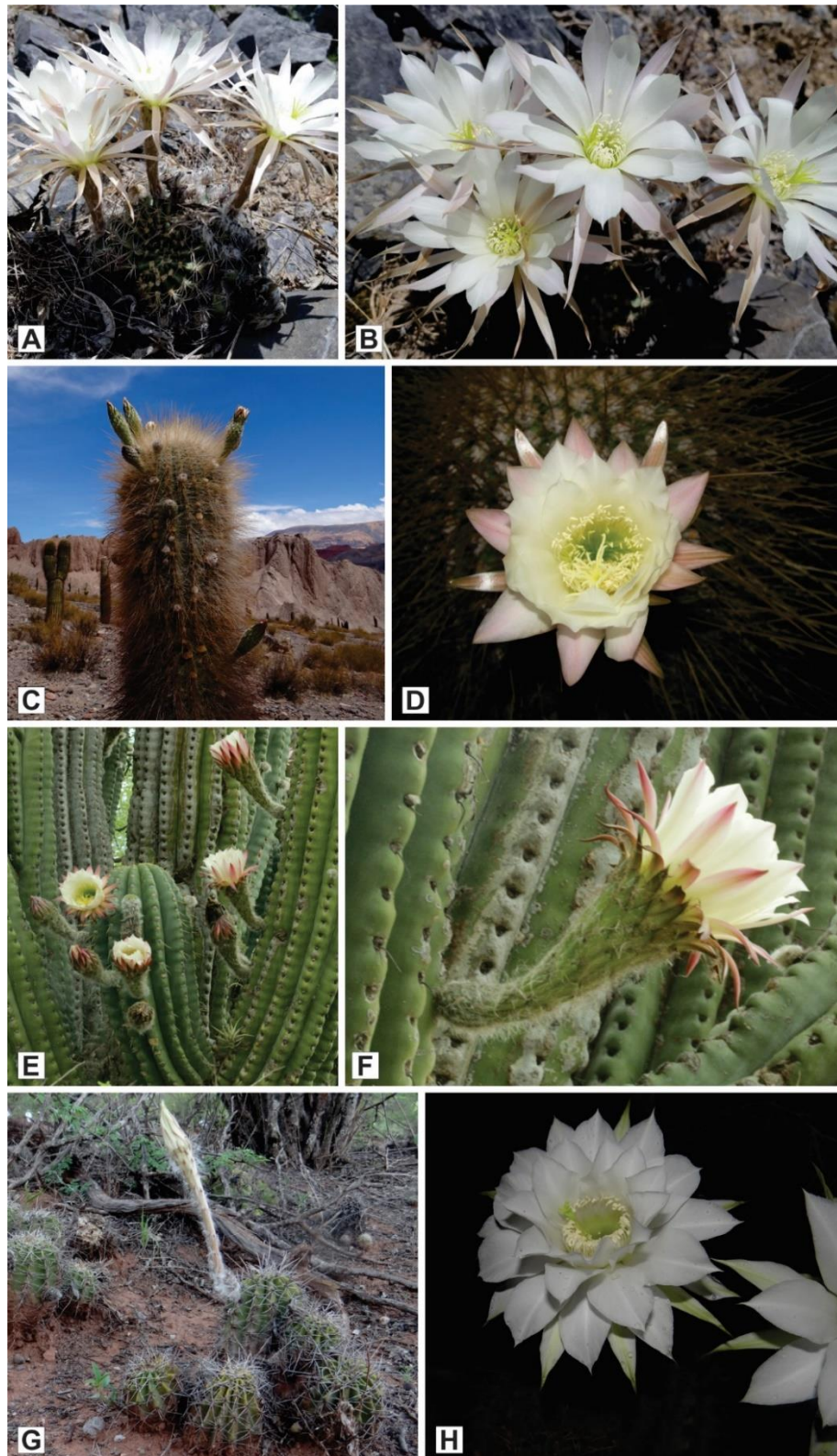


Figura 4. Especies esfingófilas de *Echinopsis*. **A-B.** *E. ancistrophora*. **A.** Aspecto general de una planta con tres flores en antesis. **B.** Vista frontal de un grupo de flores. **C-D.** *E. atacamensis*. **C.** Porción apical de un tallo con botones florales. **D.** Detalle de una flor

abierta en vista superficial. **E-F.** *E. terscheckii*. **E.** Ramas con botones y flores abiertas. **F.** Vista lateral de una flor abierta. **G-H.** *E. tubiflora*. **G.** Aspecto general de una planta con un botón floral. **H.** Detalle de una flor abierta. Nota: *E. ancistrophora* y *E. terscheckii* fueron fotografiadas durante las primeras horas de la mañana, momento en el que las flores aún permanecen abiertas. Fotografías: **A-C:** Valeria González; **D, G-H:** Pablo Gorostiague; **E-F:** Cecilia Sosa.

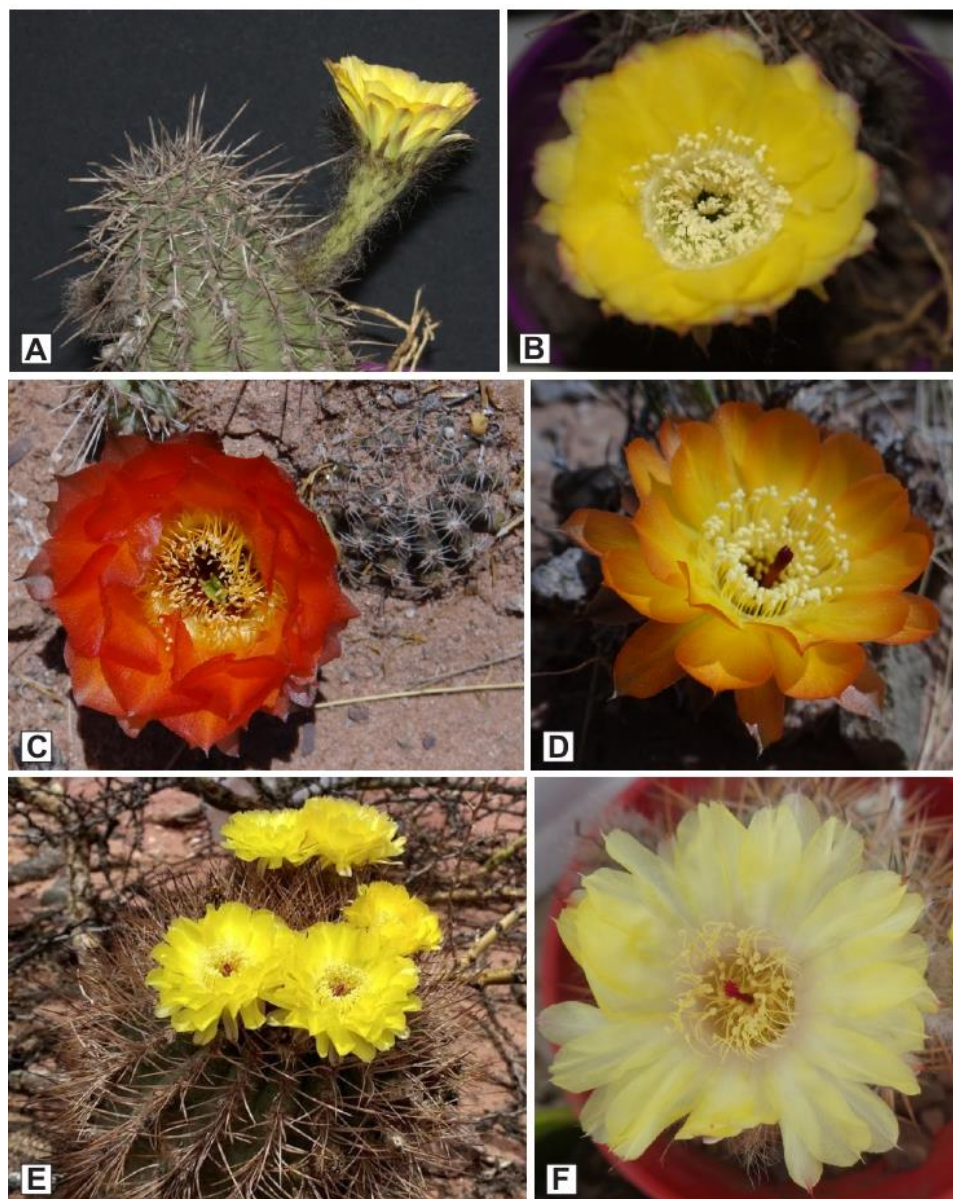


Figura 5. Especies melitófilas de *Echinopsis*. **A-B.** *E. aurea*. **C-D.** *E. haematantha*. **E-F.** *E. thionantha*. **A, C, E.** Aspecto general de la planta en flor. **B, D, F.** Vista frontal de una flor. Fotografías: **A-B, E-F:** Valeria González; **C-D:** Pablo Gorostiague.

Tabla 1. Principales características florales de las especies de *Echinopsis* aquí estudiadas.

Especie	Forma floral	Color de tépalos petaloideos	Longitud floral	Diámetro de corola	Síndrome floral	Visitantes	Referencia sobre visitantes florales
<i>E. ancistrophora</i>	Embudo largo	Blanco	111.7 ± 17.4	80.0 ± 14.1	Esfingófilo	Abejas, Mariposas nocturnas	Schlumpberger <i>et al.</i> , 2009
<i>E. aurea</i>	Embudo corto	Amarillo	73 ± 3	38 ± 2	Melitófilo	-----	-----
<i>E. atacamensis</i>	Embudo largo	Blanco	124 ± 2	96 ± 3	Esfingófilo	Picaflores, Abejas, Polillas, Avispas	de Viana <i>et al.</i> , 2001; Schlumpberger & Badano, 2005
<i>E. haematantha</i>	Embudo corto	Rojo-anaranjado	43.5 ± 4.0	52.1 ± 6.2	Melitófilo	Abejas	Gorostiague, 2015
<i>E. terscheckii</i>	Embudo largo	Blanco	177.7 ± 16.0	163.8 ± 21.7	Esfingófilo	Abejas, Mariposas Nocturnas, Picaflores, Coleópteros	Ortega Baes <i>et al.</i> , 2011
<i>E. thionantha</i>	Embudo corto	Amarillo	55.5 ± 2.5	35.5 ± 4.6	Melitófilo	Abejas	Gorostiague, 2015
<i>E. tubiflora</i>	Embudo largo	Blanco	128.6 ± 18.6	78.7 ± 13.6	Esfingófilo	Abejas	Gorostiague, 2015

Nota: la longitud y el diámetro de la corola se expresan en mm.

Tabla 2. Morfometría floral de *E. tubiflora*.

Características florales	Tamaño de muestra (N)	Promedio
Longitud	10	16,96 cm
Profundidad del nectario	10	11,44 cm
Diámetro del tubo en la región del nectario	10	0,63 cm
Diámetro de la corola	10	6,02 cm
Altura del estigma	10	12,44 cm
Número de lóbulos estigmáticos	10	11
Long. de filamentos libres de la serie interna	10	13,51 cm
Long. de filamentos libres de serie la externa	10	1,51 cm
Número de estambres serie interna	7	386
Número de estambres serie externa	7	122
Número de óvulos	7	1871

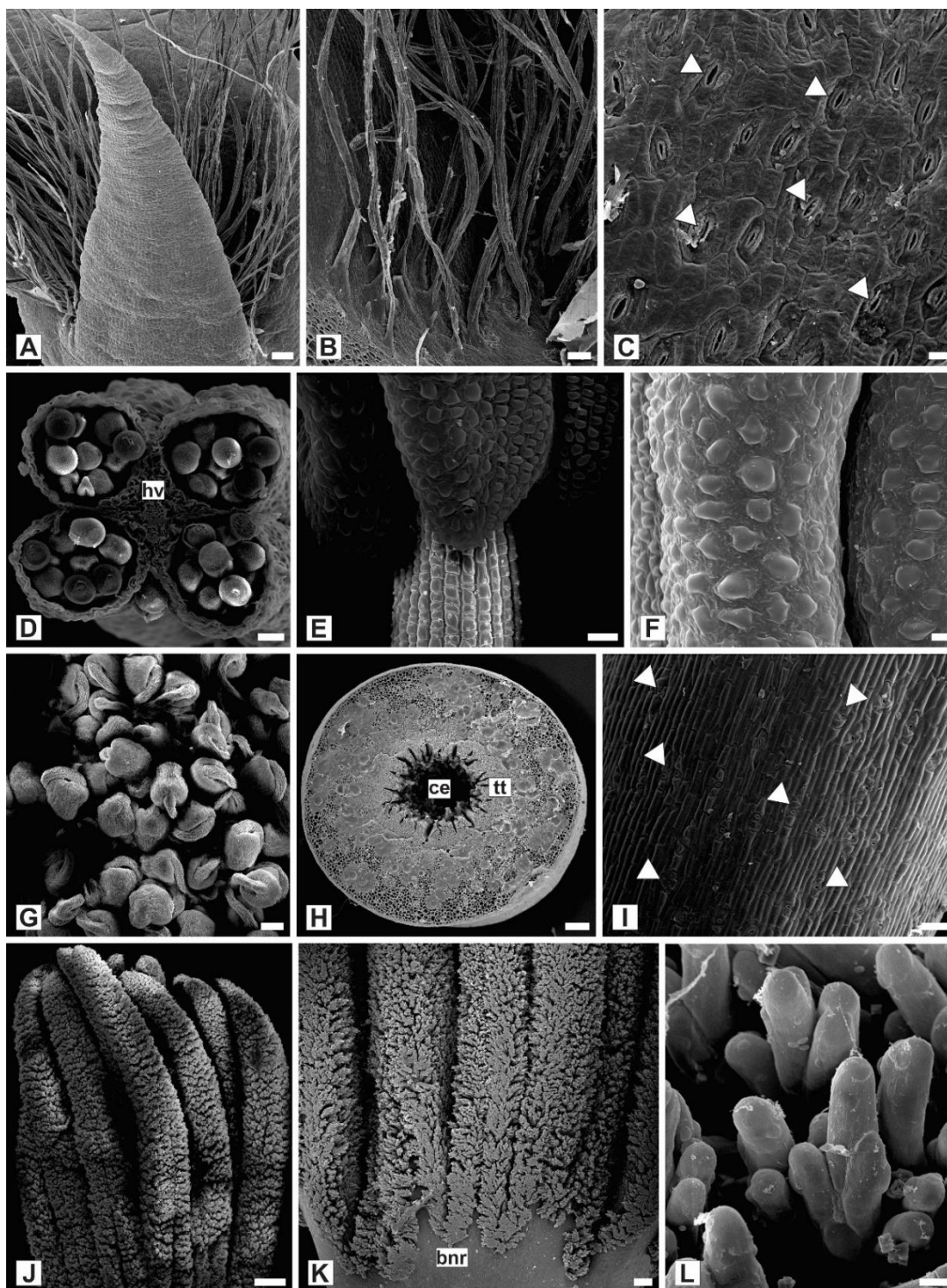


Figura 6. Fotomicrografías con microscopio electrónico de barrido (MEB) de diferentes verticilos florales en especies de *Echinopsis*. **A-B.** *E. terscheckii*; **C, H, K, L. *E. atacamensis*; **D-G, I, J. *E. tubiflora*. **A.** Cara abaxial de bráctea que recubre el tubo floral, se aprecian tricomas lanosos axilares. **B.** Cara adaxial de bráctea mostrando la base de los tricomas. **C.** Detalle de epidermis de cara abaxial de bráctea, note abundantes estomas (puntas de flechas blancas). **D.** Sección transversal de antera biteca y tetrasporangiada. **E.******

Detalle de la inserción de la antera basifija. **F.** Detalle de la pared anterol con células epidérmicas globosas. **G.** Conjunto de óvulos circinótrofos de placentación parietal. **H.** Sección transversal del estilo, se observa el canal estilar. **I.** Detalle de la epidermis externa del estilo, note abundantes estomas anomocíticos (puntas de flechas blancas). **J.** Vista general del estigma con numerosos lóbulos estigmáticos lineares. **K.** Detalle de la porción receptiva y de la porción basal no receptiva de los lóbulos del estigma. **L.** Detalle de tricomas multicelulares, multiseriados que tapizan la porción receptiva de cada lóbulo del estigma. Abreviaturas: bnr= porción basal no receptiva; ce= canal estilar; hv= haz vascular; tt= tejido de transmisión. Escalas: A, B, H, K= 200µm; C, F= 20µm; D, E= 50µm; G, I= 100µm; J= 500µm; L= 10µm.

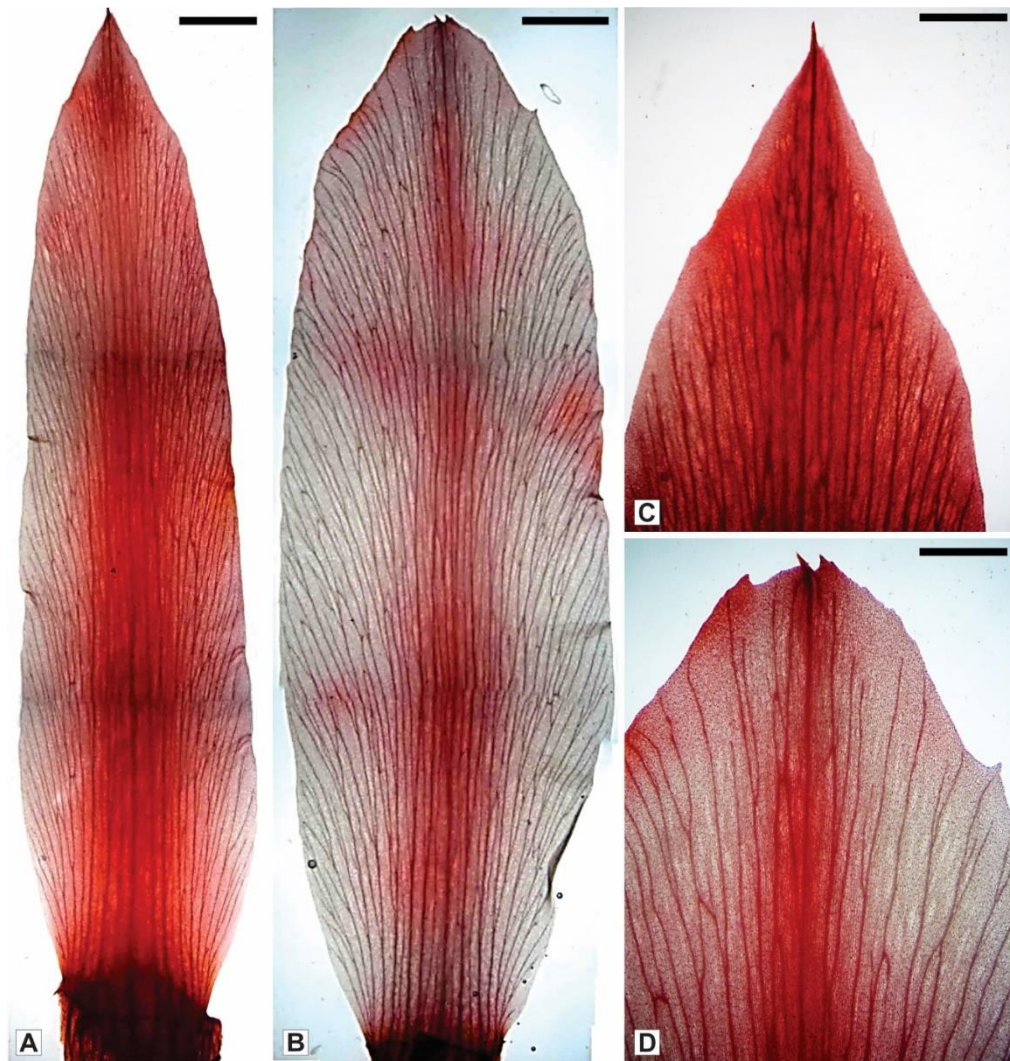


Figura 7. Fotomicrografías con microscopio estereoscópico de piezas diafanizadas del perigonio de *Echinopsis tubiflora*. **A.** Tépalos sepaloides. **B.** Tépalos petaloide. **C.** Detalle del ápice mucronado del tépalos sepaloides. **D.** Detalle del ápice emarginado del tépalos petaloide, se observa la venación abierta. Escala: A-B= 2 mm; C-D= 1 mm.

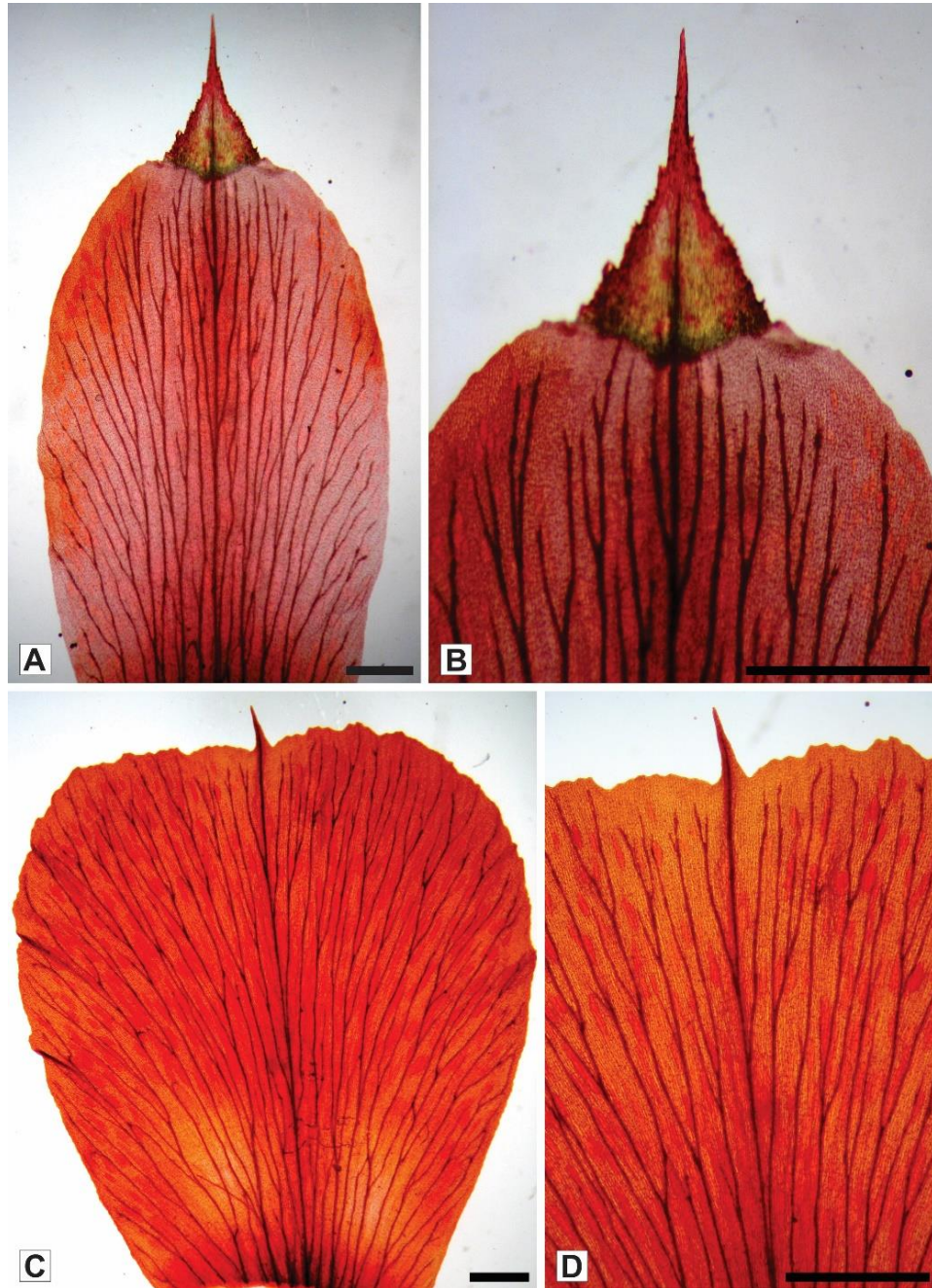


Figura 8. Fotomicrografías con microscopio estereoscópico de piezas diafanizadas del perigonio de *Echinopsis thionantha*. **A.** Tépalos sepaloides. **B.** Detalle del ápice mucronado y lignificado del tépalos sepaloides. **C.** Tépalos petaloide. **D.** Detalle del ápice emarginado del tépalos petaloide, mostrando la terminación de la vena media y la venación secundaria abierta. Escala: A-C= 3mm; B-D= 2mm.

Anatomía Floral

Las bractéolas son las pequeñas hojas modificadas que recubren el pericarpelo y el tubo floral. Estos órganos presentan ambas epidermis uniseriadas, con células epidérmicas propiamente dichas subcuadrangulares con paredes y cutícula gruesa en la cara abaxial. En posición subepidérmica se observa un parénquima homogéneo, con células redondeadas de citoplasma granuloso, con abundantes granos de almidón; cavidades secretoras conspicuas se ubican próximas a los haces vasculares colaterales (Fig. 9A).

En las siete especies, la epidermis externa del pericarpelo es uniseriada y glabra, con una gruesa cutícula. El parénquima subyacente consta de numerosas capas de células comparativamente grandes, subisodiamétricas, de diferentes tamaños, con citoplasma granuloso denso y paredes delgadas; dispersas en el tejido se hallan abundantes cavidades secretoras de gran tamaño, junto con haces vasculares de diferentes diámetros que inervan distintas partes de la flor. Haces estaminales dispuestos en círculo, marcan el límite entre el ovario y el tejido pericarpelar (Fig. 9B).

En sección transversal, la anatomía de los tépalos sepaloïdes y petaloïdes es similar a la descrita para las bractéolas. El parénquima es homogéneo, con células de diferentes tamaños y de paredes delgadas, con abundantes espacios intercelulares, cavidades mucilaginosas y haces vasculares colaterales (Fig. 9C, D). La estructura de las piezas petaloïdes difiere ligeramente de las sepaloïdes, registrando una reducción del número de capas del parénquima. Las piezas del perigonio de las especies analizadas muestran un patrón de venación particular. Ambos tipos de tépalos, presentan una venación abierta de tipo actinódroma en la cual varias venas primarias (más de tres) divergen desde la base y corren paralelas hacia el ápice, y hacia los márgenes de la estructura se van dividiendo dicotómicamente, formando un reticulado que termina de manera dicotómica sin alcanzar los márgenes de la pieza (Figs. 7C, D y 8B, D).

Los haces vasculares de cada filamento, llegan hasta la parte superior del conectivo de la antera. En sección transversal, el filamento estaminal presenta epidermis uniseriada, en posición subepidérmica se ubica un parénquima, que a veces exhibe pequeñas cavidades secretoras, y en posición central un haz vascular concéntrico anficribal (Fig. 9E).

La pared de la antera madura dehiscente está formada por una epidermis uniestratificada con células papilosas de paredes delgadas, cubiertas por una fina cutícula. El endotecio presenta células cuadrangulares, con engrosamientos fibrosos en sus paredes radiales; las capas medias y el tapete se han degradado completamente (Fig. 9F).

Los óvulos son circinótopos, bitegumentados, crasinucelados y con un funículo largo, acompañado de un haz vascular central; la micrópila está delimitada solamente por el tegumento interno. En la parte calazal del óvulo, se forma una pequeña cámara de aire entre los tegumentos interno y externo (Fig. 9I).

El tejido parenquimático del ovario se compone de células subcirculares, de pequeño tamaño, y con espacios intercelulares reducidos en comparación con el pericarpelo. Haces vasculares de pequeño diámetro y con diferentes orientaciones acompañan a este tejido.

El estilo es cilíndrico y está atravesado longitudinalmente por un canal estilar (Figs. 6H y 9J), rodeado por un tejido de transmisión, con células compactas, de pequeño tamaño y citoplasma denso. Este tejido especializado presenta un contorno sinuoso con crestas y valles, el número de crestas coincide con el número de carpelos. Está innervado por 9-14 haces vasculares dispuestos en un arreglo en anillo. Presenta cavidades secretoras dispersas en el parénquima (Fig. 9J). En *E. tubiflora*, tanto la epidermis externa del estilo como la epidermis que recubre el canal estilar son uniseriadas, glabras, con abundantes estomas la externa (6I).

El estigma tiene 9-14 lóbulos lineares papilosos (Fig. 6J-L). Cada lóbulo presenta una epidermis con tricomas uni- y bicelulares, y se halla innervado por un haz vascular central. Cada haz se encuentra rodeado de tejido parenquimático y tejido de transmisión (Fig. 9K).

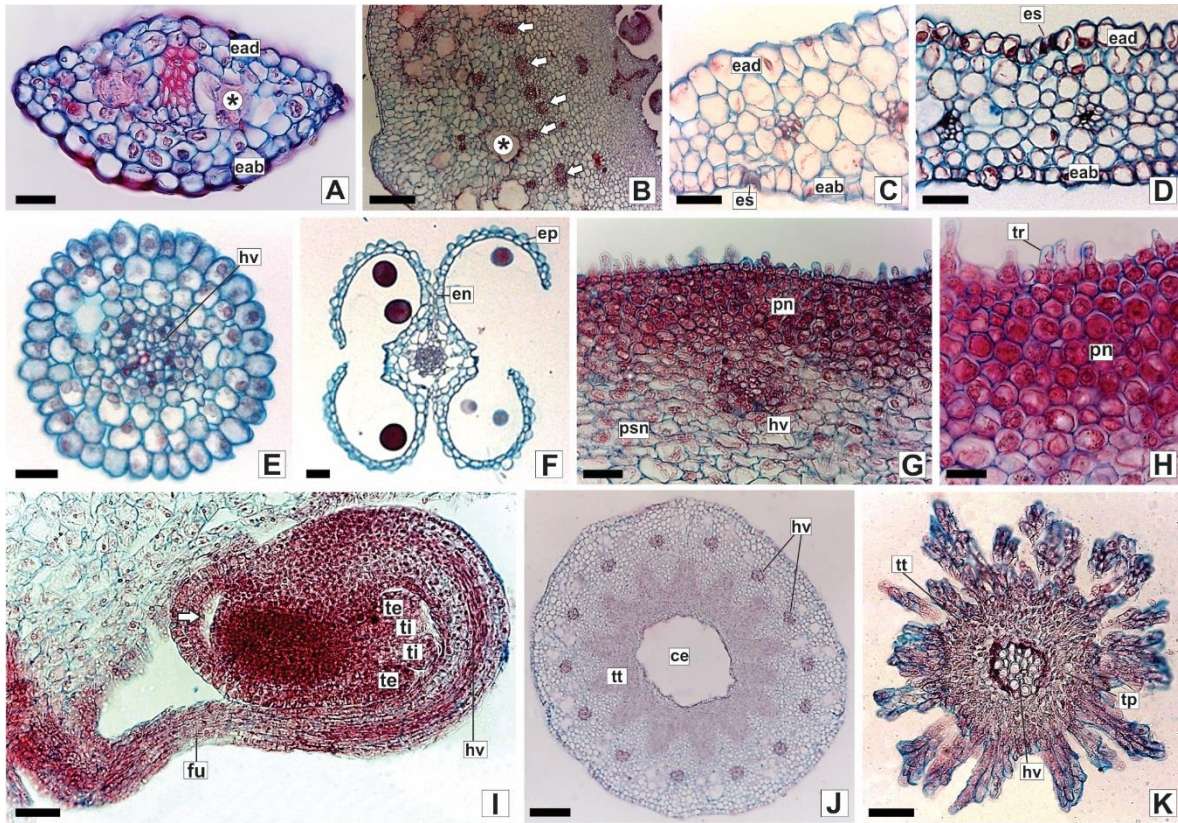


Figura 9. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de verticilos florales en secciones transversales de *Echinopsis tubiflora*. **A.** Bractéola. **B.** Detalle del pericarpelo, las flechas indican el arreglo de los haces vasculares que lo inervan. **C.** Tépalos sepaloide. **D.** Tépalos petaloide. **E.** Detalle de filamento libre, mostrando el haz vascular anficribal. **F.** Antera madura. **G-H.** Porción del nectario floral. **H.** Detalle del parénquima nectarífero. **I.** Óvulo circinótropo en sección longitudinal, la flecha indica la cámara de aire. **J.** Estilo, observe el canal estilar rodeado de tejido de transmisión y los haces vasculares en disposición de anillo. **K.** Detalle de lóbulo estigmático lineal y papiloso (eab= epidermis abaxial; ead= epidermis adaxial; en= endotecio; ep= epidermis; fu= funículo; ti= tegumento interno; pn= parénquima nectarífero; te= tegumento externo; tp= tejido parenquimático; ce= canal estilar; psn= parénquima subnectarífero; es=estoma; tr=tricoma; tt= tejido de transmisión; hv= haz vascular; *= cavidad secretora de mucílago). Escalas: A, E, G= 30µm; B= 400µm; C, D, F, I, K= 50 µm; H= 20µm; J= 200µm.

Estructura del nectario floral

Se han encontrado muchas similitudes en la estructura de las cámaras nectaríferas de las especies analizadas. En todas las especies, el nectario floral se ubica por encima del ovario, el tejido nectarífero se diferencia en la pared interna del tubo floral, formando un anillo en la base de la serie interna de los filamentos estaminales soldados entre sí y adnatos al tubo. Se diferencia una epidermis uniestratificada con tricomas unicelulares (Figs. 9G, H y 10A-D), con nectarostomas a través de los cuales se secreta el néctar, y un parénquima nectarífero homogéneo, constituido por 8-10 estratos de células pequeñas (Fig. 9G, H). Se observaron trazas de xilema y floema subyacentes al tejido nectarífero, las que se corresponden con las trazas vasculares de los filamentos (Fig. 9G). Para mayor detalle de la estructura del nectario floral ver capítulo 4.

La extensión del tejido nectarífero en el interior del hipanto varía en las diferentes especies, siendo notablemente más extendida y desarrollada la cámara nectarífera de las especies con especialización fenotípica a la esfingofilia (*E. ancistrophora*, *E. atacamensis*, *E. terscheckii*, *E. tubiflora*), en comparación con las especies melitófilas (*E. aurea*, *E. haematantha*, *E. thionantha*).

Ultraestructura de las paredes de la cámara nectarífera

Se estudió la ultraestructura del nectario floral de *Echinopsis terscheckii*, al momento de preantesis y antesis floral. El análisis revela diferencias en el contenido celular entre los estadios en preantesis y antesis floral (Fig. 10A-D).

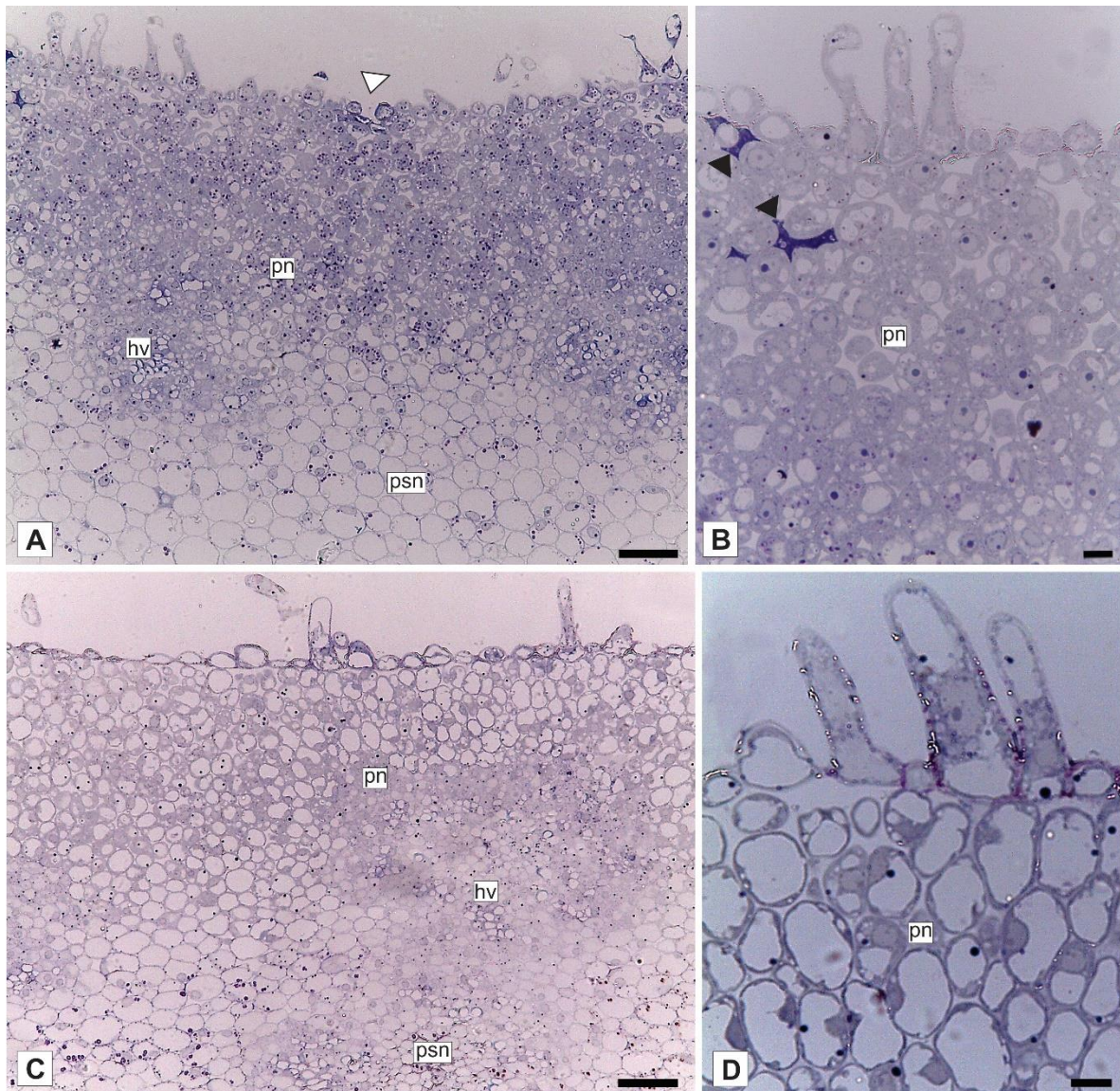


Figura 10. Cortes semifinos de secciones transversales del nectario floral de *E. terscheckii*. **A-B.** Etapa de preantesis floral. **A.** Sección transversal de una porción de la estructura secretora, en la epidermis se observa un estoma (triángulo blanco). **B.** Detalle de parénquima nectarífero, note la acumulación de sustancia en los espacios intercelulares del tejido (triángulos negros). **C-D.** Antesis floral. **C.** Sección transversal de una porción de la estructura secretora. **D.** Detalle de epidermis y parénquima nectarífero, observe las vacuolas que ocupan gran parte del citoplasma celular. Abreviaturas: hv= haz vascular; pn= parénquima nectarífero; psn= parénquima subnectarífero. Escala: A, C= 50µm; B, D= 10 µm.

En preantesis, los tricomas epidérmicos que tapizan la pared de la cámara nectarífera, presentan un núcleo prominente en posición basal, y citoplasma denso que muestra características de actividad metabólica elevada, con numerosas mitocondrias y abundantes amiloplastos compuestos (Fig. 11A, B). Hacia la base, la pared celular del pelo que entra en contacto con el tejido secretor, se presenta ensanchada (Fig. 11A, C). No se observaron plasmodesmos en la conexión entre la epidermis y el parénquima nectarífero (Fig. 11D). El parénquima nectarífero muestra células con características similares a las de los tricomas epidérmicos, citoplasma rico y activo, con abundantes mitocondrias, retículo endoplasmático, dictiosomas, plastidios grandes y compuestos, con 2-3 granos de almidón, y numerosas vacuolas de pequeñas dimensiones (Fig. 11E, F). Las células de este tejido se encuentran interconectadas a través de numerosos campos de puntuación con plasmodesmos (Fig. 11F).

En anthesis floral, los tejidos del nectario presentan ciertas diferencias ultraestructurales con respecto a la etapa de preantesis. En el citoplasma de los tricomas epidérmicos persisten los amiloplastos aunque contienen granos de almidón algo degradados respecto a la preantesis (Fig. 12A, B), además, se observa abundante retículo endoplasmático rugoso (Fig. 12B). En el extremo de los tricomas se pudieron observar restos de aparente secreción liberándose por ruptura de la cutícula (Fig. 12C). No se observaron plasmodesmos que comuniquen los citoplasmas de células epidérmicas, ni entre éstas y el tejido secretor subyacente (Fig. 12D). El parénquima nectarífero muestra un citoplasma menos denso que en la etapa de preantesis; aunque se siguen observando mitocondrias de forma y tamaño conservado, y se registraron mitocondrias parcialmente degradadas (Fig. 12E). En los espacios intercelulares se observa abundante material electrodense, esto sugiere que la secreción azucarada se acumula en estos espacios (Fig. 12F).

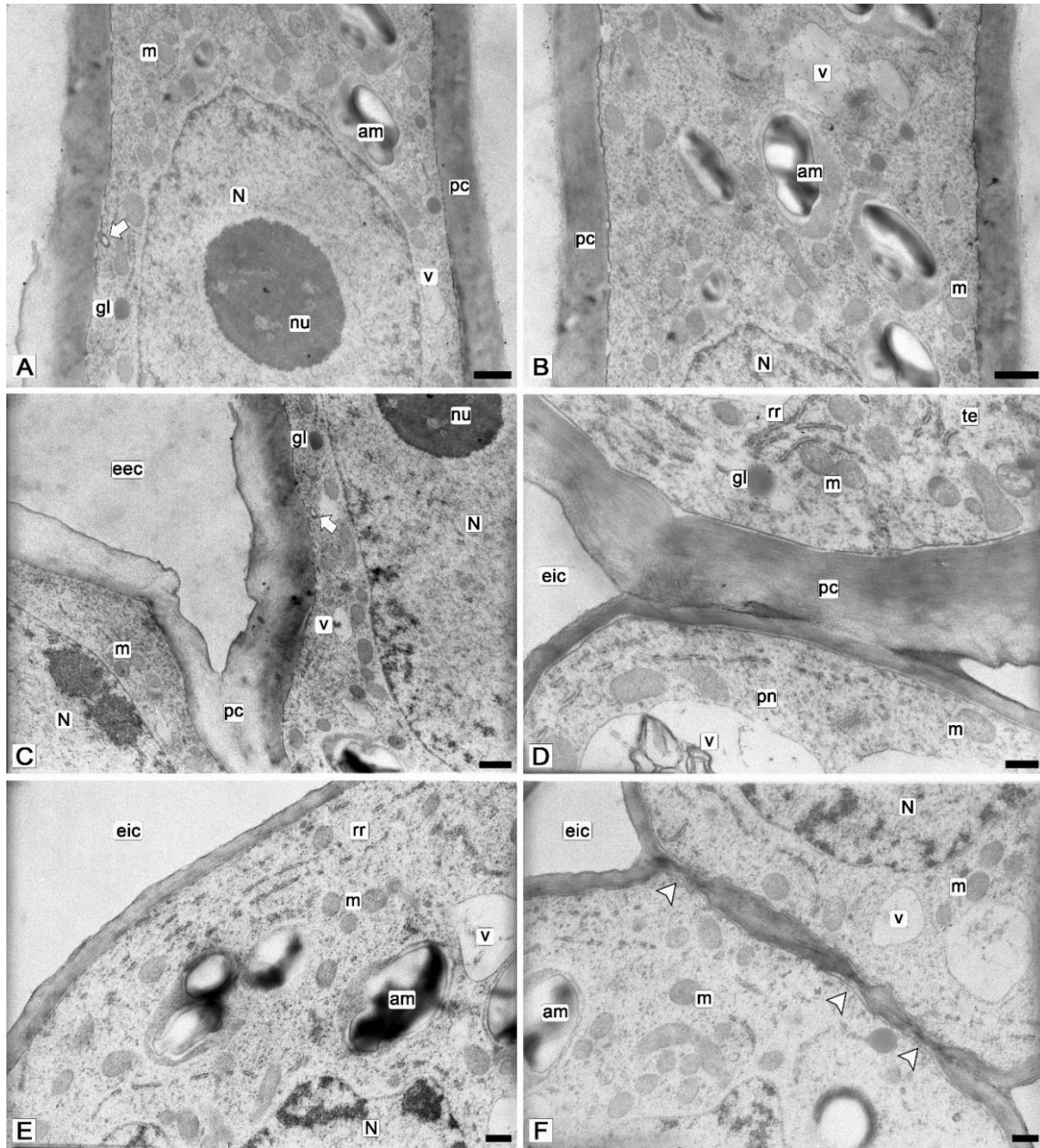


Figura 11. Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión (MET) de nectario floral en preantesis de *E. terscheckii*. **A.** Porción proximal de un tricoma epidérmico, mostrando núcleo de grandes dimensiones y nucléolo prominente, las flechas blancas señalan una pequeña vacuola fusionándose con la membrana celular; note las paredes celulares ensanchadas hacia la base del tricoma. **B.** Detalle de citoplasma granuloso denso del tricoma, note abundantes mitocondrias, vacuolas de pequeñas dimensiones, abundantes amiloplastos compuestos y escasos glóbulos lipídicos. **C.** Conexión entre dos tricomas epidérmicos, mostrando porciones de los núcleos de ambas células, ocupando una posición basal; las flechas blancas indican una vacuola fusionándose con la membrana celular. **D.** Conexión entre tricoma epidérmico (posición superior) y parénquima nectarífero

(posición inferior), observe las paredes celulares de diferentes grosores, y la ausencia de plasmodesmos entre ambas células. **E.** Detalle de citoplasma denso de una célula parenquimatosa nectarífera, mostrando plastidios con varios granos de almidón, pequeñas vacuolas, retículo endoplasmático rugoso; note el espacio intercelular. **F.** Detalle de conexión entre dos células del parénquima nectarífero, las cabezas de flechas blancas señalan los campos de puntuación con plasmodesmos que comunican los citoplasmas de las células del tejido secretor. Abreviaturas: am= amiloplasto; d= dictiosoma; eec= espacio extracelular; eic= espacio intercelular; gl= glóbulo lipídico; m= mitocondria; N= núcleo; nu= nucléolo; pc= pared celular; pn= parénquima nectarífero; rr= retículo endoplasmático rugoso; te= tricoma epidérmico; v= vacuola. Escala: A-C= 1µm; D-F= 500nm.

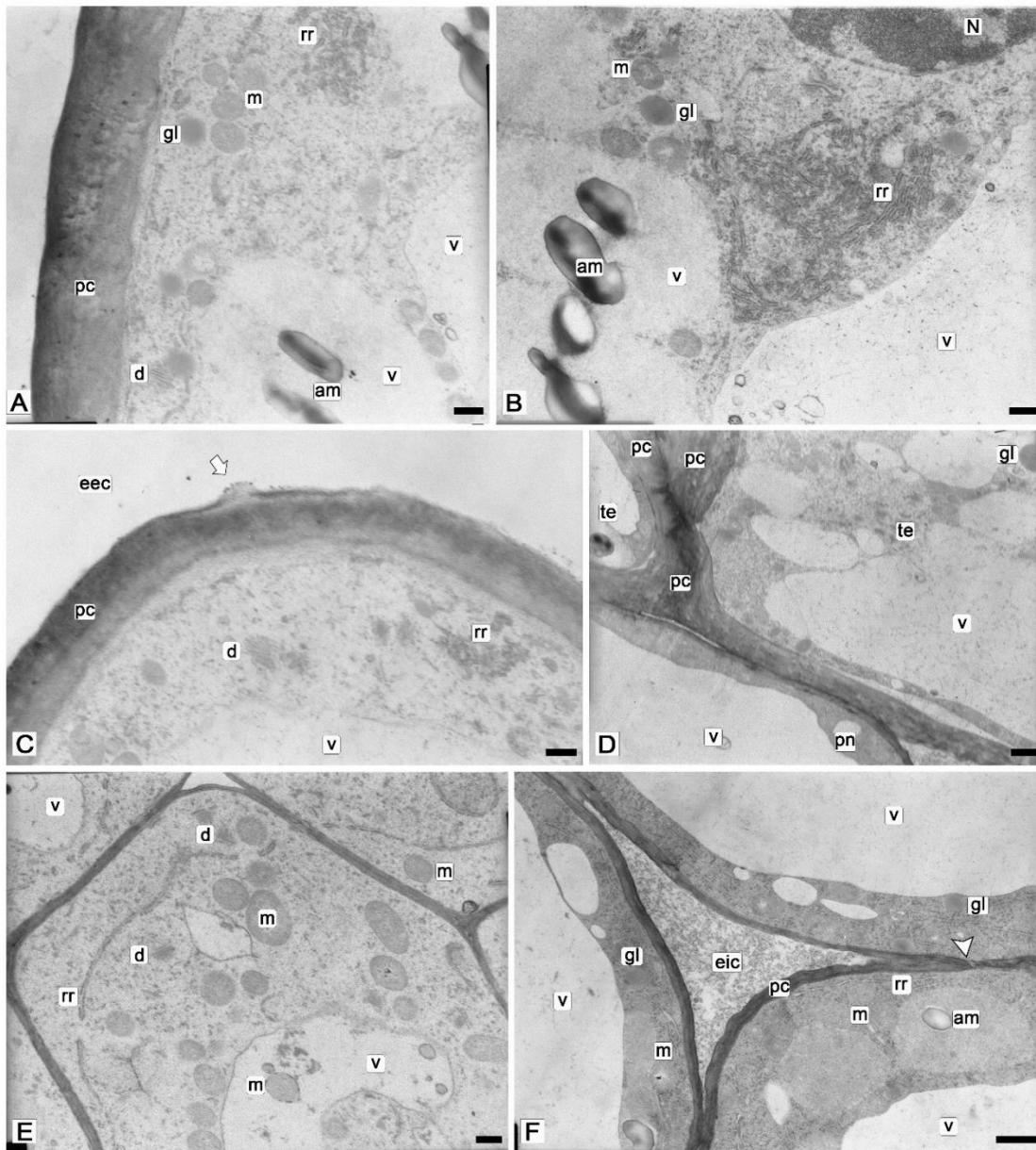


Figura 12. Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de transmisión (MET) de nectario en antesis floral de *E. terscheckii*. **A.** Porción de tricoma epidérmico, observe el citoplasma menos electrodensito que en preantesis, y con vacuolas de mayores dimensiones. **B.** Detalle de citoplasma de tricoma epidérmico, con plastidios con granos de almidón parcialmente degradados; note la acumulación de retículo endoplasmático rugoso en el citoplasma. **C.** Detalle de porción apical de tricoma epidérmico con restos de aparente secreción que quedan expuestos a través de microcanales de la cutícula. **D.** Conexión entre dos tricomas epidérmicos y una célula del parénquima nectarífero subyacente; en ambos tejidos, vacuolas de grandes dimensiones relegan el citoplasma hacia los márgenes de las células. **E.** Detalle de células del tejido nectarífero, observe citoplasma menos denso y mitocondrias en aparente degeneración. **F.** Detalle de espacio intercelular en el tejido nectarífero, con material electrodensito homogéneo, sugiere que la secreción azucarada se acumula en estos espacios; note amiloplastos parcialmente degradados, y plasmodesmo conectando citoplasmas (cabeza de flecha blanca). Abreviaturas: am= amiloplasto; d= dictiosoma; eec= espacio extracelular; eic= espacio intercelular; gl= glóbulo lipídico; m= mitocondria; N= núcleo; nu= nucléolo; pc= pared celular; pn= parénquima nectarífero; rr= retículo endoplasmático rugoso; te= tricoma epidérmico; v= vacuola. Escala: A-C, E= 500nm; D, F= 1µm.

DISCUSIÓN

Morfología Floral

Echinopsis tubiflora y *E. ancistrophora* son cactáceas endémicas de Argentina, con flores esfingófilas que representan un caso de evolución convergente dentro del género en términos de adaptación floral a la polinización por polillas (Schlumberger & Renner, 2012). Sin embargo, para la última especie se ha registrado una remarcable variación de caracteres florales en diferentes poblaciones, relacionados a longitud del tubo floral, que fueron asociados a diferentes volúmenes de néctar producidos, y a variaciones en el momento de antesis, a lo largo del rango de su distribución geográfica, sugiriendo una diferenciación incipiente a nivel de poblaciones en aparente adaptación local a la polinización por abejas o mariposas nocturnas (Schlumberger *et al.*, 2009). De acuerdo a Barthlott & Hunt (1993) y Pimienta-Barrios & del Castillo (2002) las características de las flores de *E. tubiflora*, *E. ancistrophora*, *E. atacamensis* y *E. terscheckii*, tales como el perigonio blanco, el tubo floral estrecho y la antesis nocturna se corresponden con los de típicas flores esfingófilas, similar a lo encontrado en otros miembros de la familia (Silva & Sazima, 1995; Almeida *et al.*, 2010; Pimienta-Barrios & del Castillo, 2002). Mientras que

E. aurea, *E. haematantha* y *E. thionantha*, presentan una forma de tazón, con un tubo más corto y colores que van desde amarillo, anaranjado hasta rojo, caracteres florales típicos de flores melitófilas.

El tejido en el que se halla hundido el ovario ínfero de los cactus llamado receptáculo, también es conocido como pericarpelo (Booke, 1980; Buxbaum, 1953; Barthlott & Hunt, 1993; Anderson, 2001). Las características anatómicas de este tejido demostraron ser muy conservadas en las especies de *Echinopsis* analizadas. Sin embargo, características epidérmicas, como la forma o el espesor de la cutícula, la presencia de cristales, o la presencia de una o más capas de hipodermis, podrían ser caracteres realmente útiles para separar grupos lejanamente emparentados (observaciones personales en especies mexicanas de la tribu Pachycereeae).

En las especies de *Echinopsis* estudiadas, al igual que en la mayoría de los géneros de la familia, las flores surgen solitarias a partir de una areola. Sin embargo, *Pereskia* es el único género donde se encuentran especies que presentan verdaderas inflorescencias naciendo de una misma areola (Tiagi, 1955; Anderson, 2001).

Una constelación de caracteres hace única a las flores de los cactus: muchas piezas periánticas débilmente diferenciadas como sepaloideas o petaloideas, un androceo multiestaminado que surge de manera centrífuga, y un ovario unilocular ínfero formado por la fusión de un número variable de carpelos, con numerosos óvulos de placentación parietal (Booke, 1980; Nobel, 1995). De acuerdo a Ronse De Craene (2013), por la presencia de estos rasgos florales, la familia Cactaceae representa un clado altamente derivado dentro del core Caryophyllales. Hay dos interpretaciones acerca del aumento del número de piezas del perigonio. Por un lado, Ronse De Craene (2007, 2008) explica dicho aumento como resultado de la inclusión de brácteas en la flor. Por otro lado, Brockington *et al.* (2009) lo relacionan a una mayor plasticidad y un mayor número de órganos reproductivos. Hay argumentos a favor de ambas interpretaciones, pero el hecho de que las flores de cactus sean generalmente solitarias (excepto en algunas especies de *Pereskia*) apoya la posibilidad de una amalgama de brácteas de inflorescencias vacías alrededor de una flor terminal (Ronse De Craene, 2013).

El tipo de flor más primitivo de la familia se encuentra en el género basal *Pereskia*, con flores diurnas, de tamaño mediano, radiadas o en forma de disco, con numerosos estambres y un perigonio blanco, amarillo o rosa (Grant & Grant, 1979). Las flores de *Echinopsis* presentan tubos florales desarrollados, formados por la fusión congénita de las piezas del perigonio y por las bases de parte del androceo. Se ha propuesto que la morfología tubular de las flores representa una manera de canalizar el acceso al centro floral donde el néctar usualmente se acumula (Endress, 1994).

En general, las flores de Cactaceae no muestran una distinción clara entre las escamas (brácteas) externas, y las piezas sepaloideas y petaloideas, que interactúan progresivamente a lo largo del eje (Tiagi, 1955; Ronse De Craene, 2013), excepto por algunas especies de *Pereskia* que muestran una transición abrupta entre las brácteas y las partes del perigonio (Boke, 1966). Sin embargo, en las especies de *Echinopsis* aquí analizadas, algunos rasgos anatómicos pueden ser útiles para diferenciar a las piezas del perigonio.

Anatomía Floral

La anatomía de las piezas del perigonio denota ser conservada en todas las especies de *Echinopsis* analizadas. Se puede diferenciar a las piezas externas de las más internas por el número de capas del mesófilo y por la epidermis levemente papilosa en los tépalos petaloideas. La presencia de espacios intercelulares en el mesófilo y papilas epidérmicas en la cara adaxial permite un eficiente despliegue del color debido a un reflejo diferencial de la luz (Endress, 1994). Adicionalmente, la presencia de papilas en la superficie de pétalos (presentes comúnmente en muchas angiospermas), podría estar involucrada en la efusión de fragancias cuando las piezas presentan glándulas de olor u osmóforos (Vogel, 1990). Comúnmente en angiospermas, la anatomía de los sépalos verdes se parece a la anatomía de hojas por la presencia de una o dos capas de parénquima en empalizada en su lado dorsal que está usualmente expuesto, mientras que los pétalos son más delgados, con un parénquima simple que frecuentemente muestra grandes espacios de aire (Endress, 1994). Fuentes-Peréz *et al.* (2009) postulan que la pared periclinal gruesa de las células epidérmicas registrada en especies de *Opuntia*, probablemente ayuda a la economía hídrica

de la flor antes y durante la polinización. Sin embargo, este carácter no ha sido observado en las especies de *Echinopsis*.

Por otro lado, los caracteres de la arquitectura de la hoja pueden ser una fuente importante de evidencia para las interpretaciones filogenéticas, tanto a nivel específico como supraespecífico. Los patrones de venación foliar son una fuente de evidencia taxonómica que confirma la existencia de algunos grupos apoyados por caracteres morfológicos y moleculares (Andrés-Hernández & Terrazas, 2009; Andrés-Hernández *et al.*, 2012). Dado que la vascularización de hojas y tépalos es muy similar, estas piezas florales son consideradas hojas modificadas (Dickison, 1993). De manera que este carácter podría representar un carácter taxonómico importante. En las especies de *Echinopsis* analizadas, las nervaduras secundarias se ramifican a lo largo de toda la extensión de las piezas periánticas, uniéndose para formar areolas, sin embargo, hacia los márgenes del tépalo se observan libres. Las diferencias encontradas en la morfología del ápice y márgenes de las piezas sepaloideas y petaloideas en *Echinopsis* sugieren que se trata de rasgos útiles para contribuir a la diferenciación de ambos tipos de piezas en este género. Típicamente, la estructura de sépalos de las angiospermas suele presentar una base a menudo amplia con tres trazas vasculares y un ápice acuminado, mientras que la estructura de los pétalos suele ser de base pequeña con solo una traza vascular y un ápice amplio y a veces emarginado (Endress, 1994). Sin embargo, Tiagi (1955) ha reportado para Cactaceae que el número de haces vasculares provenientes del receptáculo que penetra en los tépalos no es siempre constante. Este último autor cita como ejemplos a *Pereskia bleo* DC. y *Opuntia dillenii* Haw., donde el número de haces que penetra en cada pieza disminuye, según su ubicación, desde el interior de la flor hacia el exterior, unos pocos tépalos externos reciben un haz vascular que inmediatamente se divide en tres, mientras que los tépalos más internos reciben varios haces. En las especies de *Echinopsis*, el número de haces vasculares que penetran tanto en piezas sepaloideas como petaloideas es numeroso y variable. Dentro de cada tépalo, las trazas vasculares se dividen repetidamente desde la base, y forman una red de venas que en corte transversal se observan como numerosos paquetes de haces colaterales, separados por grandes cavidades mucilaginosas.

El género *Echinopsis* se caracteriza por presentar estambres en dos series, una serie numerosa, espiralada en el tubo y otra serie menos numerosa, dispuesta en un anillo simple

en la fauce (Kiesling *et al.*, 2011), a diferencia de los géneros *Pereskia* y *Rhipsalis* que se caracterizan por presentar una única serie de estambres (Anderson, 2001). Leins y Erbar (1994) interpretaron que en Caryophyllales el androceo ancestral era multiestaminado y centrífugo, como en Cactaceae y Aizoaceae, donde muchos estambres surgen centrífugos en un anillo androecial primitivo.

Según Endress (1994), los estambres desarrollados pueden cumplir funciones adicionales relacionadas con la atracción óptica a los polinizadores. Un androceo desarrollado caracteriza a las “flores de polen” que proveen solo polen a sus polinizadores, o raramente pequeñas cantidades de néctar. Muchas de estas flores aparecen en taxones con androceo poliándrico, pero existen representantes de un gran número de familias con androceo oligoándrico que también presentan flores de polen especializadas (Endress, 1994). La polinización por abejas es obviamente un sistema de polinización muy exitoso, y ha sido adoptado por numerosas especies de cactus que pertenecen a diferentes tribus y géneros, y es probablemente la condición primitiva en la familia (Anderson, 2001). Dentro de las especies de *Echinopsis* analizadas, *E. ancistrophora*, *E. atacamensis*, *E. terscheckii* y *E. tubiflora* se caracterizan por ser generalistas, en las cuales se ha registrado la visita y polinización a través de abejas, un insecto no esperado de acuerdo a la especialización fenotípica a mariposas nocturnas que caracteriza a estas especies (de Viana *et al.*, 2001; Schlumpberger & Badano, 2005; Schlumpberger *et al.*, 2009; Ortega-Baes *et al.*, 2010; Gorostiague, 2015).

En cuanto a la anatomía del androceo, a diferencia de lo observado en *Echinopsis*, se reportó variación en la cutícula de la epidermis de filamentos en especies de *Opuntia* (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). En todas las especies analizadas, los haces vasculares de cada filamento, llegan hasta la porción superior de la antera. La presencia de un haz vascular concéntrico anficribal en los filamentos estaminales es un carácter compartido con varios miembros de la familia (Tiagi, 1955; Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010). Las anteras maduras de *E. tubiflora*, muestran la epidermis y un estrato de células que conforman el endotecio con engrosamientos fibrilares, semejante a lo registrado en otras especies de Cactoideae y de *Opuntia* (Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010).

El ovario unilocular de estas especies, está formado por la fusión de un número variable de carpelos, en donde se halla un número relativamente grande de óvulos (más de 1000 en *E. tubiflora*), de placentación parietal (Booke, 1980). Los lóbulos del estigma pueden ser las partes distales libres de los carpelos en un gineceo sincárpico (Endress, 1994).

El estilo en los cactus varía morfológicamente, puede ser corto y grueso, o largo y fino, cerrado o abierto (Arreola-Nava, 1997). Las especies de *Echinopsis* presentan estilo semicerrado, con múltiples capas de tejido de transmisión rodeando la cavidad estilar, similar a lo registrado para *Pereskia*, *Opuntia* y otros miembros de Cactoideae (Boke, 1963, 1966, 1968; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Fuentes-Pérez, 2004). Sin embargo, este carácter varía dentro de la familia, ya que se registró la presencia de un estilo sólido o cerrado en *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. (Almeida *et al.*, 2010).

El estigma de las especies de *Echinopsis* se encuentra anatómicamente estructurado de un modo similar al estilo, ya que representa una extensión del mismo. El número de lóbulos estigmáticos es variable inter- e intraespecíficamente, en concordancia con lo reportado por Tiagi (1955) para otras especies de la familia. Los lóbulos presentan epidermis papilosa, como en la mayoría de los grupos de angiospermas (Esau, 1987). De acuerdo a Endress (1994), el tamaño de la superficie estigmática es un rasgo de interés en la biología floral. En los cactus, el estigma de la mayoría de las flores presenta características adecuadas para el aterrizaje de insectos, debido a su ubicación por encima de las anteras (Grant & Grant, 1979; Ross, 1981; del Castillo & González-Espinosa, 1988). Las flores con un gran número de óvulos tienden a tener estigmas grandes y húmedos (Endress, 1994).

En la literatura no hay consenso en cuanto al tipo de óvulo característico de la familia, y según lo documentado en distintas investigaciones, se trata de un carácter variable. Si bien los óvulos campilótrofos aparecen como los más comunes (Boke, 1963; Hernandez-García & García-Villanueva, 1991; Núñez-Mariel *et al.*, 2001; Anderson, 2001; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009), Kiesling *et al.* (2011) citan al óvulo anátropo como característico. El tipo anfítropo caracteriza a especies de *Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose (Cisneros *et al.*, 2011), mientras que el tipo circinótropo, hallado en este estudio,

también fue encontrado en *O. dillenii* (Tiagi, 1955) y *E. phyllanthus* (Almeida *et al.*, 2010).

La morfología y anatomía de las especies de *Echinopsis* analizadas evidencian una organización floral (Bauplan) típica de las cactáceas, coincidentemente con lo descrito en otros taxones (Almeida *et al.*, 2010; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). En general, las flores de las cactáceas muestran diversidad en las características florales, aunque evidencian una alta uniformidad desde el punto de vista estructural y anatómico (Mandujano *et al.*, 2010). Sin embargo, ciertos rasgos anatómicos florales permiten diferenciar a las especies.

Estructura del nectario floral

De acuerdo a Pimienta-Barrios & del Castillo (2002) los nectarios florales de las cactáceas usualmente residen en la zona basal del estilo, formando una cámara en la base del receptáculo (tubo floral), donde el néctar se acumula. Otros estudios realizados en la familia, revelan que el néctar se secreta en un receptáculo anular en los géneros *Pereskia* y *Rhipsalis*, o a lo largo de la porción basal del hipanto donde pueden aparecer cámaras de néctar formadas por diferentes órganos (Zandonella. 1977; Barthlott & Hunt, 1993; Nassar *et al.*, 1997). En las cinco especies de *Opuntia* estudiadas por Fuentes-Pérez *et al.* (2009) el nectario se halla debajo de la región de inserción de los filamentos más internos, rodeando la base del estilo. En *Epiphyllum phyllanthus* la estructura nectarífera se extiende desde la base hasta la mitad de la pared interna del hipanto (Almeida *et al.*, 2010). En apoyo a lo que describe Anderson (2001) para ejemplares de la familia, *E. tubiflora* evidencia una diferenciación en la pared interna del hipanto, asociada a la base de los filamentos, región en la cual se secreta una pequeña cantidad de néctar. De acuerdo a Bernardello (2007), este nectario se clasifica como nectario hipantial, al igual que el caso de *E. phyllanthus* y las especies de *Opuntia* estudiadas (Almeida *et al.*, 2010; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). Buxbaum (1953) reconoció para Cactaceae tres tipos de nectarios: disco, embudo y cámara nectarial, correspondiéndose este último con el tipo hipantial descrito por Bernardello (2007).

La estructura de los nectarios florales de las especies analizadas es muy conservada. Características anatómicas, tales como la presencia de tricomas epidérmicos, y parénquima nectarífero homogéneo con células pequeñas, fueron registradas en otras especies de cactáceas (Almeida *et al.*, 2010) y otros grupos de angiospermas (Fahn, 1979). En base al análisis realizado en las siete especies de *Echinopsis*, se puede considerar la forma de las células epidérmicas del nectario floral como un carácter de importante valor diagnóstico que permite agruparlas y diferenciarlas de especies cercanamente emparentadas (para mayor detalle ver capítulos 4 y capítulo 7).

Los nectarios florales definen a las “flores de néctar”, las cuales ofrecen recompensa a la mayoría de los grupos polinizadores, sin embargo, en muchas flores de néctar el polen también es colectado por los polinizadores (Endress, 1994). Estas estructuras secretoras, además, son caracteres con importancia taxonómica (Bernardello, 2007); para poder comprender el valor taxonómico de este carácter dentro de Cactaceae, se requerirá extender el estudio de estas estructuras a un mayor número de taxones.

Ultraestructura del nectario floral

Las características ultraestructurales observadas en el nectario floral de *E. terscheckii* son similares a las encontradas en otras angiospermas (Fahn, 1979; Nepi, 2007). Sin embargo, difieren de lo registrado para nectarios extraflorales en Cactaceae (Mauseth, 1982). De acuerdo a Nepi (2007), el citoplasma que caracteriza a células secretoras de néctar, usualmente es rico en ribosomas y mitocondrias en el momento de secreción, indicando un aumento en los requerimientos energéticos para la producción de néctar. Tanto el parénquima nectarífero como los tricomas epidérmicos que tapizan la cámara nectarífera muestran características que se corresponden con células metabólicamente activas, asociadas a procesos de transformación y secreción de néctar (Stefano, 2001; Nepi, 2007; Agüero *et al.*, 2018).

El néctar es exudado principalmente a través de estomas, como ocurre en otras cactáceas estudiadas y en la mayoría de las Eudicotiledóneas (Bernardello 2007; Agüero *et al.*, 2018, consultar capítulo 4 para mayor detalle). Sin embargo, el análisis ultraestructural sugiere que la secreción probablemente ocurre siguiendo un mecanismo mixto: vía simplasto, liberándose al exterior por ruptura de la cutícula de los tricomas y, vía apoplasto,

liberándose a través de los estomas que se distribuyen entre los tricomas. La secreción aparentemente comienza en el estadio de antesis, mientras que en la etapa de preantesis, la elevada actividad metabólica observada en el citoplasma de células epidérmicas y del parénquima nectarífero, probablemente se relaciona con procesos de movilización de azúcares previo a la etapa de secreción. La fuente de azúcar de los néctares puede ser de fotosíntesis directa en el nectario o en cualquier otra parte de la planta, o los azúcares pueden provenir de la hidrólisis de almidón almacenado temporariamente en el tejido secretor (Pacini *et al.*, 2003; Nepi, 2007). La ausencia de cloroplastos tanto en el parénquima nectarífero como en los tricomas epidérmicos de *E. terscheckii*, sugiere que el azúcar no se produce por fotosíntesis en estos tejidos, sino que es movilizado y almacenado allí en amiloplastos, para luego ser hidrolizado y utilizado durante la fase de síntesis durante la preantesis floral.

CONCLUSIONES

*El *Bauplan* anatómico floral de *Echinopsis* demostró ser conservado en relación al *Bauplan* de la familia, como era de esperar, las diferencias encontradas dentro del género representan al *modo* floral (*sensu* Endress, 1994), es decir, en lo que refiere a rasgos tradicionalmente asociados a los procesos de polinización (especialmente en cuanto a forma, tamaño, color y recompensa para polinizadores).

*La ultraestructura del nectario floral de *E. terscheckii* reveló que los tricomas epidérmicos que tapizan la cámara nectarífera muestran características de células metabólicamente muy activas, lo que podría indicar que la secreción de néctar podría seguir un mecanismo mixto: a través de estomas y a través de rotura de la cutícula de tricomas.

CAPÍTULO 4

¿CUÁN CONSERVADA ES LA ESTRUCTURA DEL NECTARIO FLORAL EN ESPECIES DE DIFERENTES GÉNEROS POLINIZADAS POR AVES?



INTRODUCCIÓN

Entre las recompensas que producen las flores se destaca el néctar, principal fuente de alimento para muchos polinizadores. Esta sustancia energética es secretada por los nectarios, estructuras que suelen presentarse en las plantas que son polinizadas por animales como insectos, aves o mamíferos pequeños (Fahn, 1978; Nepi, 2007). Desde el punto de vista anatómico, estas estructuras secretoras varían ampliamente en morfología y ontogenia (Fahn, 1979, 1988; Durkee, 1983; Smets *et al.*, 2000). Muchos investigadores utilizaron la forma y la ubicación de los nectarios, como características taxonómicas mediante la cual llegaron a sostener teorías sobre las interrelaciones entre especies, géneros y familias (Bonnier, 1879; Schniewind-Thies, 1897; Brown, 1938; Fahn, 1978).

Los nectarios florales fueron ampliamente estudiados en numerosas familias. Entre los trabajos recientes podemos citar los estudios de estructura y ultraestructura de nectarios florales de *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich (Cucurbitaceae) (Fahn & Shimony, 2001); el análisis de la ultraestructura del tejido nectarífero de las flores de *Prunus persica* (L.) Batch cv. Forastero (Rosaceae) (Radice & Galati, 2003); la contribución de Galetto (2006) sobre morfología y anatomía floral en nectarios en especies de Apocynaceae-Asclepiadoidea; el trabajo de Solís & Ferrucci (2009), sobre la morfoanatomía y ontogenia de los nectarios florales de *Cardiospermum grandiflorum* Sw. y *Urvillea chacoensis* Hunz. (Sapindaceae); la contribución de Solís *et al.* (2017), autores que estudiaron la morfología y estructura de los nectarios florales en diversas tribus de Sapindaceae s.s. y sus implicancias sistemáticas; y el trabajo de Tölke *et al.* (2018) quienes abordaron la diversidad de las secreciones del nectario floral y la ultraestructura, y su potencial para la sistemática de Anacardiaceae.

La gran diversidad de fenotipos florales presentes en las angiospermas se ha vinculado tradicionalmente a la especialización a diferentes grupos de polinizadores, basados en el concepto de síndromes de polinización (Fenster *et al.*, 2004). La definición de síndrome floral se basa en rasgos florales estrechamente relacionados con el proceso de polinización, incluida la forma, el tiempo y la duración de la antesis, el color, el tamaño y la producción de sustancias que pueden funcionar como atrayentes o recompensas florales para los polinizadores, como aceites, néctar, olores y fragancias. Se ha propuesto que el grupo de polinizadores (o al menos el polinizador más efectivo) que visitan una determinada especie de planta puede predecirse basándose en estos rasgos (Faegri & van der Pijl, 1979; Buchmann, 1987; Baker & Baker, 1990; Fenster *et al.*, 2004; Neff &

Simpson, 2005). Debido a que la mayoría de los sistemas de polinización estudiados han demostrado ser generalistas, independientemente de las características florales de una planta, el contexto ecológico donde se desarrolla puede determinar las relaciones mutualistas que establece. Por esta razón, se han propuesto diferentes formas de especialización de una especie en polinización: fenotípicas (asociadas con rasgos florales de la especie), funcionales (asociadas con los gremios de visitantes de flores) y ecológicas (asociadas con el número de especies que visitan) (Waser *et al.*, 1996; Ollerton *et al.*, 2007).

Las flores de las diferentes especies de Cactaceae suelen ser variables básicamente en cuanto a forma y color. La variación en este conjunto de rasgos define los fenotipos florales, que nos permiten vincular los cactus con ciertos grupos de polinizadores especializados, como polillas, abejas, aves y murciélagos (Grant & Grant, 1979; Gibson & Nobel, 1986; Valiente-Banuet *et al.*, 1996; de Viana *et al.*, 2001; Pimienta-Barrios & del Castillo, 2002). Los diferentes tipos de flores descritos para la familia suelen estar estrechamente relacionados con los animales que visitan las flores y las polinizan de manera eficiente (Gibson & Nobel, 1986; Pimienta-Barrios & del Castillo, 2002). Sin embargo, la evidencia actual indica que, aunque los cactus pueden exhibir una especialización fenotípica, la mayoría de los sistemas de polinización no son tan estrictos. Sus flores pueden ser visitadas por una variedad de animales taxonómicamente diferentes, incluidos algunos inesperados para un determinado síndrome de polinización (Waser *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 2001; Ollerton *et al.*, 2007; Walter, 2010; Ortega-Baes *et al.*, 2011; Larrea-Alcázar & López, 2011; Alonso-Pedano & Ortega-Baes, 2012; Gorostiague & Ortega-Baes, 2016; Gorostiague & Ortega-Baes, 2017).

La polinización por aves se ha registrado en un gran número de especies de cactáceas de diferentes linajes, a través de todo su rango de distribución. Además, una proporción significativa de las especies en la familia presentan una especialización fenotípica a este tipo de polinización, e incluso se ha propuesto la existencia de linajes especializados (p. ej., los géneros *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Oreocereus*, *Matucana* Britton & Rose, *Melocactus* Link & Otto, entre otros; Anderson, 2001; Hunt, 2006). No obstante, la evidencia actual indica que las aves pueden polinizar tanto a especies de cactus con flores especializadas, como a aquellas especies que presentan flores adaptadas a la polinización por otros gremios de animales (Fleming *et al.*, 2001; Gorostiague &

Ortega-Baes, 2017). Este fenómeno sugiere que los rasgos florales no siempre son predictivos para los visitantes (Gorostiague & Ortega-Baes, 2016).

La tribu Trichocereae ha diversificado en el hemisferio sur, constituyendo la segunda tribu más grande de la subfamilia Cactoideae (Gibson & Nobel, 1986; Anderson, 2001). En el noroeste de Argentina, está representada por especies de los géneros *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis*, *Gymnocalycium*, *Harrisia*, *Oreocereus* and *Rebutia* (Hunt, 2006). *Echinopsis* es uno de los géneros más diversos en cuanto a formas de vida y fenotipos florales, e incluye todos los modos de polinización descritos para la familia. Según la filogenia molecular de Schlumberger & Renner (2012), *Echinopsis s.l.* es un grupo monofilético que incluye géneros estrechamente relacionados, tales como *Cleistocactus* y *Denmoza* (Anderson, 2001; Hunt, 2006). La presencia de especies polinizadas por aves se destaca dentro de este diverso linaje, incluyendo tanto a especies con flores especializadas a este gremio de animales (Gorostiague & Ortega Baes, 2016; Gorostiague, 2017), como a especies con flores con especialización fenotípica a las polillas (de Viana *et al.*, 2001; Schlumberger & Badano, 2005; Gorostiague & Ortega Baes, 2017). Estas características particulares hacen que este linaje sea interesante para evaluar las diferencias estructurales en sus flores que definen las interacciones mutualistas que el grupo establece con sus visitantes florales.

Los nectarios florales son estructuras que producen y ofrecen néctar, una solución rica en azúcar que interviene en las interacciones planta-animal (Pacini *et al.*, 2003). Estas estructuras secretoras varían en morfología, anatomía, topología y modo de secreción de néctar (Fahn, 1952, 1954, 1979, 1988; Durkee, 1983; Smets *et al.*, 2000). Se ha sugerido que la variación registrada en nectarios florales está estrechamente asociada con su función (Fahn, 1979; Giuliani *et al.*, 2012) y también está relacionado con el tipo de polinizador (Baker & Baker, 1983; Pacini *et al.*, 2003). En general, el nectario floral de cactus presenta forma de un anillo continuo con tejido glandular ubicado en la superficie interna del tubo floral, el mismo se origina por la conrescencia del androceo y el perianto, rodeando la base del estilo (Zandonella, 1977). Aunque es reconocido el valor ecológico del néctar como recurso energético para los polinizadores, la estructura de los nectarios florales ha sido poco estudiada en la familia (Stefano *et al.*, 2001; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2012, 2013; Agüero *et al.*, 2018).

En este contexto, se estudiaron los nectarios florales en especies de Trichocereae de diferentes géneros, con el fin de explorar las relaciones entre la estructura anatómica

del nectario floral y la especialización fenotípica floral en flores polinizadas por aves. Se analizó la morfo-anatomía del nectario en especies que presentan diferentes fenotipos florales: cuatro especies con especialización en polinización por aves (*Cleistocactus baumannii*, *C. hyalacanthus*, *C. smaragdiflorus* y *Denmoza rhodacantha*), y una especie con especialización floral a la polinización por polillas (*E. atacamensis*). Adicionalmente, el análisis incluyó a una especie con especialización fenotípica a la polinización por polillas, en la que no se registró la polinización de aves (*E. tubiflora*), con el fin de mejorar la comprensión de las relaciones planta-polinizador en esta tribu. Se esperaba encontrar diferencias en las características morfo-anatómicas de los nectarios entre las especies estudiadas, asociadas con los diferentes gremios de polinización.

RESULTADOS

Morfología floral

Las seis especies estudiadas presentan flores perfectas, epíginas, solitarias y sésiles, con hipantio desarrollado, cubiertas de brácteas que llevan pelos en las axilas. El perianto espiral está compuesto por numerosos segmentos lanceolados del mismo color o de un color diferente al del tubo, que se fusionan en la base que forma el tubo floral (Fig. 13A-F). Las flores de *Cleistocactus* y *Denmoza* muestran especialización fenotípica a aves. Las mismas son tubulares, con el limbo periántico apenas abierto, aparentemente actinomorfas o zigomorfas por curvatura del tubo. Las flores de *Cleistocactus* usualmente nacen lateralmente a lo largo de las porciones superiores de los tallos. (Fig. 13A-C), mientras que en *Denmoza* las flores aparecen en la porción superior del tallo (Fig. 13D). *Cleistocactus baumannii* tiene flores sigmoides de alrededor de $50,20 \pm 9,53$ cm de longitud, con pericarpelo, tubo floral y tépalos rojos (Fig. 13A). *C. hyalacanthus* exhibe flores ligeramente arqueadas, de color rojo claro a naranja, de aproximadamente 3,5-4 cm de longitud (Fig. 13B). *C. smaragdiflorus* tiene flores de 4,9 cm de longitud, con tubo floral recto, de color rosa, y tépalos verde esmeralda. (Fig. 13C). Las flores de *D. rhodacantha* tienen $49,1 \pm 7,9$ cm de longitud y varían en forma de recta a ligera o marcadamente sigmoide, dependiendo de su ubicación en el tallo; tanto el tubo floral como el perianto son de color rojo-magenta, el tubo exhibe escamas con pelos axilares blanquecinos (Fig. 13D). Las flores de *E. atacamensis* y *E. tubiflora* presentan especialización fenotípica esfingófila; tienen forma de embudo, de aproximadamente 124

± 2 y $128,6 \pm 18,6$ cm de longitud, respectivamente, con tépalos externos de color verde y tépalos internos blanco-cremosos (Fig. 13E-F).



Figura 13. Morfología floral de flores polinizadas por aves de la tribu Trichocereae. **A.** *Cleistocactus baumannii*, detalle de flor tubular sigmoidea. **B.** *C. hyalacanthus*, detalle de la porción superior del tallo con botones florales, flores en antesis y frutos. **C.** *C. smaragdiflorus*, detalle de flor tubular recta, note los tépalos verdes. **D.** *Denmoza rhodacantha*, detalle de botones florales y flores tubiformes en el ápice del tallo. **E.** *Echinopsis atacamensis*, detalle de flor infundibuliforme. **F.** *E. albispinosa*, planta y flor infundibuliforme. Fotografías: Valeria González (A-C), Pablo Gorostiague (D-E).

Morfología de la cámara de néctar

En las especies analizadas, la cámara de néctar está localizada por encima del ovario y por debajo de la inserción de la serie interna de estambres, ubicada en la pared interior de la porción basal del hipantio, formando un cilindro hueco que rodea el estilo. (Figs. 14A, E, H, 15A y 16A). En *C. baumannii*, en el extremo superior de la cámara se observa una estructura abierta de techo abovedado de parénquima no secretor (Fig. 14A). En *C. hyalacanthus* y *C. smaragdiflorus*, en la porción superior de la cámara los filamentos estaminales primarios permanecen fusionados en sus bases cuando comienzan a liberarse del tubo (Fig. 14E, H). En todos los casos, se forma una cámara de néctar semicerrada. *Denmoza rhodacantha* presenta una cámara con paredes altamente desarrolladas, que consiste en múltiples estratos de tejido nectarífero (Fig. 15A-C). En sección transversal, la pared de la cámara muestra un contorno ondulado, siguiendo un patrón de crestas y valles (Fig. 15E). En la parte superior de la cámara, un conjunto denso de estaminodios en forma de tricomas lanosos forma un tapón que cierra la cámara (Fig. 15A, B). Los estaminodios no son vascularizados, en algunos casos las bases son prolongaciones filiformes multicelulares que se originan en la porción superior del tejido nectarífero; éstos muestran, en la región proximal una epidermis papilosa, similar a la epidermis nectarífera, mientras que hacia la región distal se transforman en estructuras multicelulares, de células muertas y de epidermis lisa (Fig. 15G, H). *Echinopsis atacamensis* y *E. tubiflora* tienen cámaras nectaríferas semicerradas con una densa barrera de cientos de filamentos estaminales que rodean el estilo y protegen el néctar (Fig. 16B). En la parte superior de la pared de la cámara, se observan costillas verticales paralelas al eje del estilo, que se corresponden con la base de los filamentos fusionados al tubo (Fig. 16A).

Anatomía de la cámara de néctar

Los nectarios de las especies analizadas comparten similitudes estructurales: la pared de la cámara está compuesta por una epidermis uniestratificada, y un parénquima nectarífero homogéneo subyacente, delimitado por parénquima subnectarífero no secretor, con tejido vascular asociado. Sin embargo, las características epidérmicas permiten diferenciar a los géneros.

Epidermis nectarífera y secreción de néctar

En las tres especies de *Cleistocactus*, la epidermis nectarífera es glabra, con células epidérmicas propiamente dichas de cutícula delgada; en sección transversal, estas

células muestran un contorno cuadrangular o rectangular, con un núcleo prominente y una vacuola que ocupa gran parte del citoplasma celular (Fig. 14B, F, I). En *Denmoza*, la epidermis muestra tricomas unicelulares cortos, de $44,3 \pm 10,9 \mu\text{m}$ de longitud, con núcleos visibles localizados en la base o centro del tricoma, citoplasma denso y grandes vacuolas (Fig. 15D, F). En las especies de *Echinopsis*, la epidermis presenta tricomas unicelulares, con un gran núcleo en posición basal y citoplasma granuloso denso (Fig. 16C-E, F-H). En *E. atacamensis*, los tricomas tienen una longitud de $51,7 \pm 11,1 \mu\text{m}$, y se inclinan hacia el ostíolo cuando están cerca de los estomas, contribuyendo de esta manera a prevenir la evaporación del néctar (Fig. 16E, G). Estas características de las células epidérmicas coinciden con características de tejidos metabólicos activos, y podrían estar relacionadas con la producción de néctar y los procesos de secreción del mismo. Todas las especies estudiadas tienen estomas modificados (nectarostomas) de tipo anomocítico, que están involucrados en la exudación del néctar; están ubicados al mismo nivel de la epidermis o ligeramente hundidos, presentan cámaras subestomáticas conspicuas (Figs. 14C, F, 15F, 16E). En las especies de *Cleistocactus*, los estomas suelen ser escasos, pero se han registrado daños en la epidermis, presumiblemente por la acción de visitantes florales (p. ej., las interrupciones de la epidermis con una sustancia cristalizada se observan en *C. baumannii*, Fig. 14D).

Parénquima nectarífero

El tejido secretor se diferencia del parénquima de la base de los filamentos estaminales, que se encuentran adnatos al tubo floral y muestran cohesión entre sí. En sección longitudinal, la pared interna del tubo floral está formada por tejido nectarífero, mientras que el área que comprende el techo del ovario y la base del estilo consiste en parénquima no secretor (Fig. 14G, J). El parénquima nectarífero exhibe características de tejidos con alta actividad metabólica, probablemente relacionados con la transformación del néctar y los procesos de secreción. Es homogéneo, mostrando típicamente varias capas de células isodiamétricas; estas células son más pequeñas que las células del parénquima no secretor, de pared gruesa, con citoplasma granular denso y núcleo prominente, y se disponen de modo compacto (Figs. 14B, F, I, 15C, E y 16C). En las especies de *Cleistocactus* y *Echinopsis*, las células tienen vacuolas que contienen cristales de oxalato de calcio en forma de drusas y algunos cristales prismáticos. Además, el parénquima secretor muestra abundantes células con granos de almidón (cruz de Malta

en luz polarizada) (Figs. 14I, 16D). En *D. rhodacantha*, solo se observan granos de almidón en el parénquima nectarífero cerca de la epidermis.

Parénquima subnectarífero

El parénquima subnectarífero exhibe células isodiamétricas, de mayores dimensiones que las del tejido secretor, con vacuolas que ocupan la mayor parte del citoplasma celular, y abundantes granos de almidón, paredes delgadas y espacios intercelulares visibles (Figs. 14B, F, I, 15E, 16C).

Vascularización

El parénquima subyacente al parénquima subnectarífero contiene haces vasculares perfloemáticos en una disposición de anillo, que se corresponden con los haces vasculares de los filamentos estaminales y otros verticilos florales que se encuentran fusionados como parte del tubo floral a nivel del nectario. Estas trazas, delimitan el tejido secretor y son las que irrigan el nectario en las especies de *Cleistocactus* y *Echinopsis* (Figs. 14B, F, I, 16C, D). Sin embargo, en *D. rhodancatha*, la invasión de las paredes de la cámara de néctar es más compleja; trazas de xilema y floema originadas en el anillo vascular del parénquima subnectarífero penetran y se ramifican profundamente en el tejido nectarífero (Fig. 15C-E).

Los resultados obtenidos en este trabajo se resumen en la Tabla 3, que también incluye datos de fenotipo floral y literatura de la biología reproductiva de estas especies.

Tabla 3. Cuadro comparativo de características anatómicas de nectarios florales, fenotipos florales y biología reproductiva de las especies de la tribu Trichocereae del noroeste argentino analizadas.

Especies	Nectario Floral				Fenotipo floral	Polinizadores	Bibliografía donde se referencian polinizadores
	Tipo	Vascularización	Epidermis	Modo de secreción			
<i>Cleistocactus baumanii</i>	Cámara semicerrada	Haces vasculares de xilema y floema delimitan el parénquima nectarífero	Lisa	Estomas Holocrina	Ornitófilo	Colibríes	Gorostiague & Ortega Baes, 2016
<i>C. hyalacanthus</i>	Cámara semicerrada	Haces vasculares de xilema y floema delimitan el parénquima nectarífero	Lisa	Estomas	Ornitófilo	No hay información disponible	-----
<i>C. smaragdiflorus</i>	Cámara semicerrada	Haces vasculares de xilema y floema delimitan el parénquima nectarífero	Lisa	Estomas	Ornitófilo	Colibríes Abejas	Gorostiague & Ortega Baes, 2016
<i>Denmoza rhodacantha</i>	Cámara cerrada	Trazas de xilema y floema penetran en el	Papilosa	Estomas	Ornitófilo	Colibríes Halíctidos	Gorostiague, 2015

		parénquima nectarífero					Eggli & Giorgetta, 2015
<i>Echinopsis albispinosa</i> (<i>E. tubiflora</i>)	Cámara semicerrada	Haces vasculares de xilema y el floema delimitan el parénquima nectarífero	Con tricomas unicelulares	Estomas Tricomas	Esfingófilo	Abejas	Gorostiague, 2015
<i>E. atacamensis</i>	Cámara semicerrada	Haces vasculares de xilema y floema delimitan el parénquima nectarífero	Con tricomas unicelulares	Estomas Tricomas	Esfingófilo	Abejas Colibrí gigante	De Viana <i>et al.</i> , 2001 Schlumpberger & Badano, 2005

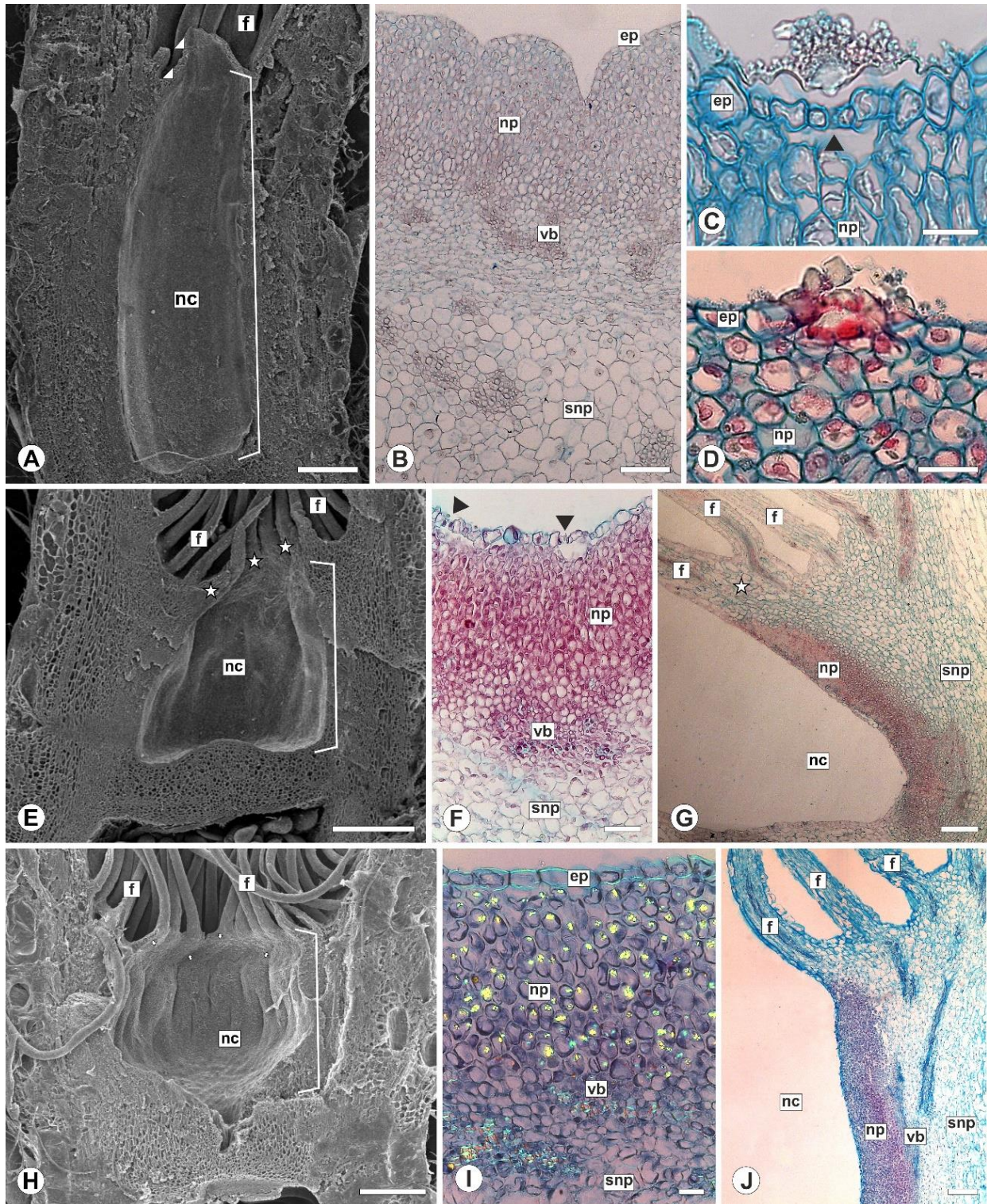


Figura 14. Morfo-anatomía del nectario floral en especies de *Cleistocactus*. **A-D.** *C. baumannii*. **A.** Fotomicrografía obtenida con microscopio electrónico de barrido (MEB) de la cámara nectarífera en sección longitudinal, note en la parte superior la estructura de techo-bóveda (punta de flecha blanca) formada por la fusión de la base de los estambres internos que comienzan a liberarse. **B.** Sección transversal del nectario floral bajo microscopio óptico (MO). **C.** Detalle de nectarostomas (punta de flecha negra) con remanentes de secreción cristalizada. **D.** Detalle de epidermis interrumpida con trazas de secreción cristalizada. **E-G.** *C. hyalacanthus*. **E.** Cámara nectarífera en sección longitudinal, note la base fusionada de los filamentos de la serie interna (estrella blanca), que se liberan en la porción

superior de la cámara (MEB). **F.** Sección transversal del nectario floral bajo MO. **G.** Sección longitudinal del nectario floral. **H-K.** *C. smaragdiflorus*. **H.** Cámara de néctar en sección longitudinal, las flechas blancas indican las bases de los filamentos fusionados (MEB). **I.** Corte transversal de nectario floral, con luz polarizada, los granos de almidón muestran la figura de una cruz de malta. **J.** Sección longitudinal de la cámara nectarífera. Abreviaciones: ep= epidermis; f= filamento; nc= cámara de néctar; np= parénquima nectarífero; snp= parénquima subnectarífero. Escalas: A= 2mm; B=100µm; C, I= 20µm; D = 30µm; E, H= 1mm; F= 50µm; G, K= 200µm.

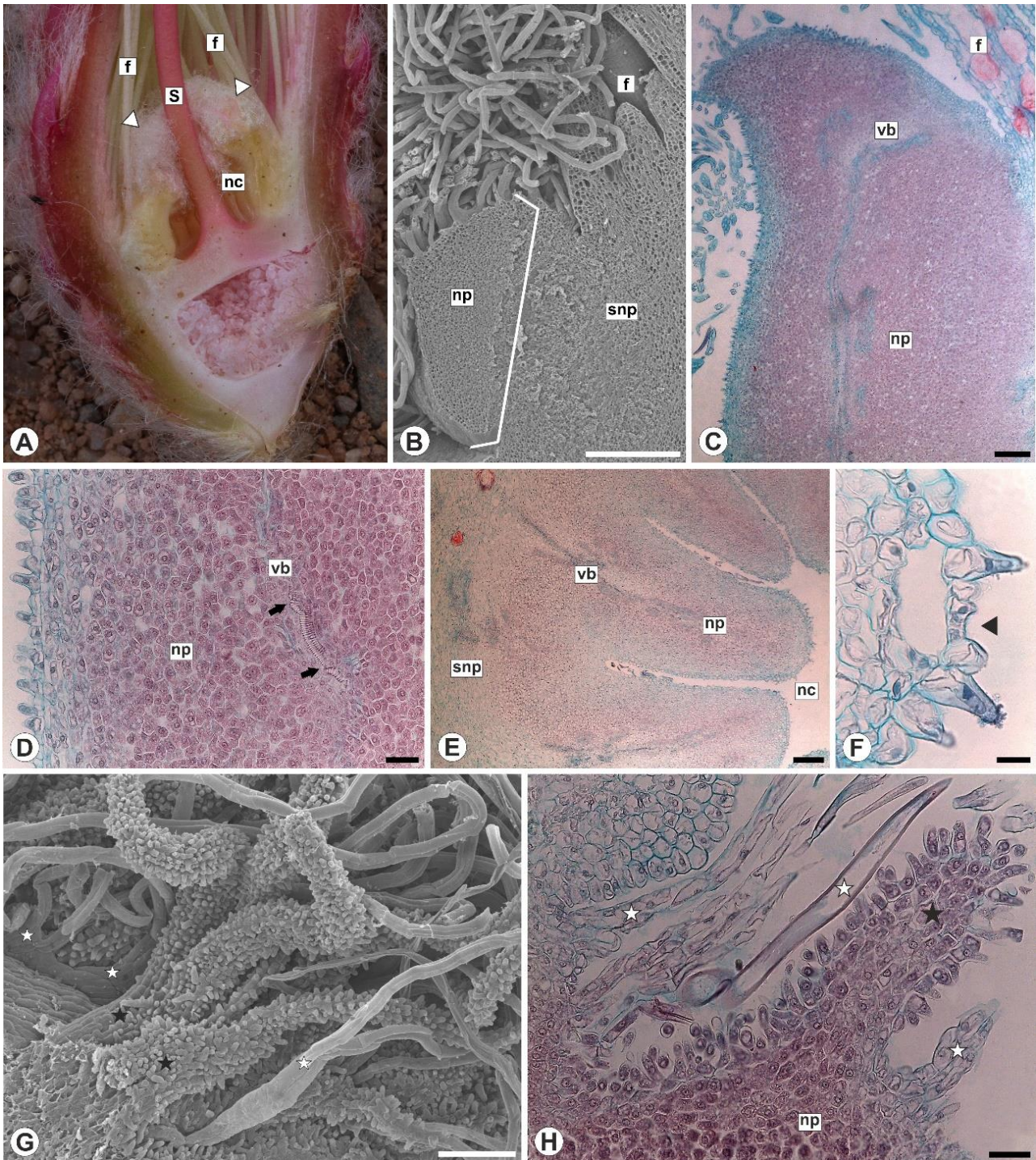


Figura 15. Morfo-anatomía del nectario floral de *Denmoza rhodacantha*. **A.** Parte basal de la flor en sección longitudinal, observe la cámara de néctar que rodea la base del estilo, con un "tapón" de tricomas lanosos (punta de flecha blanca) en la parte superior, junto a la serie interna de filamentos libres. **B.** Sección longitudinal de la pared del nectario floral (MEB). **C.** Fotomicrografía de sección longitudinal de la pared del nectario floral bajo MO. **D.** Detalle de una cresta que muestra trazas de xilema y floema que penetran profundamente en el parénquima nectarífero y se ramifican (flechas). **E.** Corte transversal de una porción del nectario floral, observe el patrón de picos y valles de las paredes de la cámara nectarífera, formada por parénquima nectarífero. **F.** Detalle de nectarostoma (cabeza de flecha), con cámara subestomática conspicua. **G.** Estaminodios nacidos en la porción superior de la cámara de néctar, observe la ramificación basal de los mismos (estrella negra), y la base de los tricomas multicelulares rizados (estrella blanca) (MEB). **H.** Detalle de la base de estaminodios no vascularizados (estrella negra), naciendo junto a tricomas lanosos (estrella blanca). Abreviaturas: f= filamentos; cn= cámara de néctar; pn= parénquima nectarífero; psn= parénquima subnectarífero; E= estilo; hv= haces vasculares. Escalas: B= 500 µm; C, E, G= 200 µm; F= 20 µm; D, H= 50 µm.

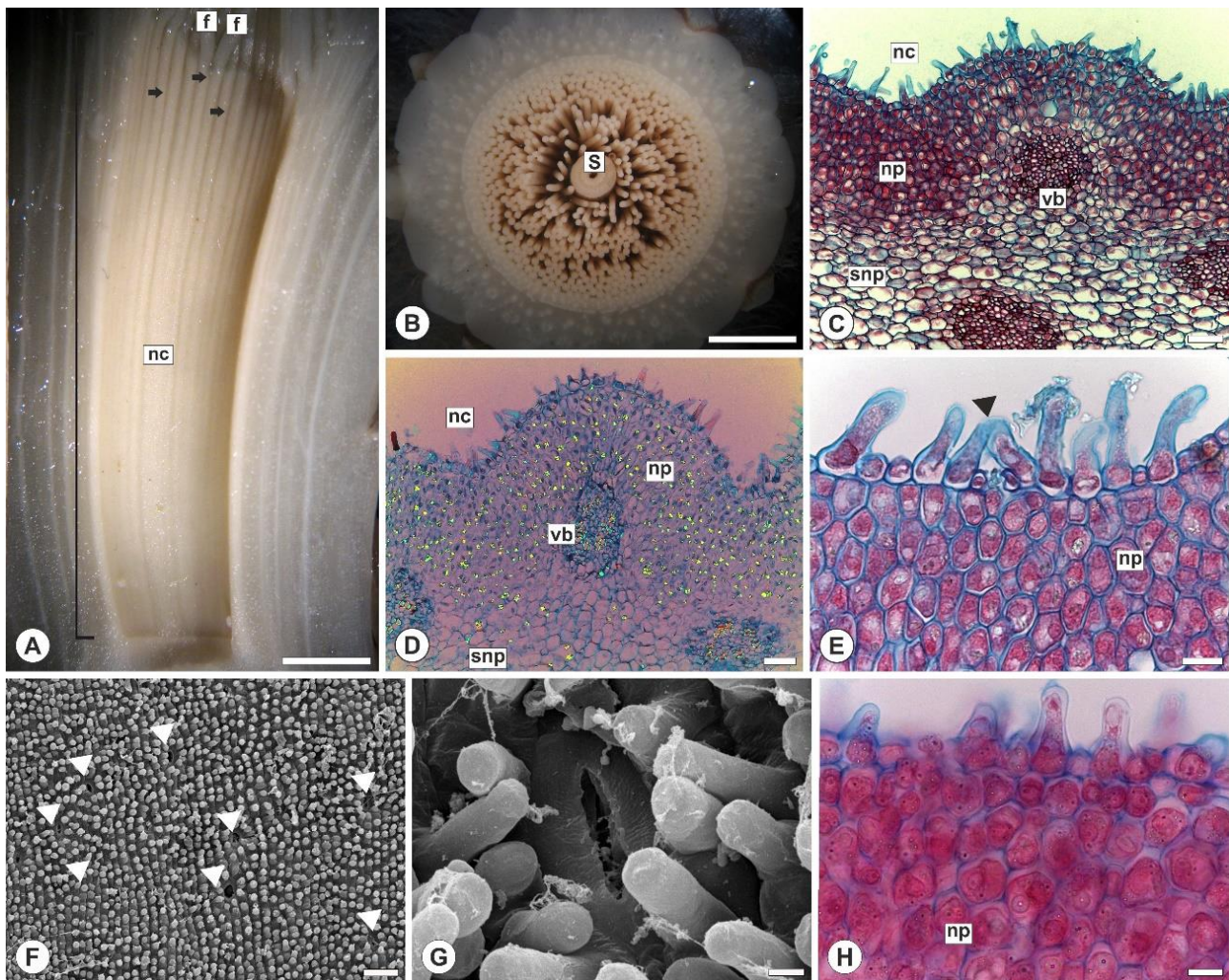


Figura 16. Morfo-anatomía del nectario floral de *Echinopsis*. **A-E.** *E. atacamensis*. **A.** Vista general de la cámara nectarífera en corte longitudinal de flor, observe la base de filamentos (f) que comienzan a liberarse en la porción superior. **B.** Corte transversal de la flor por encima de la cámara nectarífera, note la barrera formada por los filamentos de la serie interna de estambres que rodean al estilo (E). **C.** Fotomicrografía de sección transversal de nectario floral en MO. **D.** Nectario floral con luz polarizada, observe la barrera formada por los filamentos de la serie interna de estambres que rodean al estilo (E).

observe la abundancia de drusas y granos de almidón en el parénquima nectarífero (pn), los granos de almidón muestran la figura de una cruz de malta. **E.** Detalle de nectarostomas (punta de flecha), note los tricomas unicelulares inclinados hacia las aperturas. **F-H.** *E. tubiflora*. **F-G.** MEB. **F.** Vista de la superficie de la pared de la cámara de néctar, observe las nectarostomas (punta de flecha blanca). **G.** Detalle de nectarostomas. **H.** Corte transversal de nectario floral en MO. Escalas: A= 3mm; B= 5mm; C, D= 50µm; E= 20µm, F=50µm; G= 5µm; H= 10µm. Abreviaturas: cn= cámara de néctar; pn= parénquima nectarífero, psn= parénquima subnectarífero, hv= haces vasculares.

DISCUSIÓN

Morfología floral

El valor sistemático de ciertos patrones de organización interna de la flor, particularmente de los nectarios florales, ha sido poco explorado en Cactaceae (Buxbaum, 1953; Tiagi, 1955, Boke, 1963, 1964, 1966, 1968, 1980; Pimienta-Barrios & del Castillo, 2002; Strittmatter *et al.*, 2002; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010, 2013). Los caracteres florales se han interpretado tradicionalmente como respuesta a las presiones selectivas de los polinizadores (Johri, 1984; Fenster *et al.*, 2004). Así, según el concepto de "síndrome de polinización" de Faegri & van der Pijl (1979), el conjunto dado de caracteres florales que definen el Bauplan floral de una especie respondería a un grupo específico de animales polinizadores. Las especies incluidas en este estudio comparten polinización por aves (de Viana *et al.*, 2001; Schlumpberger & Badano, 2005; Gorostiague & Ortega-Baes, 2016; Gorostiague, 2017); sin embargo, según la morfología de la flor, la especialización fenotípica para las aves se puede reconocer en *Cleistocactus* y *Denmoza*, mientras que *Echinopsis* muestra especialización fenotípica para las mariposas nocturnas. El concepto de síndrome floral puede ser útil para comprender los mecanismos de la diversificación floral, impulsados por las presiones selectivas que los polinizadores pueden ejercer sobre las características florales (Fenster *et al.*, 2004; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Este concepto ha sido criticado, dado que la evidencia sugiere que la mayoría de los sistemas de polinización son de hecho generalistas y que los polinizadores reales de una flor dada a veces pueden diferir de los esperados (Ollerton *et al.*, 2009).

De acuerdo con van der Pijl (1960), el síndrome floral de polinización por aves incluye una serie de características (es decir, anthesis diurna, flores sin olor, de color rojo escarlata, corolas tubulares, nectarios profundos y grandes cantidades de néctar) que responderían a las presiones selectivas ejercidas por polinizadores. Además, la presencia de cámaras de néctar que permiten la acumulación de néctar es una característica típicamente asociada con la polinización por colibríes (Brown & Kodric-Brown, 1979; Stiles, 1981; Díaz & Cocucci, 2003; Agüero *et al.*, 2018).

En cactus, la polinización mediada por abejas se ha indicado como la más común y probablemente sea la condición ancestral (Anderson, 2001; Schlumpberger & Renner, 2012), mientras que la polinización por aves, murciélagos y mariposas nocturnas serían condiciones derivadas comunes a algunas tribus, como Pachycereeae y Trichocereae (Grant & Grant, 1979; Gibson & Nobel, 1986). La especialización fenotípica a la polinización por aves se ha desarrollado de forma independiente en tres de las cuatro subfamilias actualmente reconocidas en Cactaceae, excepto en la pequeña subfamilia Maihuenioideae (Anderson, 2001; Gorostiague & Ortega-Baes, 2016). Aunque la especialización fenotípica a la polinización por aves se ha registrado con frecuencia en los cactus, esta condición no es predictiva de la especialización a nivel funcional o ecológico, ya que en la mayoría de los casos de polinización por aves se registraron otros grupos de polinizadores (Eggli & Giorgetta, 2015; Gorostiague & Ortega-Baes, 2016).

Por otra parte, *E. atacamensis* comparte características florales con otras especies de cactus columnares que están asociados a la polinización por mariposas nocturnas (corola blanca, tépalos resistentes, muchas anteras con alto contenido de polen, anthesis nocturna y alta producción de néctar). Sin embargo, la evidencia basada en estudios de campo indica un sistema de polinización generalista en esta especie, con aves e insectos diurnos como visitantes florales complementarios (De Viana *et al.*, 2001; Schlumpberger & Badano, 2005). Este último es uno de los casos que ilustra que las aves pueden polinizar especies que no están adaptadas fenotípicamente a la ornitofilia.

Morfología de la cámara de néctar

Caracteres tales como la posición y la forma de los nectarios florales son factores importantes que determinan la cantidad de néctar secretado y, por lo tanto, los polinizadores que se atraen (Gudiño *et al.*, 2015). Las características morfo-anatómicas de los diferentes tipos de nectarios florales proporcionan información importante que puede contribuir a nuestra comprensión de las relaciones filogenéticas o al soporte de relaciones inferidas previamente con datos moleculares (Endress *et al.*, 2000; Endress, 2002; Bernardello, 2007; Nepi, 2007; Solís *et al.*, 2017). Se han registrado casos de tipo de nectario similar dentro de una familia; sin embargo, una de las razones de la gran diversidad observada en la estructura del nectario depende en gran medida del tipo de polinizador (Pacini *et al.*, 2003).

Buxbaum (1953) reconoció tres tipos básicos de "zonas nectaríferas" para Cactaceae: nectario en surco, disco y cámara de néctar. Bernardello (2007) clasificó a los nectarios de Cactaceae como hipantiales. En *Pereskia* Mill. y *Rhipsalis* Gaertn., el néctar se secreta a través de un receptáculo anular, mientras que en otros taxones se produce una secreción a lo largo de la porción basal del hipantio

(Zandonella, 1977; Barthlott & Hunt, 1993; Nassar *et al.*, 1997; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010, 2012, 2013).

Los nectarios hipantiales estudiados comparten algunos rasgos en la estructura general. Sin embargo, presentan diferencias morfológicas que permiten la diferenciación de algunas especies, aunque es difícil inferir tendencias evolutivas. Estas cámaras pueden aparecer más o menos cerradas, debido a la formación de un denso anillo de filamentos (p. ej., *E. atacamensis* y *E. tubiflora*), o por la presencia de apéndices filamentosos o hipantiales (p. ej., *Schumbergera*, y en especies de *Cleistocactus* aquí analizadas), y en algunas especies de *Opuntia*, debido a una excrescencia anular o incluso en forma de copa en la base del estilo (Buxbaum, 1953; Barthlott & Hunt, 1993; Agüero *et al.*, 2018). En *C. baumannii*, como en *Schlumbergera*, la porción superior del nectario se asemeja a una estructura de techo de bóveda formada por parénquima no secretor y los estambres primarios que rodean el estilo (Almeida *et al.*, 2013). *Denmoza* es el caso más interesante porque presenta una cámara cerrada por un "tapón" de estaminodios crespos. Los visitantes florales deben cruzar esta barrera con sus picos para poder acceder al néctar. Poco se sabe sobre la presencia de estaminodios en Cactaceae. Se registraron en *Pereskia* formando grupos de tricomas lanosos entre los tépalos petaloides y estambres (Leuenberger, 1986), y en *Brasiliopuntia*, *Matucana* y *Denmoza*, donde se observa un anillo de estaminodios parecidos a vello (Anderson, 2001). Se sugiere que las estructuras formadas por la cohesión de las bases de filamentos (*Cleistocactus*), por la formación de un tapón de estaminodios (*Denmoza*), o por la barrera formada por la serie interna de filamentos libres (*E. atacamensis* y *E. tubiflora*) proporcionan protección contra la evaporación del néctar diluido que caracteriza a la mayoría de las flores ornitófilas (Baker, 1975). Estas estructuras regulan la comunicación de la cámara con el exterior y los visitantes que buscan comida. Por lo tanto, solo ciertos grupos de polinizadores potenciales pueden alcanzar la base de la flor para recolectar el néctar, que también está protegido del viento o lluvia. Se identificaron diferencias morfológicas interesantes a nivel del nectario floral que no coinciden con la diferenciación morfológica externa de flores entre especies con síndrome floral similar (p. ej., colibríes - *Cleistocactus* vs. *Denmoza*). Aunque las especies de *Cleistocactus* y *Denmoza* comparten la morfología floral típica de las especies ornitófilas, difieren en las características de las cámaras nectaríferas, como la presencia de un tapón de estaminodios rizados en la porción superior de la cámara, características epidérmicas, desarrollo del tejido nectarífero, y vascularización del tejido secretor.

Se sugiere que el patrón de crestas y valles que forman las paredes de la cámara en *Denmoza* aumenta la superficie secretora y contribuye a la acumulación de néctar entre los pliegues. Se registró un caso similar en especies de *Opuntia* (Agüero *et al.*, 2018).

Anatomía de la cámara de néctar

La anatomía básica de los nectarios florales estudiados es similar a la descrita para otras especies de cactus (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010, 2012, 2013; Agüero *et al.*, 2018). Las seis especies analizadas también muestran similitudes en las características estructurales generales (es decir, nectario hipantial, tipo estructurado con tres tejidos diferenciados). Sin embargo, muestran ciertas diferencias anatómicas que nos permiten distinguir los tres géneros, pero estas diferencias no se asociarían directamente con los fenotipos florales especializados que representan.

Epidermis nectarífera y secreción de néctar

La presencia de epidermis uniestratificada y simple en nectarios florales se ha registrado en especies de *Opuntia* (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Agüero *et al.*, 2018) y *Rhipsalis* (Almeida *et al.*, 2012), mientras que se han citado tricomas epidérmicos en los géneros *Epiphyllum* Haw., *Disocactus* Lindl., *Hylocereus*, *Weberocereus* Britton & Rose, y *Selenicereus* (Almeida *et al.*, 2010; Stefano *et al.*, 2001).

La secreción de néctar a través de estomas modificados, que han perdido la capacidad de cerrarse, es la forma más frecuente y ampliamente documentada de secreción de néctar en las angiospermas (Durkee *et al.*, 1981; Bernardello, 2007; Nepi, 2007). En Cactaceae, la presencia de estomas en la cámara de néctar se registró para varios taxones (Zandonella, 1977; Almeida *et al.*, 2012; Agüero *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha informado que la secreción de néctar se produce solo a través de tricomas secretores en los cactus epífitos *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose (Stefano *et al.*, 2001) y *Epiphyllum phyllanthus* (Almeida *et al.*, 2010). En las especies estudiadas, el néctar se secreta principalmente a través de los estomas; no obstante, no se puede descartar la posibilidad de un mecanismo de doble secreción, que incluye la secreción a través de microcanales de la cutícula o cutículas permeables, repitiendo patrones observados en *E. terscheckii* (para mayor detalle ver capítulo 3) y en otras especies de la familia (Nepi, 2007; Agüero *et al.*, 2018). Además, la presencia de interrupciones epidérmicas en *C. baumannii*, en donde se observa material cristalizado, indica un tipo de secreción holocrina, tal como sucede *Selenicereus grandiflorus*, en donde la secreción probablemente se inicia por la acción mecánica de los polinizadores (Stefano *et al.*, 2001).

Parénquima nectarífero

De acuerdo a Pacini *et al.* (2003), el volumen del tejido nectarífero es proporcional a la cantidad de néctar producido y, por lo tanto, al comportamiento del polinizador. Las especies aquí analizadas exhiben rasgos también registrados en otras especies de cactus columnares (Gudiño *et al.*, 2015).

Antes de la antesis, los azúcares del néctar se pueden almacenar como almidón en los amiloplastos, en el parénquima nectarífero o en el parénquima subnectarífero (Pacini *et al.*, 2003; Nepi,

2007). En las especies estudiadas, el parénquima nectarífero tiene numerosos amiloplastos. La ausencia de cloroplastos en el tejido nectarífero se puede atribuir a la ubicación de los nectarios florales, dentro de un tubo floral altamente desarrollado, que impide la exposición al sol.

Por otro lado, las inclusiones minerales, en forma de drusas de oxalato de calcio, en el parénquima nectarífero podrían desempeñar un papel funcional, inmovilizando el calcio en este tejido en el que se supone que ocurre el transporte de azúcar activo (Nepi, 2007), ya que se ha demostrado que el calcio inhibe a la ATPasa de la membrana plasmática, involucrada en el transporte de sacarosa en las plantas (Guiaquinta, 1979; Nepi, 2007).

Vascularización

Entre las angiospermas, el tejido vascular que inerva el parénquima nectarífero se compone principalmente de floema, aunque también se han registrado casos de trazas que consisten de xilema y floema (Fahn, 1979, 2000; Bernardello, 2007; Solís *et al.*, 2017)). Curiosamente, *Denmoza* presenta paquetes de haces de xilema y floema ramificados que penetran en el tejido secretor; esta configuración de tejido vascular se registró para especies de *Opuntia*, y se ha sugerido que el prenectar no se origina solo en el parénquima subnectarífero (Agüero *et al.*, 2018).

En los casos en los que se registra ausencia de trazas vasculares que irrigen directamente el tejido nectarífero, el suministro proviene de haces vasculares de tejidos circundantes (Fahn, 1979, 1988, 2000; Bernardello, 2007). En las especies estudiadas de *Cleistocactus* y *Echinopsis*, los haces vasculares que suministran el tejido secretor alcanzan el límite entre el parénquima subyacente y el tejido nectarífero. La correlación sugerida tradicionalmente, entre el tejido que irriga el nectario y la concentración de azúcar en el néctar (Frey-Wyssling & Agthe, 1950), no siempre es cierta (Bernardello, 2007). Agthe (1951) encontró que en las especies en las que el néctar era concentrado, el tejido secretor estaba inervado solo por trazas de floema, mientras que en las especies en las que el néctar era diluido, el xilema y el floema estaban presentes. Estas observaciones sugieren que el néctar de *D. rhodacantha* sea probablemente más diluido que el de las otras especies analizadas. Por lo tanto, la presencia de un tapón de pelos para ayudar a prevenir la evaporación del néctar es razonable. De acuerdo a Nicolson & Thornburg (2007), las propiedades del néctar tienden a ser similares en plantas con síndromes de polinización similares: las flores polinizadas por insectos producen néctares concentrados, mientras que las flores polinizadas por murciélagos y aves generalmente producen néctares diluidos (Baker, 1975). Por lo tanto, al menos dentro de un grupo de taxones estrechamente relacionados, se esperan parámetros de volumen y concentración de néctar relativamente similares de las especies ornitófilas en *Cleistocactus* y *Denmoza*. Gorostiague & Ortega- Baes (2016) encontraron una cantidad similar de néctar en *C. baumanii* y *C. smaragdiflorus*, con una concentración de valor intermedio en comparación con la registrada para otras especies ornitófilas. Sin embargo, esta

información solo está disponible para un número limitado de especies. Futuros estudios sobre la composición química, la concentración y el volumen de néctar en Cactaceae serán relevantes para dilucidar la relación entre estas variables, la especialización fenotípica de las flores y los polinizadores efectivos dentro de este grupo de plantas.

Estos resultados son importantes porque pueden contribuir a la interpretación de la tendencia evolutiva del nectario floral y a la comprensión de su valor sistemático en Cactaceae. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre especies de diferentes linajes de la familia para complementar estos resultados. Además, es necesario un estudio profundo de las características del néctar para dilucidar la posible relación entre las características morfo-anatómicas de la estructura del nectario floral, la especialización fenotípica de las flores y los polinizadores efectivos de este linaje.

CONCLUSIONES

*Los géneros estudiados difieren en la especialización fenotípica a la polinización, y en términos anatómicos, difieren básicamente en características epidérmicas de las paredes de las cámaras nectaríferas, mientras que dentro de cada género las especies son muy similares en la mayoría de los rasgos morfo-anatómicos estudiados (i.e. epidermis, irrigación del tejido secretor, características de la cámara).

*La mayoría de estas características aparentemente carecen de relación con el tipo de polinizador.

*Los resultados sugieren que las diferencias encontradas no están directamente asociadas con la especialización fenotípica de las flores, a pesar de que la polinización de las aves se ha verificado en estas especies.

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS DEL ANDROCEO EN TRES ESPECIES DE *GYMNOCALYCIUM*, CON ÉNFASIS EN LA PRESENTACIÓN SECUNDARIA DEL POLEN



INTRODUCCIÓN

Gymnocalycium Pfeiff. ex Mittler (Cactoideae, Trichocereae) es un género bien establecido que comprende alrededor de 50 especies (Demaio *et al.*, 2011). Los individuos se caracterizan por su patrón de crecimiento globular o deprimido, solitario o cespitoso, sin una zona fértil diferenciada; las flores surgen de areolas ubicadas en la parte superior o central del tallo, que se encuentra generalmente deprimida, son diurnas, acampanadas hasta casi infundibuliformes, de color blanco nacarado o rosa pálido (Kiesling, 1975; Anderson, 2001; Kiesling & 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 & Ferrari, 2005). Los representantes del género se distribuyen naturalmente en América del Sur, al este de los Andes, en el sur de Bolivia, el suroeste y norte de Paraguay, el sur de Brasil, Uruguay y Argentina, excepto en el sur de la Patagonia (Kiesling, 1975; Metzing *et al.*, 1995; Anderson, 2001; Hunt, 2006). Es el género de cactus más numeroso de la Argentina, donde se encuentra su centro de distribución, con más del 80% del total de las especies (Kiesling & Ferrari, 2005). Se han descrito entre cinco y seis subgéneros de *Gymnocalycium*, basados principalmente en caracteres morfológicos de las semillas, como la forma, el color y el tamaño (Kiesling & Ferrari, 2005). En general, ha habido poco debate sobre la ubicación del género dentro de la tribu Trichocereae (Anderson, 2001).

Si bien la biología floral del género ha sido poco explorada, las características florales generales (tamaño, color y tiempo de antesis) de *Gymnocalycium* sugieren que se trata de un linaje con especialización fenotípica a las abejas o típicamente melitófilo (*sensu* Faegri & van der Pijl, 1979).

Usualmente, las angiospermas polinizadas por animales muestran granos de polen rodeados de diferentes tipos de material pegajoso, siendo el más frecuente el “pollenkitt” o diferentes dispositivos que permiten el transporte “en masa” de las unidades polínicas, incrementando las probabilidades de que los óvulos puedan ser fertilizados (Hesse, 1981; Pacini & Franchi, 1998, 1999; Hesse *et al.*, 2000; Pacini, 2000). En plantas entomófilas, por ejemplo, se espera encontrar abundante pollenkitt (Hesse, 2000; Pacini & Hesse, 2005). Además, en los taxones zoófilos se observan varias formas de dispersión de polen, o

características especiales en la presentación del polen (Hesse *et al.*, 2000). Estas características se relacionan directamente con la ecología de la polinización, como la presentación secundaria del polen (Yeo, 1993). En algunos grupos de plantas, la forma, el tamaño o la química de la pared de los granos de polen se asocian con el tipo de polinización, aunque este suceso no representa una regla (Lumaga *et al.*, 2006; Basso-Alves *et al.*, 2010).

El androceo en Cactaceae ha desarrollado interesantes estrategias adaptativas que se infiere contribuyen en el proceso de polinización. Por ejemplo, algunas especies de *Opuntia* presentan estambres sensibles que se incurvan ante estímulos provocados por los cuerpos de los visitantes florales; de esta manera, resguardan grandes cantidades de polen y néctar ubicados en la base de la flor para los polinizadores efectivos que acceden a esta región, y en su recorrido llenan sus cuerpos de polen (Schlindwein & Wittmann, 1997; Cota-Sánchez *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha registrado la presencia de hilos que conectan granos de polen en especies del género *Gymnocalycium* (Halbritter *et al.*, 1997). En dichas especies, tal como sucede en *Delonix regia*, un porcentaje de los granos de polen se liberan en grupos conectados por hilos de “viscina” (Endress, 1994).

Este capítulo se enfoca en el análisis morfo-anatómico del androceo de tres especies melitófilas de *Gymnocalycium*, con énfasis en las estrategias adaptativas halladas en los representantes del género, particularmente en la presentación secundaria del polen y la presencia de hilos conectando a grupos de granos de polen en la pared anteral.

RESULTADOS

Morfología floral

Gymnocalycium saglionis (F. Cels) Britton & Rose

Las flores son campanuladas, con tubo floral corto y ensanchado en la base, en promedio de 3,5 cm de longitud y alrededor de 3 cm de diámetro. Los tépalos petaloideos son de color crema o rosa claro nacarado (Fig. 17A-C). El estilo es un cilindro corto y el estigma no sobrepasa la serie de estambres. Los numerosos estambres se despliegan hacia

el centro de la flor en dos series, una por encima de la cámara nectarífera y la otra a diferentes niveles en el interior del tubo.

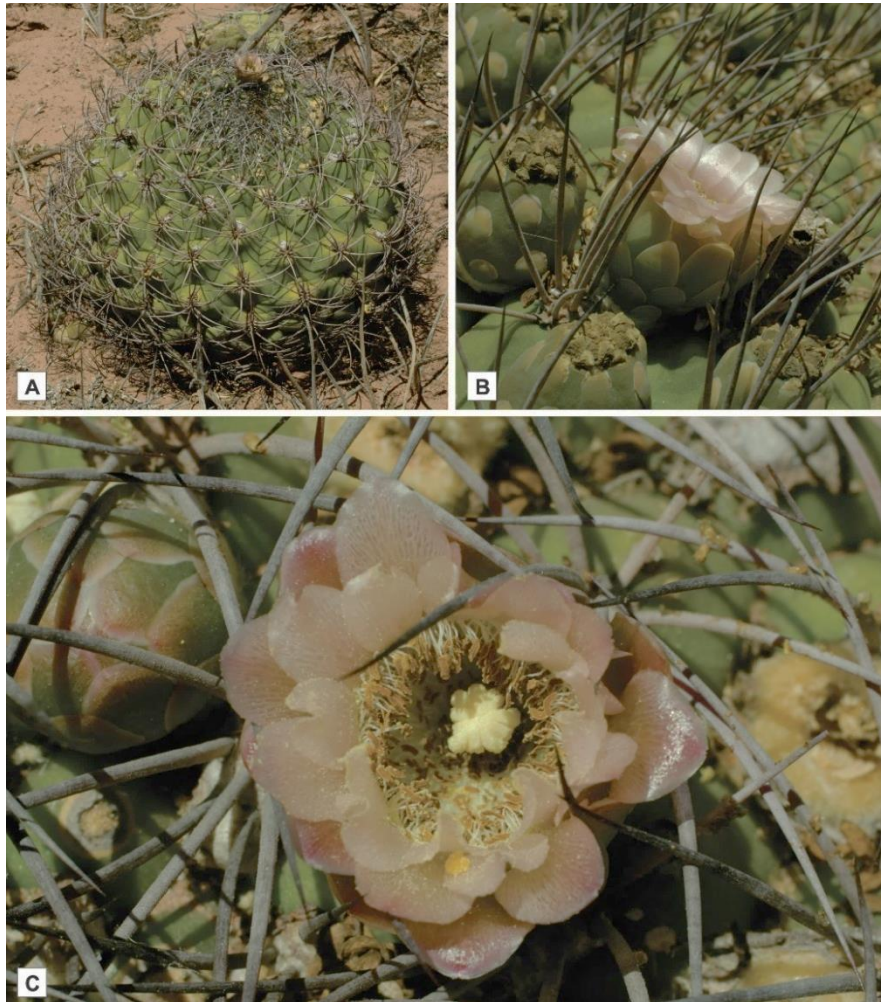


Figura 17. *Gymnocalycium saglionis*. **A.** Vista lateral de una planta en flor. **B.** Vista lateral de una flor abierta, rodeada de frutos. **C.** Detalle de una flor abierta en vista superior, note el estigma no receptivo con los lóbulos estigmáticos retraídos. Fotos: Cecilia Sosa.

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

Las flores nacen de areolas ubicadas en la porción lateral-superior de los tallos (Fig. 18A, B), son infundibuliformes, de alrededor de 5 cm de longitud. El pericarpelo es elongado, recubierto de escamas anchas y desnudas, de color verde violáceo oscuro, el ovario es alargado, de forma elipsoide. El estigma no sobrepasa la fauce floral, las decenas

de estambres se disponen alrededor del estilo, inclinándose hacia el centro de la flor (Fig. 18D).



Figura 18. *Gymnocalycium schickendantzii*. **A.** Vista lateral de una planta en flor. **B.** Vista superior de una planta, con múltiples botones florales originados a partir de meristemas ubicados alrededor del ápice deprimido del tallo. **C.** Vista lateral de una flor en anthesis. **D.** Detalle de una flor en corte longitudinal, note los lóbulos estigmáticos no receptivos y retraídos. Fotos: Valeria González.

Gymnocalycium spegazzinii Britton & Rose

Las flores nacen a partir de areolas ubicadas en el centro piloso y deprimido del tallo (Fig. 19A-B), son infundibuliformes, de 6,5 cm de longitud y 4,5 cm de diámetro (Fig. 19C). Los tépalos petaloides de color rosa pálido a nacarado; la garganta floral, el interior del tubo y los filamentos son de color fucsia; las anteras, estilo y ramas del estigma son

amarillos; los numerosos estambres se inclinan hacia el centro de la flor (Fig. 19D). El ovario tiene forma ovoidea, es alargado longitudinalmente, y lleva cientos de óvulos circinótrofos blancos (Fig. 19D).

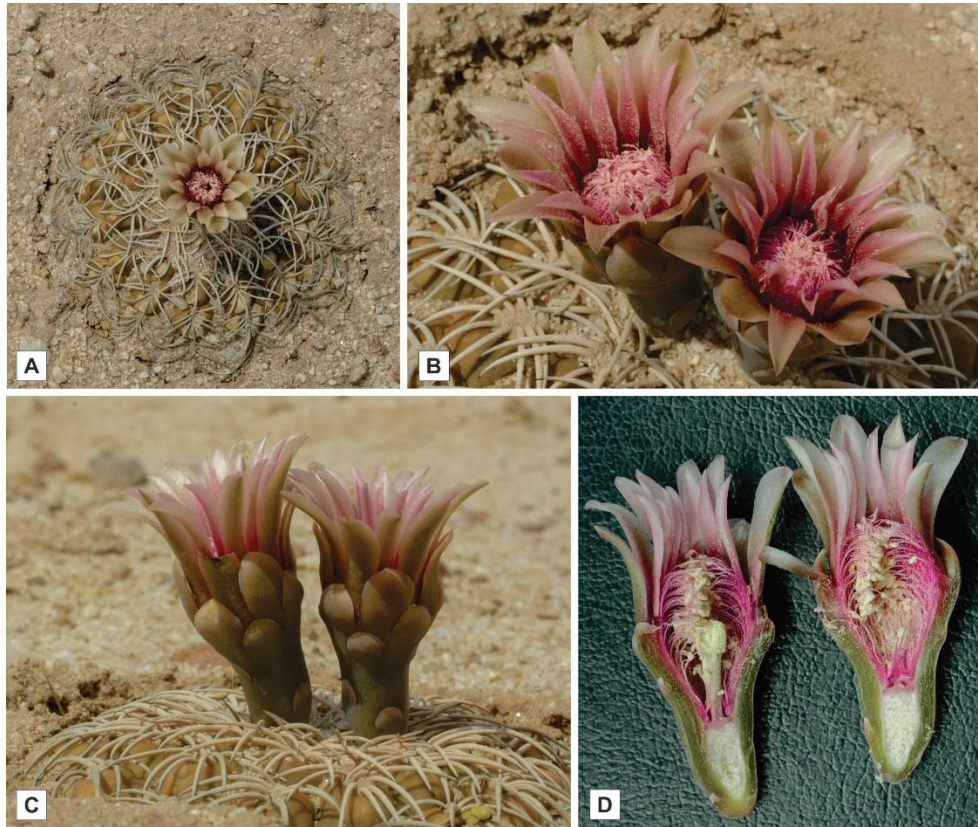


Figura 19. *Gymnocalycium spegazzinii*. **A.** Vista superior de una planta en flor. **B.** Vista superior de dos flores en anthesis. **C.** Vista lateral de una planta con dos flores emergiendo a partir del centro deprimido del tallo. **D.** Detalle de una flor en corte longitudinal. Fotos: Cecilia Sosa.

En las tres especies estudiadas, los filamentos se disponen en dos series, la serie interna se despliega en espiral por encima de la cámara nectarífera, mientras que los filamentos de la serie externa forman parte del tubo floral hasta desprenderse del mismo en la porción superior de las flores, cerca de la garganta floral. En las tres especies, los filamentos de la serie externa se encuentran adnatos al tubo (Figs. 20A, 21A, 22A), hasta liberarse en la porción distal de las flores.

Anatomía de estambres

Las tres especies de *Gymnocalycium* analizadas presentan los estambres con anatomía muy similar.

En sección transversal, los filamentos de la serie externa aparecen como protuberancias que sobresalen del tubo floral; presentan características constantes, epidermis simple, con células cuadrangulares radialmente alargadas, con cutícula gruesa en *G. saglionis* y *G. schickendantzii* (Figs. 20A, 21A), y células papilosas o con tricomas unicelulares breves en *G. spegazzinii* (Fig. 22A). Los filamentos de la serie interna, que se encuentran libres del tubo floral, presentan un contorno variable, son redondeados u ovados en *G. saglionis*, redondeados o subtriangulares e irregulares en *G. schickendantzii*, y redondeados u ovados en *G. spegazzinii*. En todos los casos, la epidermis es uniseriada, con células simples alternando con tricomas unicelulares breves o papilas en la base de la estructura, hacia el ápice los tricomas van disminuyendo en número y tamaño hasta desaparecer (Figs. 20B-C, 21 B-E, 22B-C).

En posición subepidérmica se ubica un parénquima homogéneo, constituido por células de paredes delgadas y de diferente diámetro, con espacios intercelulares notables, que rodea a cada haz vascular; numerosas células mucilaginosas de diferentes tamaños se intercalan en el parénquima.

En los tres representantes del género, la vascularización de las piezas es esencialmente la misma: tanto los filamentos adnatos al tubo como los libres, están irrigados por un haz vascular central de tipo concéntrico anficribal (Figs. 20A-C, 21A-B, D-E, 23A-C).

Las anteras son bitecas y tetrasporangiadas, de dehiscencia longitudinal (Fig. 23A). La apertura de las mismas, se produce debido a la desintegración de las células parenquimáticas del septo que separa a cada lóculo a nivel del estomio, y a la disociación de las células epidérmicas que delimitan esta región (Fig. 23B), probablemente debido a un mecanismo de apoptosis celular. De esta manera, cada teca se abre longitudinalmente a lo largo de una línea de dehiscencia (Figs. 20D, 21F, 22D, 23A-B), y la superficie interna del esporangio queda expuesta luego de liberar las unidades polínicas, mientras que la pared anteral se posiciona muy próxima a la teca adyacente (Fig. 21G).

Las características anatómicas de las paredes anterales maduras incluyen células epidérmicas globosas, con contenido citoplasmático que podrían ser taninos, excepto en las regiones más próximas al tejido conectivo de la antera; el endotecio muestra notables engrosamientos secundarios lignificados en las paredes radiales (Figs. 20D, 21F-G, 22D).

La vascularización de las anteras en las tres especies presenta un haz vascular concéntrico perifloemático o anficribal ubicado en el tejido conectivo central del órgano floral (Figs. 20E, 21H, 22E). Cada haz vascular estaminal se desprende individualmente de la estela receptacular, y permanece sin ramificarse a lo largo de su trayecto, desde la base del filamento hacia el ápice de cada antera.

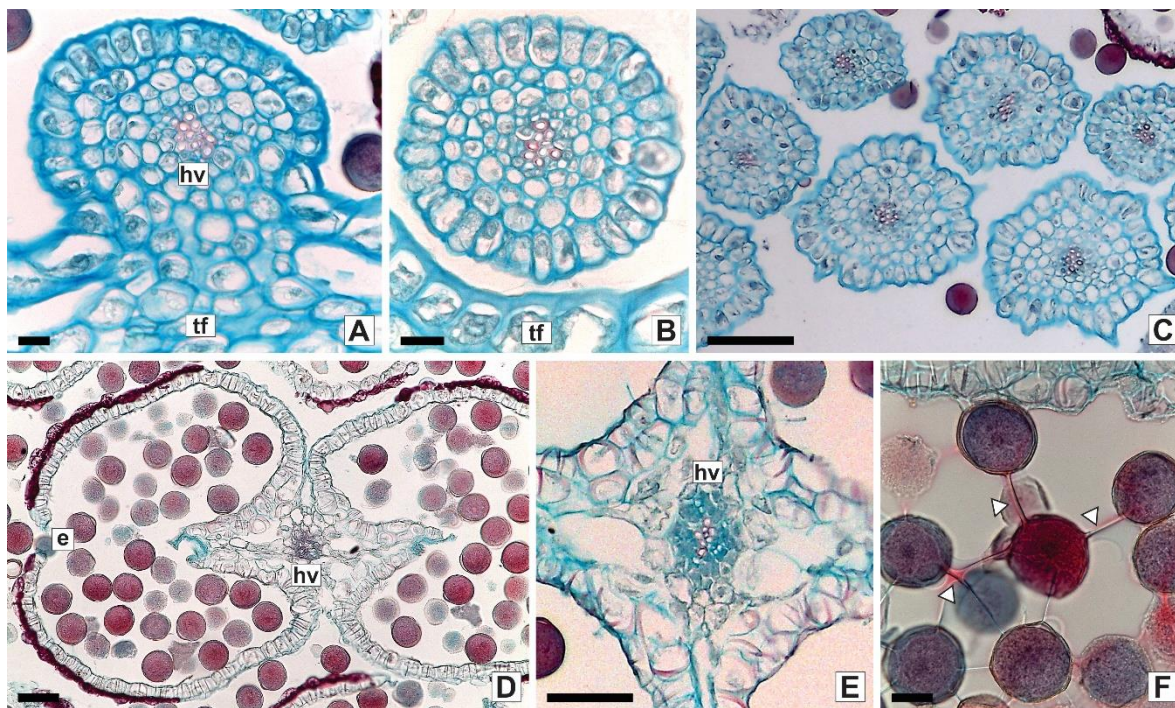


Figura 20. Fotomicrofías del androceo de *G. saglionis* en secciones transversales. **A.** Filamento adnato al tubo floral, con el haz central concéntrico anficribal. **B.** Filamento libre en el tubo, note su contorno redondeado y células epidérmicas simples. **C.** Conjunto de filamentos de contorno irregular, note las papilas epidérmicas. **D.** Antera madura dehiscente, con apertura a nivel del estomio. **E.** Detalle del haz vascular anficribal, de posición central, que irriga a la antera. **F.** Detalle de un conjunto de granos de polen conectados por hilos (puntas de flechas blancas), en el interior de una antera, próximos al endotecio a nivel del estomio. Abreviaturas: e= estomio; hv= haz vascular; tf= tubo floral. Escalas: A= 100 μ m; B, F= 20 μ m; C= 30 μ m; D, E= 50 μ m.

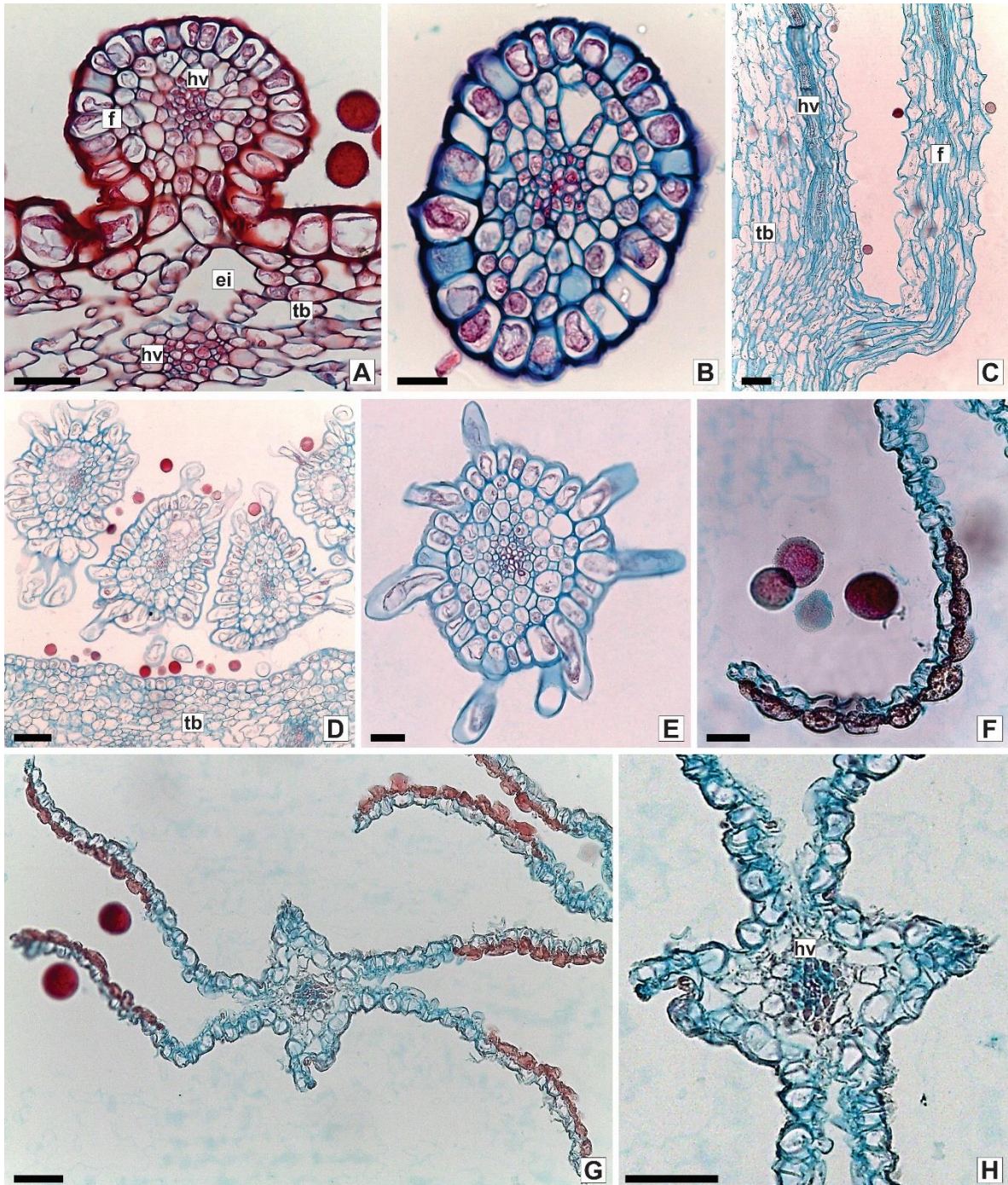


Figura 21. Fotomicrografías del androceo de *G. schickendantzii*. **A, B, D-H.** Secciones transversales. **A.** Filamento adnato al tubo floral, con su haz central concéntrico anficribal. **B.** Filamento libre en el tubo, note su contorno redondeado y células epidérmicas simples. **C.** Sección longitudinal de filamento liberándose del tubo floral. **D.** Conjunto de filamentos de contorno irregular, note los tricomas epidérmicos unicelulares. **E.** Filamento libre en el tubo, note células epidérmicas con tricomas unicelulares. **F.** Detalle de pared anteral dehiscente, note las células epidérmicas papilosas con sustancias tánicas en el citoplasma. **G.** Antera madura dehiscente. **H.** Detalle del haz vascular anficribal, de posición central,

que irriga a la antera. Abreviaturas: e= estomio; ei= espacio intercelular; f= filamento; hv= haz vascular; tb= tubo floral. Escalas: A, E, F= 30 μ m; B= 20 μ m; C, D= 100 μ m; G, H= 50 μ m.

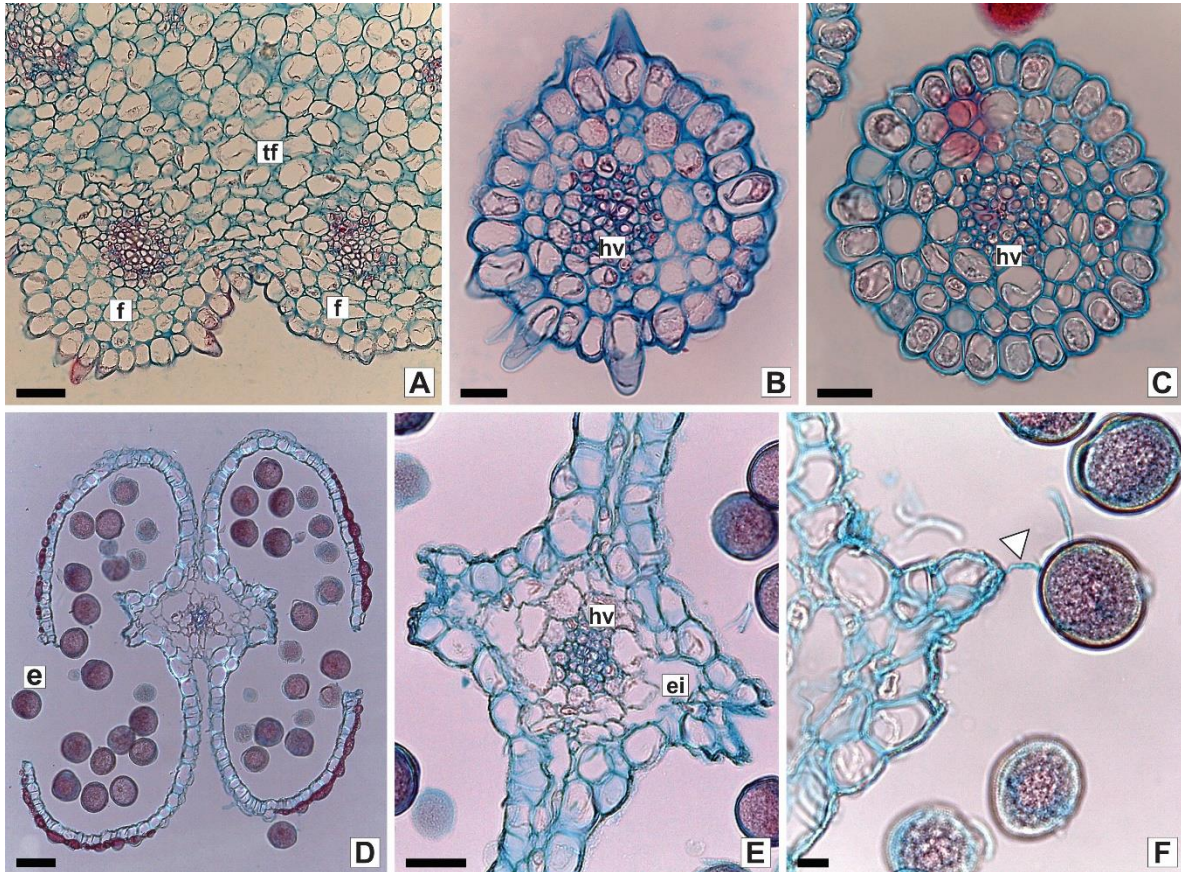


Figura 22. Fotomicrografías del androceo de *G. spegazzinii* en secciones transversales. **A.** Filamentos adnatos al tubo, note las papilas epidérmicas. **B.** Filamento libre del tubo floral, con su haz central concéntrico anficribal, observe las papilas epidérmicas. **C.** Filamento libre en el tubo, note su contorno redondeado y células epidérmicas simples. **D.** Antera madura dehiscente, vista con luz polarizada, observe los engrosamientos secundarios lignificados del endotecio y la apertura a nivel del estomio. **E.** Detalle del haz vascular anficribal, de posición central, que irriga a la antera. **F.** Detalle de un grano de polen conectado por un hilo en la región donde se ubicaba el septo (puntas de flecha blanca). Abreviaturas: e= estomio; ei= espacio intercelular; f= filamento; hv= haz vascular; tf= tubo floral. Escalas: A= 30 μ m; B, C= 20 μ m; D= 100 μ m; E= 30 μ m; F= 10 μ m.

Presentación secundaria del polen

Las tres especies analizadas muestran presentación secundaria del polen. Son protandras, las anteras maduran primero y son dehiscentes en botones florales. Posiblemente un día antes de la antesis floral, descargan el contenido polínico hacia el centro de la flor, sobre el estigma que aún no es receptivo y se encuentra con las ramas estigmáticas retraídas hacia el centro, sin exponer la porción receptiva, y sobre la base del estilo y la región superior de la cámara de néctar (Figs. 17C, 19D). Cuando el estigma madura, despliega sus ramas estigmáticas para exponer la porción interna receptiva, también deja expuestos a los granos de polen que habían caído previamente en su superficie externa.

Los estambres se disponen curvados hacia el centro de la flor, nunca sobrepasan la fauce floral (Figs. 17C, 18D, 19D), contribuyendo a que el contenido polínico quede expuesto en el centro floral.

Hilos conectando granos de polen

Se ha registrado la presencia de estructuras filiformes que conectan a grupos de granos de polen. Estas estructuras en forma de hilos, son visibles al microscopio óptico en *G. saglionis* y *G. spegazzinii* (Figs. 20F, 22F). Los hilos presentan longitudes muy variables, se adhieren a la superficie de múltiples granos de polen simultáneamente, formando agregados de los mismos (Fig. 24A-F).

Luego de la dehiscencia de la antera, un pequeño porcentaje del total de los granos de polen, se conectan entre sí y a las paredes loculares por medio de hilos flexibles, que se encuentran exclusivamente a la altura del estomio, en la región donde se encontraba el septo parenquimático que separaba cada lóculo (Figs. 23C-D, 24A, C-E). Las estructuras en forma de hilos no se ven afectadas por el procesamiento para observaciones bajo microscopía electrónica de barrido o microscopía óptica.

Estas estructuras muestran forma filiforme; adicionalmente, se observaron estructuras ligeramente más anchas y en forma de cinta en algunas porciones basales que entran en contacto con los granos de polen en *G. saglionis* (Fig. 24B). Las superficies de las mismas pueden ser lisas o en algunos casos con pequeños glóbulos adheridos, los extremos

de estas estructuras que entran en contacto con los granos de polen individuales pueden mostrar forma cónica (Fig. 24A-F).

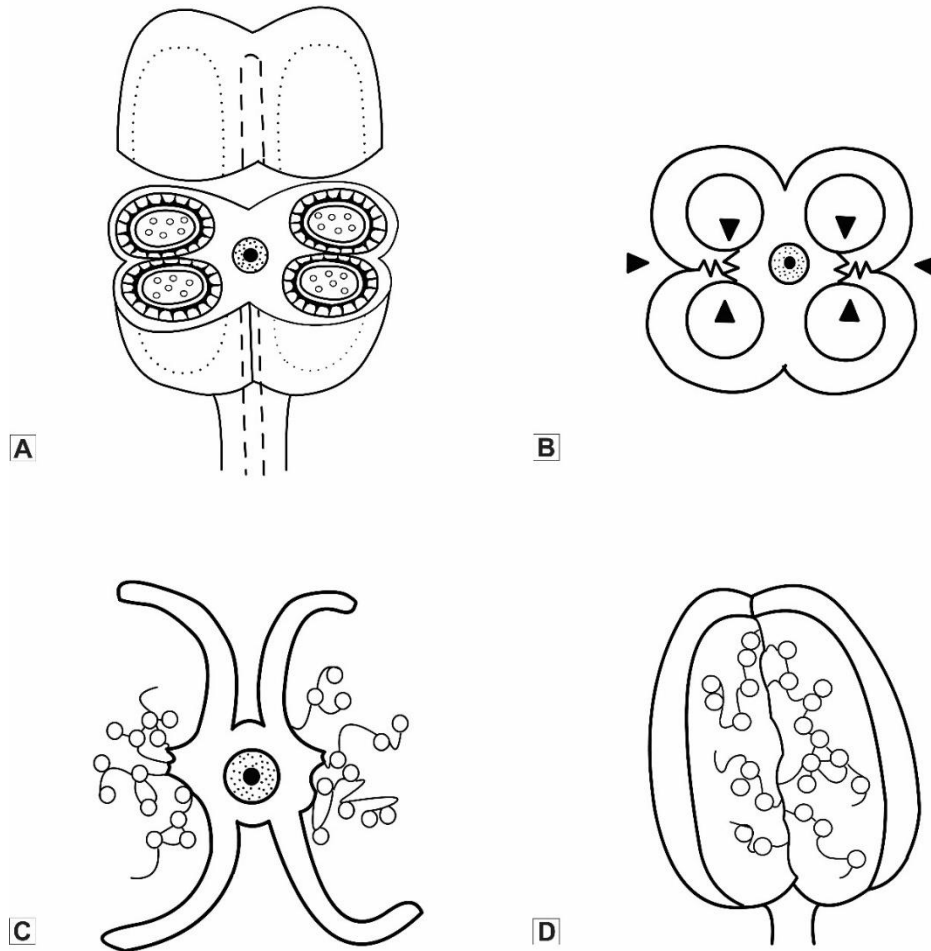


Figura 23. Representación esquemática del androceo en *Gymnocalycium*. **A.** Vista tridimensional de una antera biteca y tetrasporangiada indehiscente; las líneas de punto delimitan los microsporangios, las líneas discontinuas indican el haz vascular central que atraviesa al estambre. **B-C.** Secciones transversales. **B.** Antera inmadura, las líneas en zigzag indican los puntos donde las células se desorganizan y desintegran para que se produzca la apertura del estomio y liberación de los granos de polen. **C.** Antera dehiscente, mostrando las regiones donde fueron observados los conjuntos de granos de polen conectados por hilos a las paredes de las anteras. **D.** Antera dehiscente en vista longitudinal.

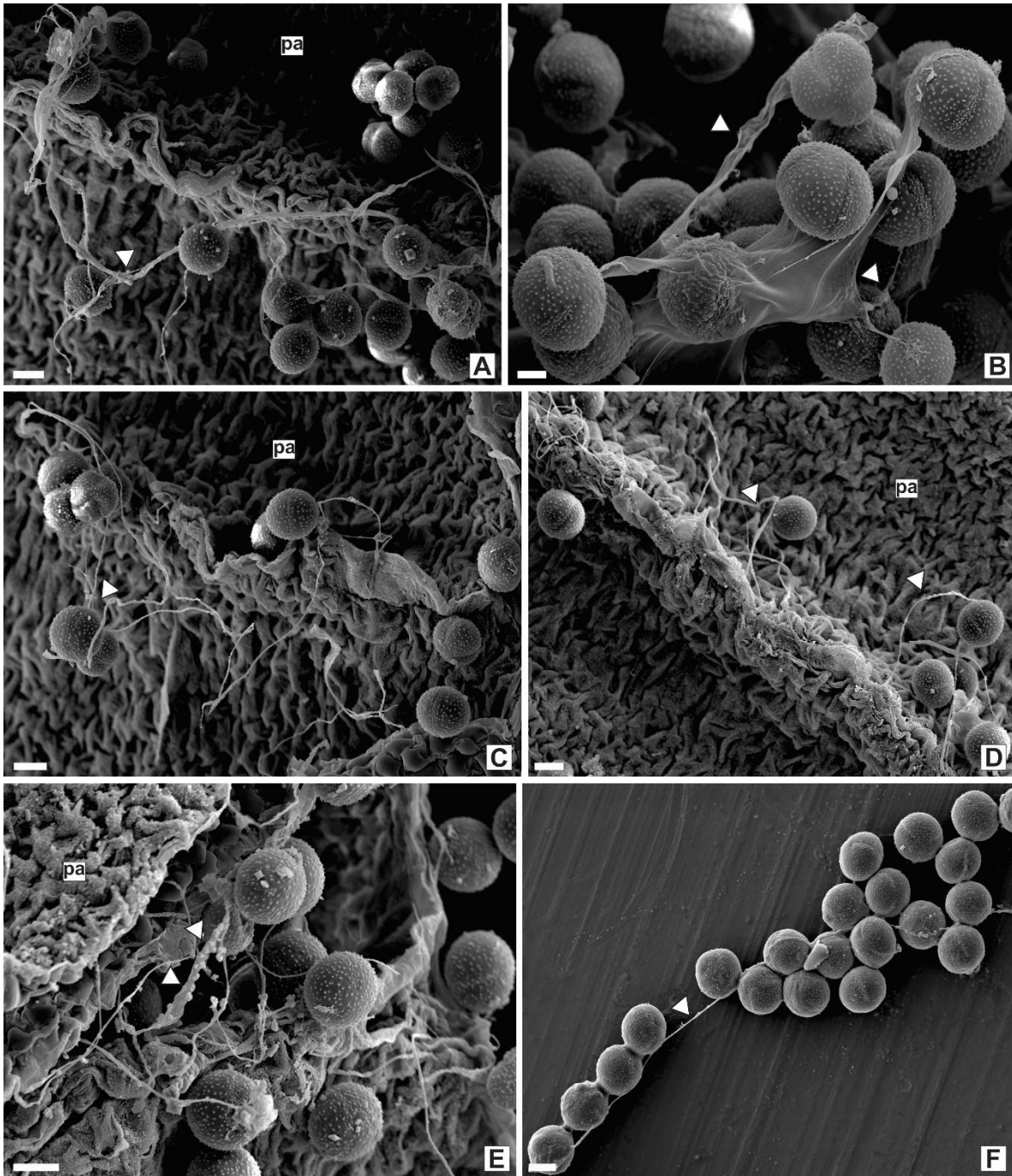


Figura 24. Fotomicrografía obtenida con microscopio electrónico de barrido (MEB) de granos de polen conectados por hilos en especies de *Gymnocalycium*. **A-B.** *G. saglionis*. **C-D.** *G. schickendantzii*. **E-F.** *G. spegazzinii*. Abreviaturas: pa= pared anteral, Δ= estructuras en forma de hilos que conectan los granos de polen. Escalas: A, C- F= 20 μm; B= 10μm.

DISCUSIÓN

Anatomía de estambres

Las características anatómicas registradas en el androceo de las tres especies de *Gymnocalycium* analizadas en este capítulo, permiten diferenciarlas de otras especies de la tribu Trichocereae analizadas en esta tesis, ya que la presencia de tricomas epidérmicos unicelulares cortos en la porción basal de filamentos es un rasgo exclusivo de las especies de *Gymnocalycium*.

La vascularización de las piezas del androceo por medio de un único haz vascular de tipo anficribal que penetra en cada filamento es un carácter conservado dentro de la familia, compartido con especies de *Opuntia* (Fuentes-Pérez, 2008; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009), y *Epiphyllum* (Almeida *et al.*, 2010). Sin embargo, difiere de lo reportado por Tiagi (1955) para *Pereskia bleo*, *Rhipsalis cassutha*, *Opuntia dillenii* y *Mammillaria tenuis*, en su pionera contribución sobre vascularización floral en Cactaceae; y de lo documentado por Fuentes-Pérez (2004), para especies de la tribu Pachycereae (*Escontria chiotilla*, *Lophocereus schottii*, *Myrtillocactus geometrizans*, *Neobuxbaumia mezcalaensis*, *Pachycereus pecten-aboriginum*, *Polaskia chihcipe*, *Stenocereus pruinosus*). En estos dos últimos trabajos, los autores registran la presencia de haces vasculares anfigasales en filamentos y anteras. Con relación a la presencia de estos haces vasculares, sería necesario confirmar el tipo anfigasal, ya que, si resultara correcto, se trataría de un carácter variable dentro de la familia, particularmente dentro del linaje de *Opuntia*.

El análisis macro- y micromorfológico de filamentos sensibles al tacto de algunas especies de *Opuntia* determinó la presencia de rasgos anatómicos probablemente asociados con este movimiento, junto a una organización anatómica diferente a la de filamentos no sensibles (p. ej. grosor de la cutícula, la presencia de estructuras capsulares y papilas epidérmicas, dos capas de células curvas y mayor número de espacios intercelulares de grandes dimensiones) (Cota-Sánchez *et al.*, 2013). En las especies aquí analizadas, tal como sucede en la mayoría de las angiospermas, y en la mayoría de las cactáceas, los filamentos son estructuras más simples (Endress, 1993; Fuentes Pérez, 2004; Fuentes Pérez, *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010). Generalmente, el haz vascular se encuentra rodeado de un tejido parenquimático homogéneo, con espacios intercelulares notables, y células de

mucílago de diferentes tamaños; la epidermis puede presentar células cuadrangulares, papilosas, o con tricomas unicelulares (Tiagi, 1955; Fuentes Pérez, 2004; Fuentes Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010; Cota-Sánchez *et al.*, 2013). La presencia de células con citoplasma con contenidos tánicos o drusas en el parénquima es un carácter comúnmente hallado en algunos linajes de cactáceas (Fuentes-Pérez, 2004); sin embargo, en las especies estudiadas no se registraron estos atributos en los filamentos.

Generalmente, en muchos grupos de angiospermas las células epidérmicas de las anteras se deshidratan a la madurez. Sin embargo, las células epidérmicas de las anteras de las especies de *Gymnocalycium* estudiadas se mantienen globosas y con sustancias aparentemente tánicas, tal como sucede en algunas *Opuntias* (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009;) y en *E. phyllanthus* (Almeida *et al.*, 2010).

Presentación secundaria del polen

La presentación secundaria del polen es una estrategia reproductiva en la que los granos de polen son reubicados desde las anteras para ser presentados en otras estructuras florales (Howell *et al.*, 1993; Ladd, 1994). Este fenómeno ha evolucionado independientemente numerosas veces en angiospermas, fue registrado en 33 familias, incluidas dicotiledóneas y monocotiledóneas (Howell *et al.*, 1993; Yeo, 1993; Erbar & Leins, 1999; Lopes & Machado, 1999; Hesse *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2015; Jadeja, 2015). Se trata de un carácter notable en los órdenes Asterales (Leins & Erbar, 2006; Vranken *et al.*, 2014; Erbar & Leins, 2015), Gentianales (Erbar & Leins, 1999; Lopes & Machado, 1999; Lin *et al.*, 2012) y Zingiberales (Classen-Bockhoff & Heller, 2008; Glinos & Cocucci, 2011; Fan *et al.*, 2015), sin embargo, esta estrategia no ha sido explorada en Cactaceae. En algunos grupos de angiospermas con flores protandras, el gineceo juega un rol importante en la presentación secundaria del polen (Endress, 1993); de hecho, la gran mayoría de las especies dicógamas en las que ha evolucionado la presentación secundaria del polen son protándricas (Howell *et al.*, 1993; Ladd, 1994; Lin *et al.*, 2012; Vranken *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2018). Este carácter coincide con lo observado en los tres taxones de *Gymnocalycium* estudiados cuyas estructuras reproductivas se desarrollan asincrónicamente; así, las anteras maduran primero y abren en el botón floral, en este momento los filamentos se disponen inclinados y retraídos hacia el centro de la flor, de

manera que el polen se deposita tanto en los lóbulos estigmáticos cerrados del estigma aún no receptivo, y un porcentaje cae hacia la base floral donde se ubica la cámara de néctar; desde ambos lugares se presentan a los visitantes florales durante la antesis.

Del mismo modo, la protandria también caracteriza a las flores de *Opuntia polyacantha*, y es considerado como un mecanismo potencial para evitar la autopolinización, ya que en este caso también se registró que los lóbulos del estigma permanecen cerrados en una fase aparentemente no receptiva durante la dehiscencia de los estambres (Cota-Sánchez *et al.*, 2013). Este hecho sugiere que la falta de sincronía en las estructuras reproductivas maduras proporciona alguna ventaja selectiva; se ha asumido que es una adaptación para prevenir la autopolinización y promover la alogamia (Koch & von Helversen, 2006; Fan *et al.*, 2015). Ren *et al.* (2018) mencionan que una desventaja importante de la presentación secundaria del polen es la posibilidad de auto-interferencia debido al polen propio que pueda entrar en contacto con el estigma, lo que puede conducir a la competencia con el polen externo. Por este motivo, se ha propuesto que los mecanismos de autoincompatibilidad, hercogamia y dicogamia contrarrestan los efectos de este problema (Howell *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2012).

Gorostiague (2016), estudió la biología floral de *G. saglionis* y demostró que la especie es autoincompatible. Resultará interesante ampliar este tipo de estudios a otros representantes del género que muestren presentación secundaria del polen, para verificar si se trata de una estrategia reproductiva adicional para evitar la autogamia, común en el linaje, o si resulta un hecho aislado que reasegura la variabilidad genética en esta especie.

Hilos conectando granos de polen

Los resultados de este estudio confirman la presencia de hilos que conectan a un pequeño porcentaje de granos de polen a nivel del estomio en *G. schickendantzii* y reportan dos nuevos casos en especies de *Gymnocalycium* que no habían sido nunca antes estudiadas: *G. saglionis* y *G. spegazzinii*. Estos resultados apoyan la investigación de Halbritter *et al.* (1997), quienes sugieren que este carácter es exclusivo del género. Así, la presencia de granos de polen conectados por hilos a las paredes de anteras, es común para todas las especies de *Gymnocalycium* estudiadas hasta el momento. Sin embargo, este carácter no está presente en especies de géneros cercanamente emparentados dentro de la

tribu (observaciones personales en géneros contemplados en esta tesis), ni en géneros de la tribu Notocactaceae, cercanamente emparentada a Trichocereae (Halbritter & Till, 1996).

Si bien las estructuras en forma de hilos que conectan a los granos de polen en las especies de *Gymnocalycium* son resistentes a los procesamientos para estudios bajo microscopía óptica, no resisten a los procesos de acetólisis (Leuenberger, 1976), lo que sugiere que no forman parte de la pared de los granos de polen, e indica ausencia de esporopolenina (Halbritter *et al.*, 1997).

En las angiospermas zoófilas (mayormente en las entomófilas), la transferencia de polen mediada por animales depende principalmente de la adhesión de los granos de polen pegajosos y aglomerados al cuerpo de los visitantes florales (Hesse, 1981). Los polinizadores de *Gymnocalycium* son pequeños insectos, especialmente abejas (Halbritter *et al.*, 1997) y, en particular en *G. saglionis*, los polinizadores efectivos registrados fueron abejas y avispa (Gorostiague, 2016). De manera que, cabría esperar que estas estructuras filiformes constituyan vehículos eficientes de transporte de polen. Por ejemplo, en *Heliconia* (Heliconiaceae), los hilos flexibles se mezclan y enredan los granos individuales para formar agregados que aseguran que el polen se incruste en las plumas o se adhiera al pico de los colibríes polinizadores (Rose & Barthlott, 1995).

Los largos y robustos hilos que unen a los granos de polen en *Gymnocalycium* se originan a partir de las células que componen las anteras a lo largo o cerca de la línea de dehiscencia estomial; las sustancias formadoras de hilos derivan, a diferencia de la mayoría de las otras familias con hilos sin esporopolenina, de partes de paredes celulares modificadas de la región del tabique/estomio, y de productos del citoplasma tapetal (Halbritter *et al.*, 1997; Hesse *et al.*, 2000). En géneros de familias tan distantes como *Heliconia*, *Impatiens* y *Strelitzia*, se ha registrado que estos hilos son de origen celular, ya sea a partir de partes de células distintas, o a partir de paredes modificadas de células estomiales y septales junto con distintos derivados de células tapetales (Hesse *et al.*, 2000). Los engrosamientos globulares observados en el análisis bajo microscopio electrónico de barrido muy probablemente representan pollenkitt o restos lipídicos y tapetales (Halbritter *et al.*, 1997). El hecho de que la naturaleza de los hilos se asocie a las paredes celulares del septo y tapete degenerados, sugiere que los mismos se forman antes de que ocurra la

dehiscencia de las anteras; en el caso de las tres especies aquí estudiadas, esto ocurre inclusive un tiempo antes de la antesis floral.

En *Gymnocalycium*, los hilos no son predominantes dentro de las anteras y se considera que enredan un pequeño porcentaje de granos de polen solo por accidente, el mayor porcentaje del polen se libera independiente de estas estructuras y, por lo tanto, se considera que no cumplen una función directa en la ecología de la polinización (Hesse *et al.*, 2000). Halbritter *et al.* (1997), han sugerido que en este caso, la transferencia de granos de polen conectados a hilos mediada por polinizadores puede ser solo un fenómeno marginal y accidental.

CONCLUSIONES

*Se confirma la presencia de hilos que conectan granos de polen en dos representantes de *Gymnocalycium* que no habían sido estudiadas: *G. saglionis* y *G. spegazzinii*.

*La presencia de hilos que conectan granos de polen ha evolucionado independientemente en diferentes géneros de familias de angiospermas no emparentadas, en *Gymnocalycium* se muestra como un carácter taxonómico fuerte que apoya la monofilia de este linaje de Cactaceae.

*Los resultados apoyan la hipótesis de que este último carácter es útil y sería taxonómicamente diagnóstico para definir al género *Gymnocalycium*.

*Las tres especies de *Gymnocalycium* analizadas representan el primer caso documentado de presentación secundaria del polen en Cactaceae.

CAPÍTULO 6

MORFO-ANATOMÍA DEL GINECEO Y RECORRIDO DEL TUBO POLÍNICO EN ESPECIES DE TRICHOCEREEAE



INTRODUCCION

Las cactáceas representan un linaje altamente especializado a los ambientes áridos en los que evolucionaron (Anderson, 2001). La estructura de las flores de los cactus exhibe varios caracteres relacionados a la adaptación a ambientes secos o a diferentes modos de polinización (Cota Sánchez, 1993). La mayoría de los miembros de Cactaceae presenta ovario ínfero, rodeado de tejido del tallo, cubierto por brácteas o areolas, que protegen de la desecación tanto a óvulos como a semillas en desarrollo (Gibson & Nobel, 1986; Nyffeler, 2002). Sin embargo, la naturaleza del ovario ínfero en Cactaceae ha sido uno de los temas más discutidos en la morfología floral (Tiagi, 1955), debido a que el gineceo se encuentra rodeado por tejido de origen receptacular, y no por tejido derivado de las porciones connadas de otros verticilos florales (origen apendicular) (Tiagi, 1955; Ross, 1982; Boke, 1964). La presencia de brácteas, espinas o escamas en el exterior de los ovarios de muchas especies, apoya esta interpretación (Boke, 1980).

Tiagi (1955) sostiene que una progresión de tipos de ovario dentro de Cactaceae muestra aumento de hundimiento del lóculo del ovario en las diferentes subfamilias. El soporte filogenético de la periginia como paso evolutivo intermedio es pobre, y se sugiere que esta condición es derivada evolutivamente. Sin embargo, el caso de periginia de algunas especies de *Pereskia*, parece revelar ese paso evolutivo transicional (Boke, 1963, 1966). La visión tradicional postula la tendencia evolutiva del cambio de ovario súpero a ínfero en Angiospermas; sin embargo, se ha observado que la evolución de la posición del ovario es mucho más compleja, y puede incluir cambios alométricos en el desarrollo que producirían una amplia gama de posiciones de ovario entre especies estrechamente relacionadas, lo que implica un mayor crecimiento relativo en las regiones superior o inferior de un ovario (Soltis *et al.*, 2003).

El término “cactidium”, fue recientemente propuesto para clasificar a los complejos frutos de los cactus que derivan de los ovarios ínferos, y define estructuras diferentes a las de las demás angiospermas, en las que el pericarpio está conformado por (1) la epidermis ovárica interna que delimita el lóculo de la fruta, (2) el tejido propio del ovario, (3) haces vasculares colaterales, (4) el tejido del pericarpelo de origen receptacular, y (5) la epidermis externa del pericarpelo (Almeida *et al.*, 2019).

El análisis de la estructura del gineceo permite identificar las características de los tejidos involucrados en el recorrido del tubo polínico, proceso de suma importancia para

el éxito reproductivo en las plantas con flores. Las características de las células involucradas en el recorrido del tubo polínico muestran ser bastantes constantes, están relacionadas con la producción de una secreción a través de la cual crece el tubo polínico (Gotelli *et al.*, 2017). Diversos estudios han revelado la importancia de dilucidar el recorrido del tubo polínico en diferentes especies. Por ejemplo, en el mango (*Mangifera indica*), inicialmente se había sugerido que el reducido set de frutos que normalmente se produce, es el resultado de la cutícula extraordinariamente gruesa y ornamentada que tapiza las células receptoras estigmáticas, la cual reduciría drásticamente la entrada del tubo polínico, y provocaría que la mayoría de los óvulos no se fertilicen y de esta manera se produzca un elevado porcentaje de aborto de flores no fecundadas (John *et al.*, 1987). Sin embargo, de Wet *et al.* (1990) refutaron esta idea a través de una investigación ultraestructural que permitió a los autores postular otras hipótesis no relacionadas con la estructura de estigma y estilo, que explican la baja producción de los cultivos.

Dado que la anatomía del gineceo en Cactaceae aún resulta intrigante, algunos autores han planteado la necesidad describir la naturaleza del tejido de transmisión e identificar su función para entender la variación de este tejido en la familia (Fuentes-Pérez, 2009; Almeida *et al.*, 2010). En este contexto, en este capítulo se analizó comparativamente la morfo-anatomía del gineceo en representantes de *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis*, *Gymnocalycium* y *Harrisia*, para caracterizar a las especies y aportar información que ayude a dilucidar el recorrido del tubo polínico.

RESULTADOS

Morfo-anatomía del Gineceo

Pericarpelo, Ovario y Óvulos

El pericarpelo que rodea al tejido ovárico muestra características constantes en todas las especies analizadas. La epidermis es glabra, el parénquima subyacente presenta abundantes cavidades mucilaginosas de diferentes dimensiones, idioblastos con drusas y haces vasculares dispuestos en anillos, entre los que sobresalen los haces recurrentes (Fig. 25A- D).

El gineceo de las especies aquí analizadas se encuentra fusionado congénitamente desde su base, resultando en un ovario unilocular formado por un número de carpelos que varía según la especie. En general, el tejido que corresponde al ovario está constituido por unas pocas capas de células de menores dimensiones en relación al tamaño de las células del parénquima pericarpelar; además, muestran grandes espacios intercelulares (Fig. 25B, E; 26E).

En todas las especies analizadas, la morfología de los óvulos es muy similar. Son bitégmicos y crasinucelados, generalmente muestran espacios de aire entre ambos tegumentos en la región calazal (Figs. 25F; 26A- D). Se trata de los típicos óvulos de tipo circinótropos, cuyos funículos se encuentran muy desarrollados longitudinalmente y hacen que los óvulos giren en espiral en su propio eje; un único haz vascular central recorre el funículo y finaliza en la calaza de cada óvulo. La epidermis ventral del funículo que queda expuesta a la micrópila presenta tricomas unicelulares en todas las especies analizadas (Fig. 26A-D, F). Los funículos son ramificados, un número variable de ellos nace a partir de una base común (Fig. 26E). Se han observados drusas en el parénquima del funículo (Fig. 26F). La micrópila está formada por los extremos engrosados de los tegumentos internos que se ubican cercanos al funículo (Figs. 25F; 26A- D). En general, el tegumento interno tiene 2 capas de grosor en el extremo calazal, y presenta 3–4 capas hacia la micrópila.

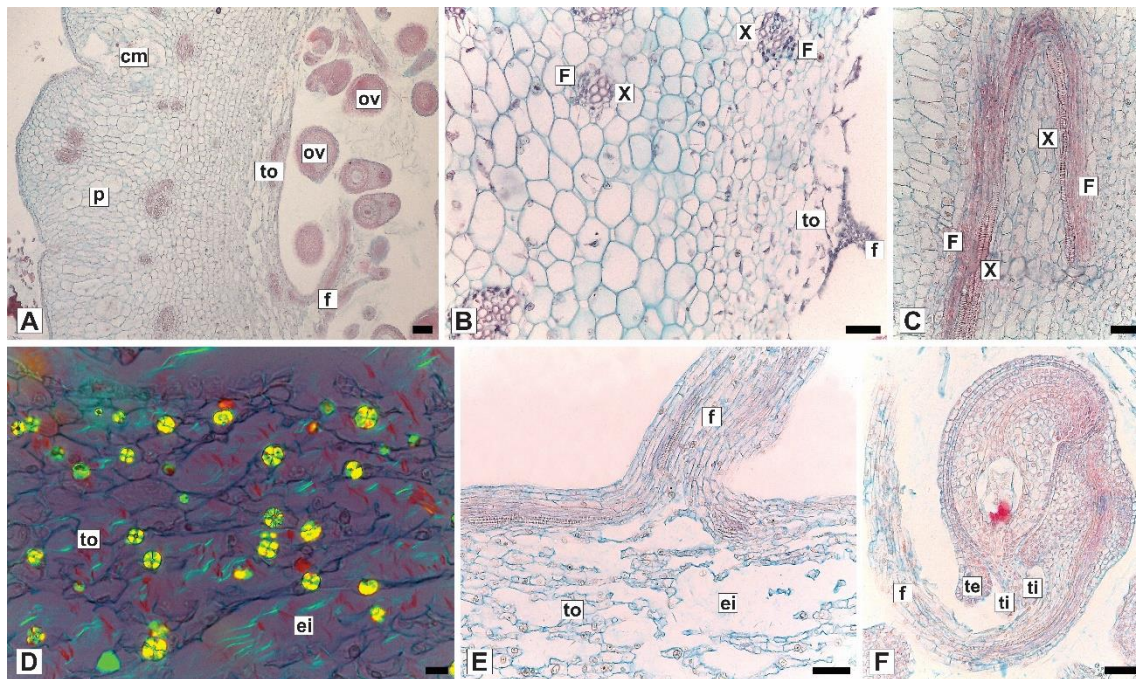


Figura 25. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de gineceo en *Cleistocactus baumannii*. **A, B, D-F.** Secciones transversales. **A.** Porción de ovario. **B.** Detalle de la pared del ovario, observe la posición invertida de xilema y floema en haces vasculares próximos al lóculo. **C.** Detalle de un haz vascular recurrente en sección longitudinal de ovario. **D.** Detalle de células con drusas en parénquima ovárico observadas con luz polarizada. **E.** Detalle de pared de ovario con un funículo. **F.** Óvulo circinótropo. Abreviaturas: cm= cavidad mucilaginosa; ei= espacio intercelular; f= funículo; F= floema; p= pericarpelo; te= tegumento externo; ti= tegumento interno; to= tejido ovárico; X= xilema. Escalas: A= 100 μ m; B, C, F= 50 μ m; D= 10 μ m; E= 30 μ m.

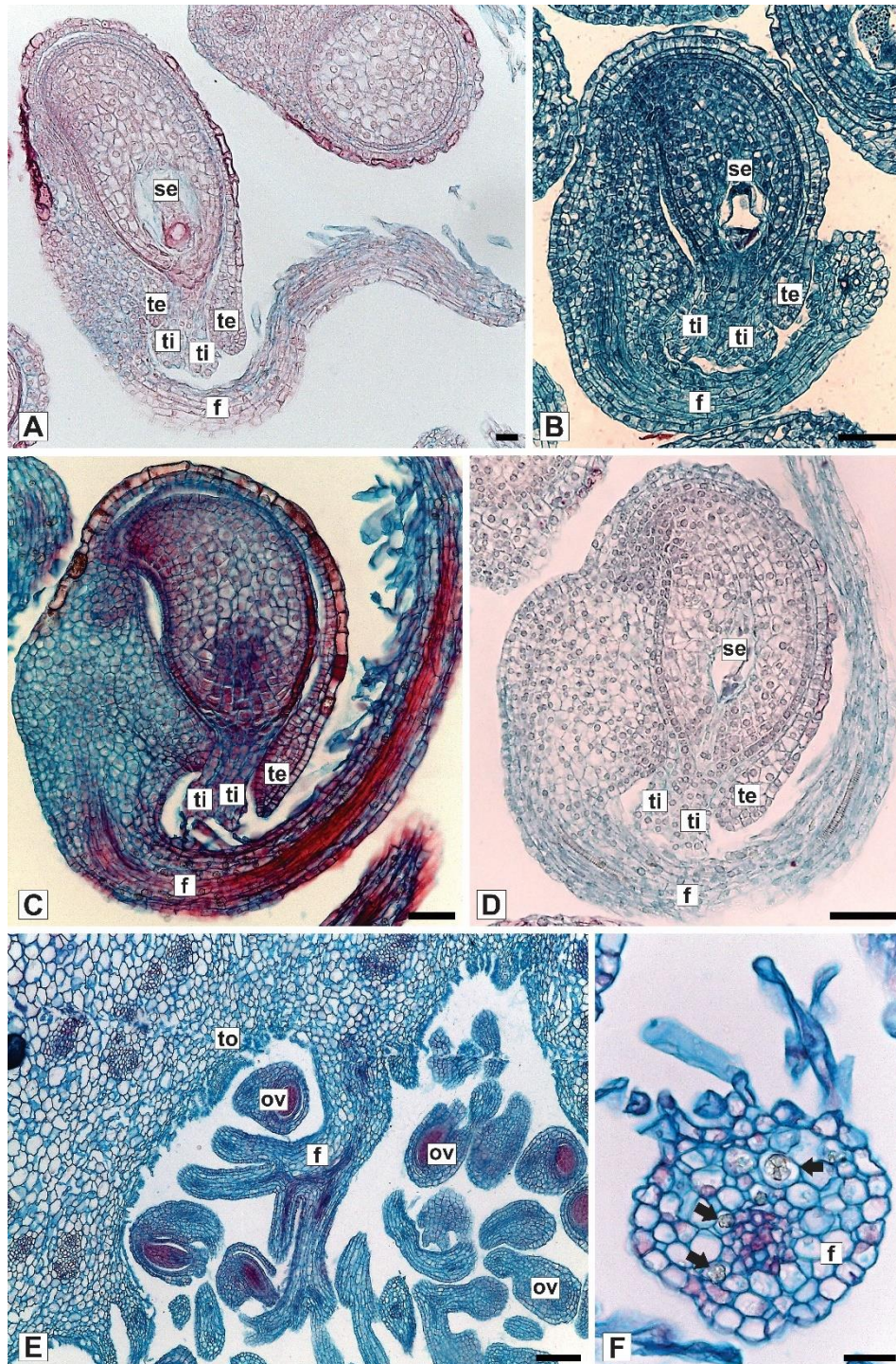


Figura 26. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de óvulos en especies de la tribu Trichocereae. **A-D.** Sección longitudinal de óvulos. **A.** *Cleistocactus hyalacanthus*. **B.** *Denmoza rhodacantha*. **C.** *E. terscheckii*. **D.** *Gymnocalycium saglionis*. **E-F.** Secciones transversales de ovario en *E. schickendantzii*. **E.** Porción de la pared del ovario, note la ramificación de funículos. **F.** Funículo, observe las drusas en el parénquima (flechas negras) y tricomas epidérmicos. Abreviaturas: f= funículo; ov= óvulo; se= saco embrionario; te= tegumento externo; ti= tegumento interno; to= tejido ovárico. Escalas: A, D, F= 20; B, C= 50; E= 100.

Primer registro en Cactaceae de óvulos con pico nucelar

Echinopsis aurea y *E. haematantha* representan los primeros casos registrados en Cactaceae de óvulos con pico nucelar. En ambas especies, la nucela crece y se extiende más allá de la micrópila que delimitan los tegumentos internos (Figs. 27A-D y 28A-E). Sin embargo, el pico nucelar exhibe un tamaño de diferentes proporciones en cada especie. En *E. haematantha* el desarrollo de esta estructura es mucho más marcado y el saco embrionario completo acompaña el crecimiento de la nucela hacia el exterior del cuerpo del óvulo, y queda expuesto por fuera del mismo (Figs. 27C-D y 28C-E). La disposición ordenada de las células de la nucela que rodean al saco embrionario, junto a la forma conservada que evidencian en el pico nucelar de *E. haematantha*, sugieren actividad mitótica reciente en estas células (Fig. 27D).

La forma adelgazada y alargada observada en el saco embrionario de *E. aurea*, sugiere que el crecimiento de la nucela presiona a esta estructura. En ambas especies, aparentemente el saco embrionario comienza a formarse normalmente dentro del cuerpo del óvulo, y a medida que el tejido nucelar se divide, el saco embrionario es desplazado hacia el extremo micropilar hasta ser expulsado del cuerpo del óvulo.

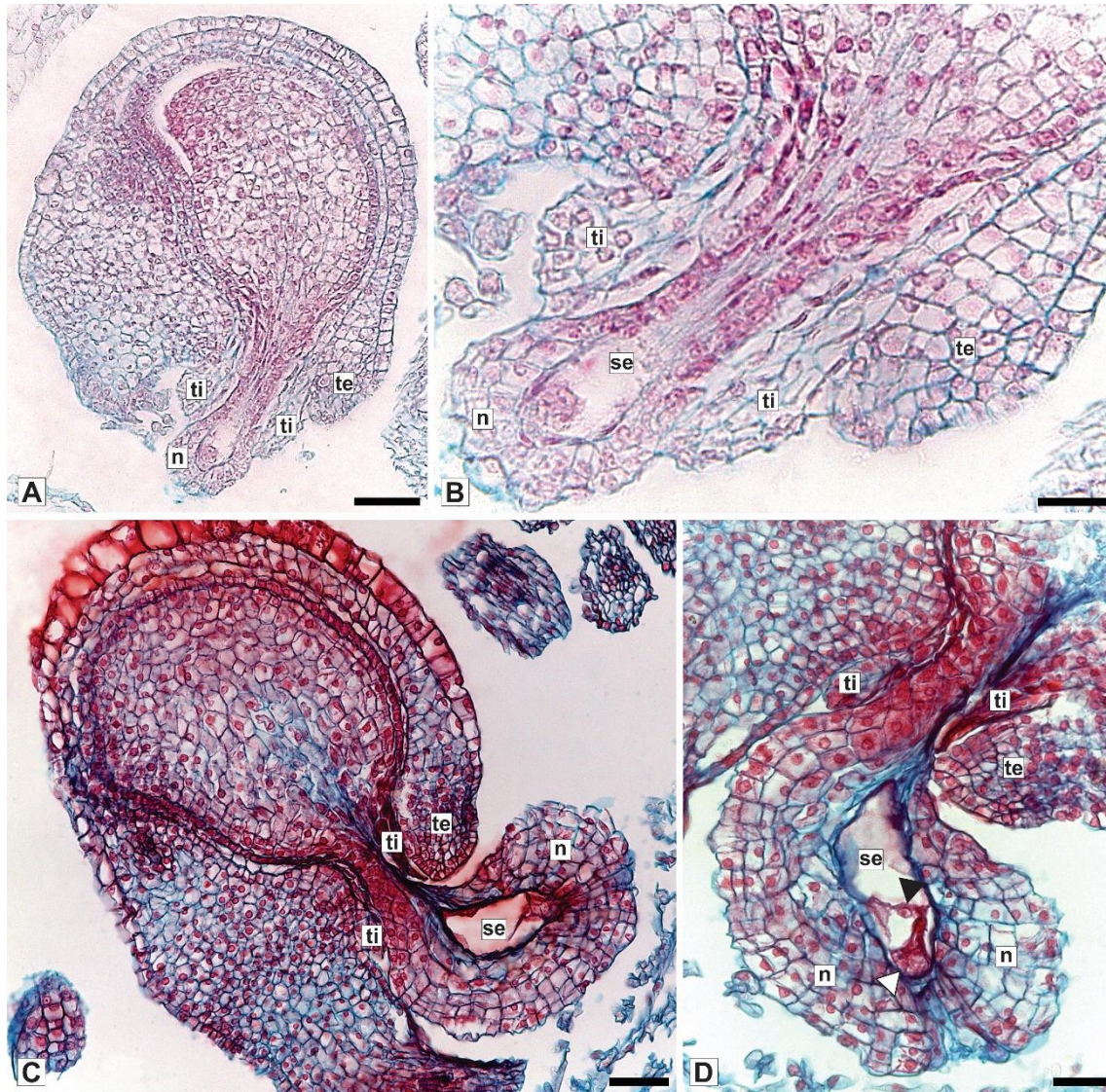


Figura 27. Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico de óvulos con pico nucelar. **A-B.** *Echinopsis aurea*. **A.** Óvulo con pico nucelar. **B.** Detalle de pico nucelar. **C-D.** *E. haematantha*. **C.** Óvulo con pico nucelar. **D.** Detalle de pico nucelar, note el saco embrionario con una célula central (punta de flecha negra), y una sinérgida (punta de flecha blanca). Abreviaturas: n= nucela; se= saco embrionario; te= tegumento externo; ti= tegumento interno. Escalas: A, C= 50 μ m; B= 20 μ m; D= 30 μ m.

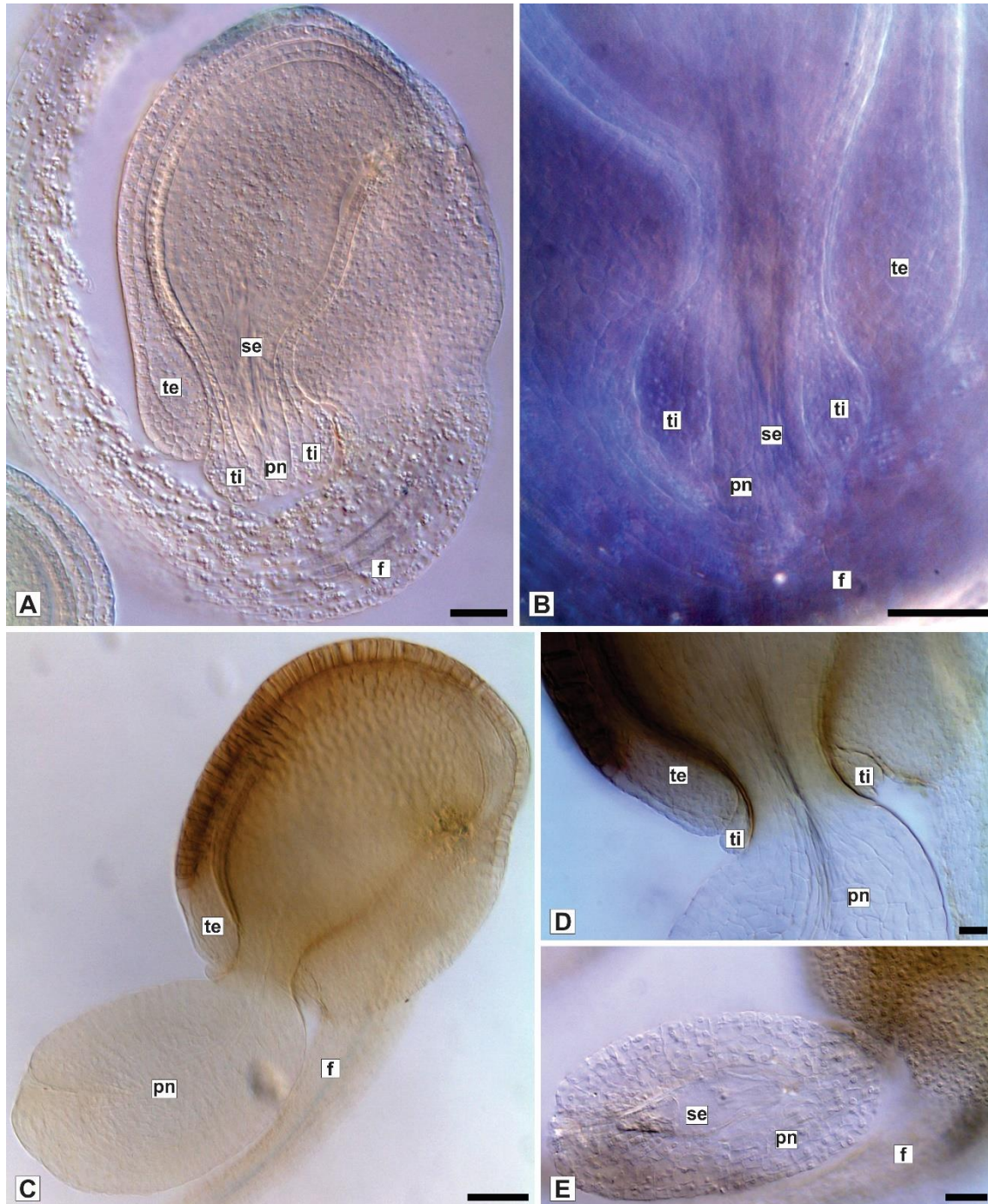


Figura 28. Fotomicrografías obtenidas con microscopio de contraste diferencial interferencial (DIC) de óvulos con pico nucelar. **A-B.** *Echinopsis aurea*. **C-E.** *E. haematantha*. **A, C.** Óvulos maduros con pico nucelar desarrollado. **B, D, E.** Detalle del pico nucelar, observe la ubicación del saco embrionario en cada especie. Abreviaturas: f= funículo; te= tegumento externo; ti= tegumento interno; pn= pico nucelar; se=saco embrionario. Escalas: A, B, E= 50 μ m; C= 100 μ m; D= 30 μ m.

Estilo y Estigma

Todas las especies de Trichocereae analizadas comparten estilos semicerrados atravesados longitudinalmente por un canal estilar rodeado por múltiples estratos de tejido de transmisión. Las características epidérmicas del canal estilar así como el diámetro del mismo varían en las diferentes especies. En general, el canal estilar es amplio en la porción superior del estilo y se va estrechando hacia la base del mismo, sin perder la condición de abierto (Fig. 29A-D). El estilo, en sección transversal, está constituido por (1) una epidermis externa, (2) parénquima cortical en donde se ubica el tejido vascular, (3) tejido de transmisión y (4) la epidermis interna que reviste el canal estilar (Fig. 29C-D). La única excepción a esta regla la constituye *Parodia microsperma* (tribu Notocactae), que presenta estilo semicerrado en la porción distal y cerrado por tejido de transmisión en la base (ver capítulo 7).

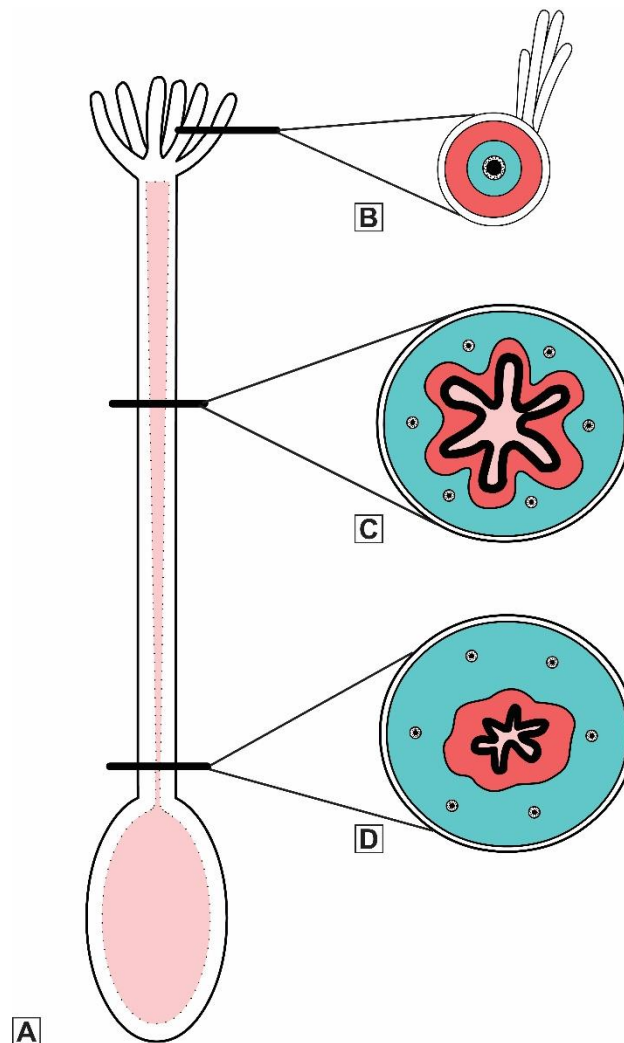


Figura 29. Representación esquemática del gineceo en Trichocereae. **A.** Sección longitudinal del gineceo, note el estrechamiento del canal hacia la base del estilo. **B-D.**

Secciones transversales. **B.** Lóbulo estigmático, se muestra de manera simplificada un solo tricoma epidérmico. **C.** Porción media del estilo. **D.** Porción basal del estilo. Referencias de colores: celeste= parénquima; negro= xilema del haz vascular; rojo= tejido de transmisión; rosa claro= cavidad estilar y cavidad ovárica; las líneas negras de trazo grueso representan la epidermis del canal estilar. Aclaración: las imágenes no fueron diseñadas a escala.

La epidermis interna que recubre el canal estilar presenta tricomas en *C. baumannii*, *D. rhodacantha*, *G. saglionis* y *H. pomanensis* (Figs. 30E, 31G, I, 33F, H, 34H, I), es glabra en *E. atacamensis* y *E. tubiflora* delimitando en corte transversal un canal circular conspicuo (Figs. 9J y 32F). En *G. saglionis*, los tricomas multicelulares multiseriados se ubican llenando el lumen del canal dando una apariencia de estilo sólido en algunas porciones del mismo (Fig. 33F). Subyacente a la epidermis interna, se ubica el tejido de transmisión, un tejido compacto que en sección transversal muestra células redondeadas, de pequeño diámetro, citoplasma denso y núcleos grandes que ocupan la mayor parte del pequeño lumen celular (Figs. 30E-F, 31G, I, 32F-H, 33F, H, 34H, I). Por afuera de este tejido se dispone un parénquima cortical, con células isodiamétricas de tamaño irregular, en el cual se encuentran los haces vasculares dispuestos en un arreglo en anillo, que irrigan al estilo, y numerosas cavidades mucilaginosas dispersas en el mismo (Figs. 30E-F, 31G, I, 32F-H, 33F, H, 34H). En todos los casos analizados, el número de haces vasculares que inervan el estilo, se corresponden con el número de lóbulos estigmáticos, y por ende, con el número de carpelos de cada especie.

La epidermis externa del estilo presenta papilas en todas las especies de *Gymnocalycium* analizadas (Fig. 33F), mientras que las especies de *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis*, *Harrisia* muestra una epidermis con células cuadrangulares, con cutícula generalmente gruesa (Figs. 30E-F, 31G, I, 32F-H, 34H).

El número de lóbulos estigmáticos varía según la especie y además muestra cierta variación intraespecífica. El estigma, como una extensión del estilo, se encuentra estructuralmente organizado de una manera muy similar, de afuera hacia el centro se distingue la epidermis tricomática, el tejido de transmisión subyacente, e inmediatamente seguido se disponen capas de parénquima rodeando al haz vascular central de cada lóbulo (Fig. 29B).

En todos los casos, el número de haces que inerva el estilo se corresponde con el número de lóbulos estigmáticos. Cada lóbulo estigmático recibe un único haz que muestra

abundante xilema (Figs. 31A, B, 32D, E, 34A, B). Cada haz se encuentra rodeado por un número variable de estratos de parénquima; subyacente a este tejido se ubica el tejido de transmisión, con las mismas características que se observan en el estilo (Figs. 30A, 31A, B, 32D, E, 33A, 34A, B). En todas las especies analizadas de la tribu Trichocereae, la superficie receptiva de cada lóbulo presenta típicamente tricomas multicelulares multiseriados que recubren los lóbulos desde el ápice hasta la base, en la región en donde éstos se fusionan para formar la porción más apical del estilo (Fig. 6J, K).

Recorrido del tubo polínico

Una vez que los granos de polen son depositados en los lóbulos del estigma, entran en contacto con los tricomas de la superficie receptiva de cada lóbulo, y germinan (Fig. 30A, C-D, 31C, 32B-C, 33A-E, 34D-G). Los tubos polínicos crecen y comienzan su recorrido hacia los óvulos, penetrando en las células de estos tricomas que pueden aparecer curvados, reteniendo a las unidades polínicas (Fig. 32B). Continúan su recorrido hacia el ovario a través del tejido de transmisión que subyace a la epidermis de cada lóbulo. Los tubos polínicos crecen a través de la matriz intercelular del tejido trasmisor (Fig. 33D, E). A medida que los tubos crecen para alcanzar los óvulos, a través del estigma y luego del estilo, el tejido se vuelve laxo y se generan grandes espacios intercelulares (Figs. 32F, H-J, 33A-C, 34G). Se ha observado que la mayoría de los tubos polínicos crecen a través del estilo, en el límite entre el tejido de transmisión y el parénquima subyacente (Figs. 31H, 32I-J, 33G).

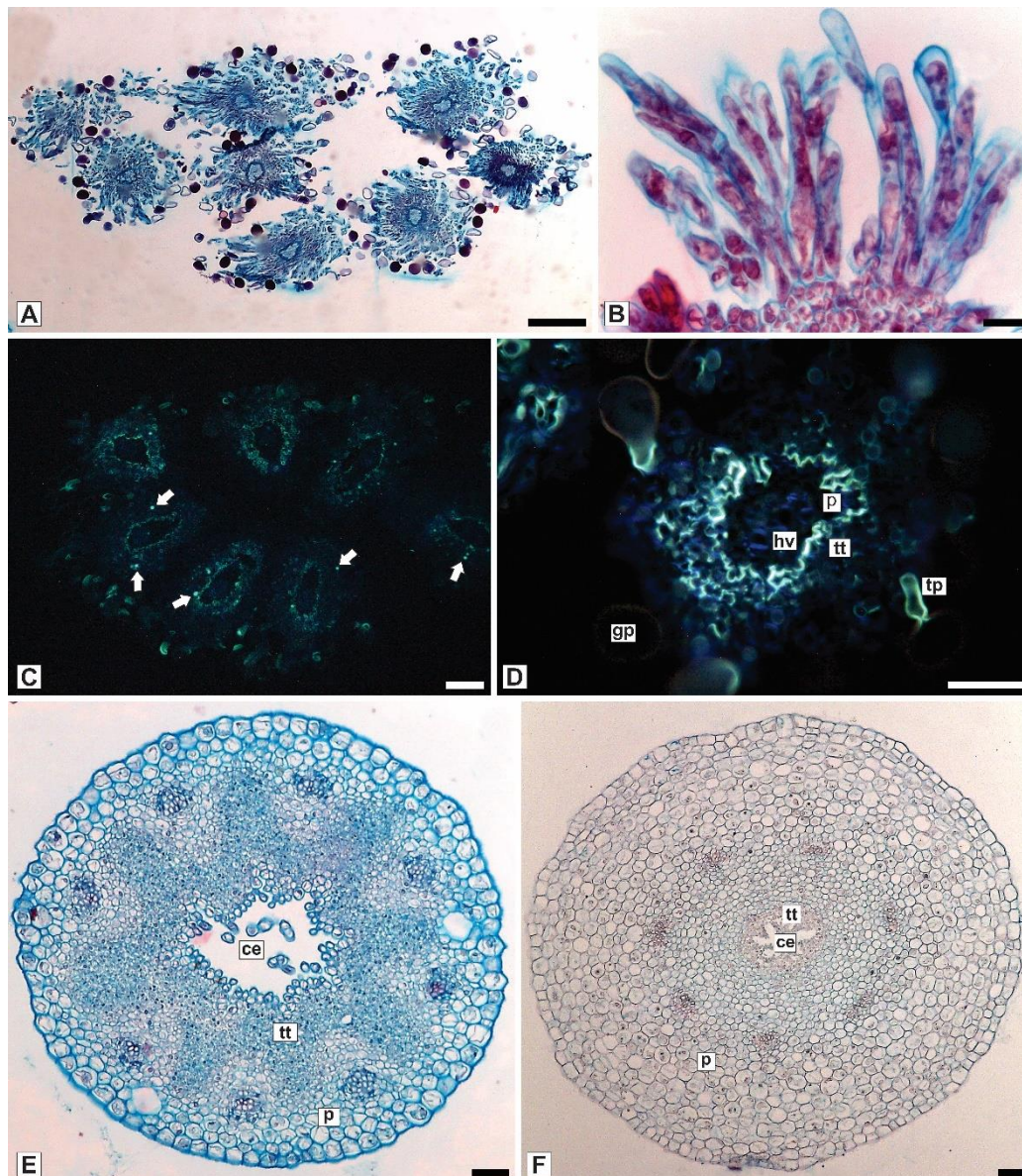


Figura 30. Recorrido del tubo polínico en *Cleistocactus baumannii*. **A-B, E-F.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de estigma y estilo en secciones transversales. **A.** Conjunto de lóbulos de un estigma. **B.** Detalle de tricomas multicelulares multiseriados de un lóbulo estigmático. **C-D.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio de fluorescencia de estigma en sección transversal. **C.** Conjunto de lóbulos de un estigma, note la fluorescencia de la calosa de los tubos polínicos (flechas blancas) **D.** Detalle de un lóbulo estigmático, note los granos de polen germinando sobre tricomas estigmáticos. **E.** Porción distal de estilo. **F.** Porción basal del estilo, note el estrechamiento del lumen de la cavidad estilar. Abreviaturas: ce= cavidad estilar; gp= grano de polen; p= parénquima; tp= tubo polínico; tt= tejido de transmisión. Escalas: A= 200µm; B= 20 µm; C-D= 0,1mm; E-F=50 µm.

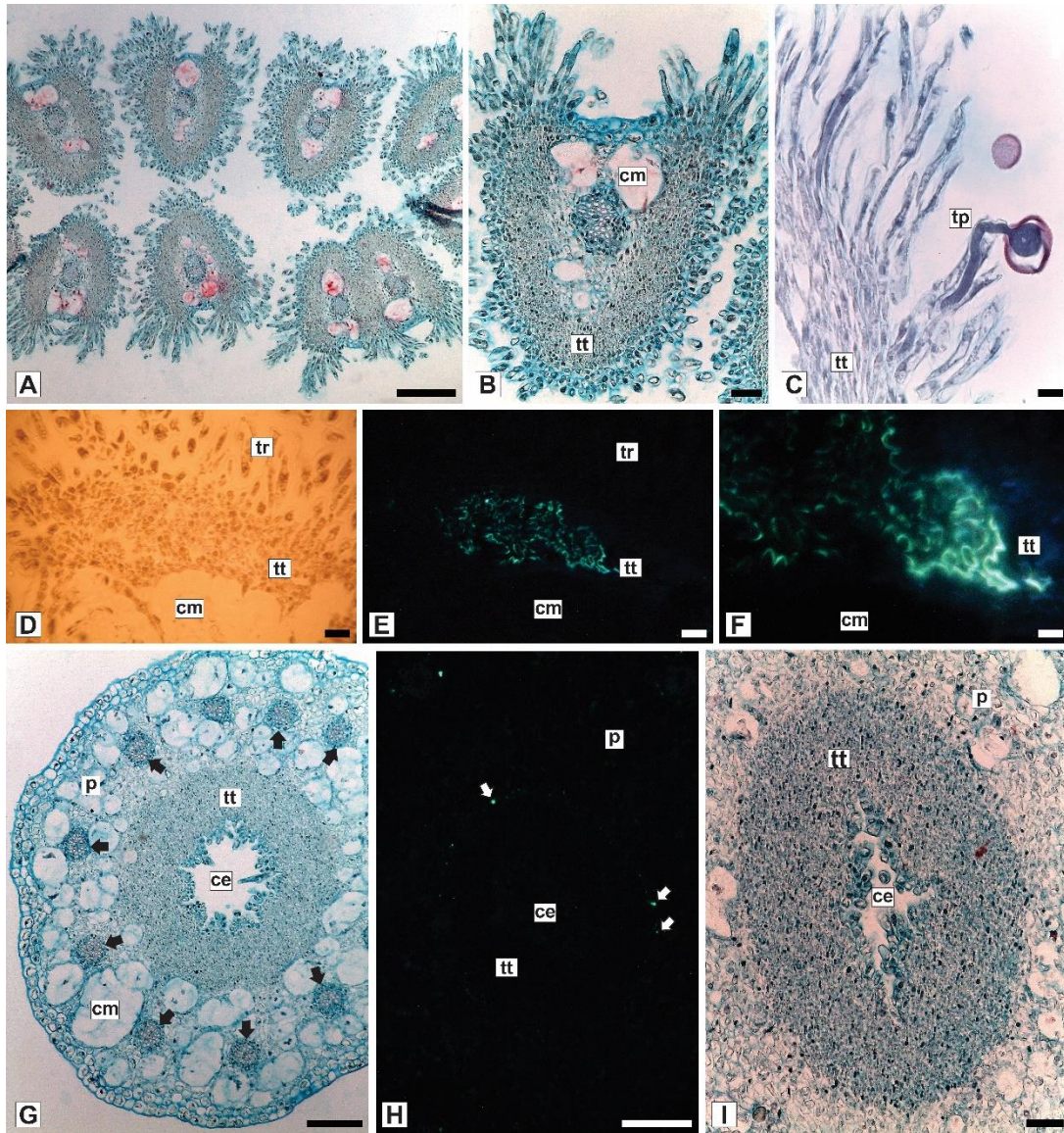


Figura 31. Recorrido del tubo polínico en *Denmoza rhodacantha*. **A-I.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de estilo y estigma en secciones transversales. **A.** Conjunto de lóbulos de un estigma. **B.** Detalle de un lóbulo estigmático. **C.** Detalle de tricomas estigmáticos con un grano de polen germinado. **D.** Porción de lóbulo estigmático. **E.** Imagen D vista con fluorescencia, note el crecimiento de los tubos polínicos que se encuentra restringido a la posición ocupada por el tejido de transmisión. **F.** Detalle de E, note la fluorescencia de la calosa alrededor de las células del tejido de transmisión. **G.** Porción distal de estilo, note los haces vasculares (flechas negras). **H.** Porción distal de estilo vista con fluorescencia, note los tubos polínicos creciendo en el límite entre el tejido de transmisión y el parénquima subyacente (flechas blancas). **I.** Porción basal del estilo, note el estrechamiento del canal estilar. Abreviaturas: ce= canal estilar; cm= cavidad mucilaginosa; p= parénquima; tp= tubo polínico; tt= tejido de transmisión. Escalas: A= 250µm; B, I= 50µm; C=20 µm; D-F, H= 0,1mm; 150 µm; G= 200 µm.

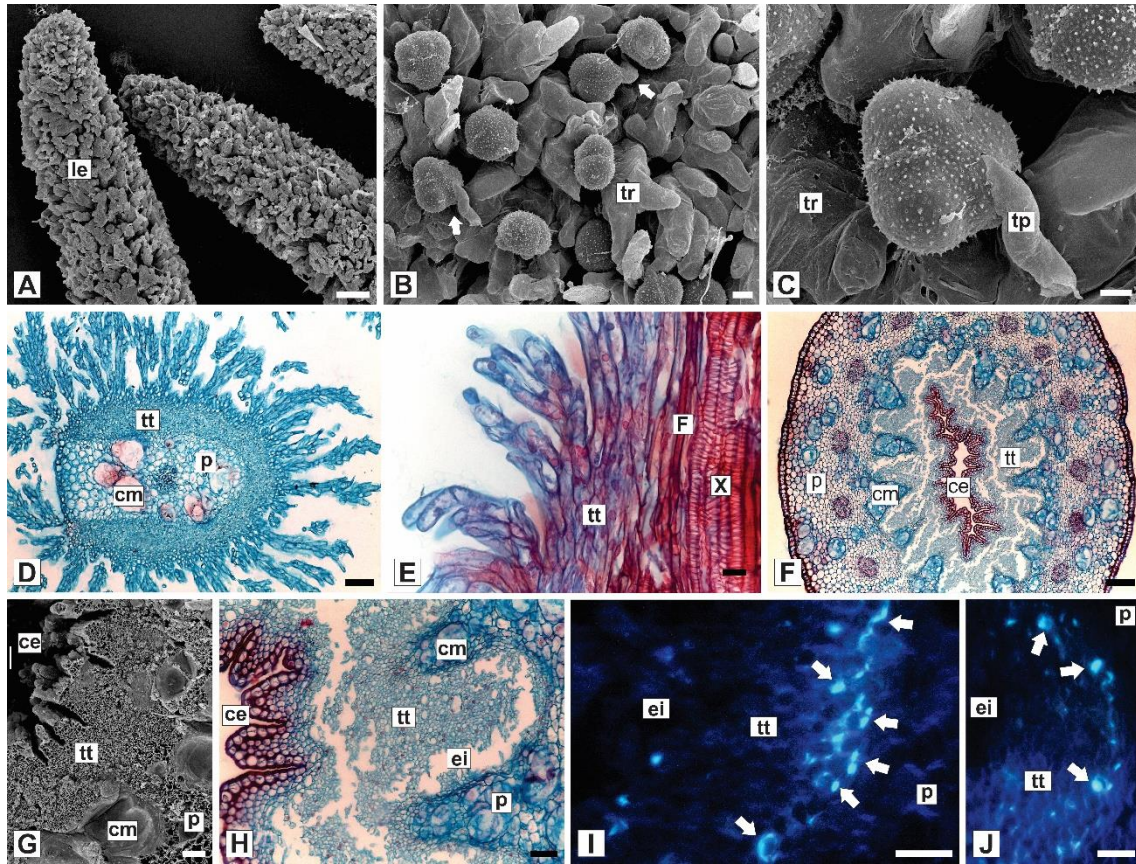


Figura 32. Recorrido del tubo polínico en especies de *Echinopsis*. **A-C, G.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio electrónico de barrido (MEB) de *E. terscheckii*. **A.** Vista superficial de una porción distal de lóbulos estigmáticos. **B.** Detalle de superficie estigmática receptiva, note los granos de polen germinando, adheridos a tricomas (flechas blancas). **C.** Detalle de un grano de polen germinado sobre la superficie estigmática. **D-F, H.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de estilo y estigma en *E. atacamensis*. **D, F-J.** Secciones transversales. **D.** Detalle de un lóbulo del estigma. **E.** Porción de lóbulo estigmático en sección longitudinal, note el haz vascular con abundante xilema. **F.** Porción distal de estilo. **G.** Detalle de porción estilo (MEB) en *E. terscheckii*. **H.** Detalle de porción estilo (MO) en *E. atacamensis*. **I-J.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio de fluorescencia de estigma en sección transversal. **I.** Porción de estilo con granos de polen germinados en el límite entre tejido de transmisión y parénquima (flechas blancas). **J.** Detalle del tejido de transmisión, note la fluorescencia de la calosa de los tubos polínicos (flechas blancas). Abreviaturas: ce= cavidad estilar; cm= células mucilaginosas; ei= espacio intercelular; F= floema; hv= haz vascular; le= lóbulo estigmático; tp= tubo polínico; tr= tricoma estigmático; tt= tejido de transmisión; X=xilema. Escalas: A, F= 200 μ m; B, E= 20 μ m; C=10 μ m; D= 100 μ m; G-H= 50 μ m; I-J= 0,02mm.

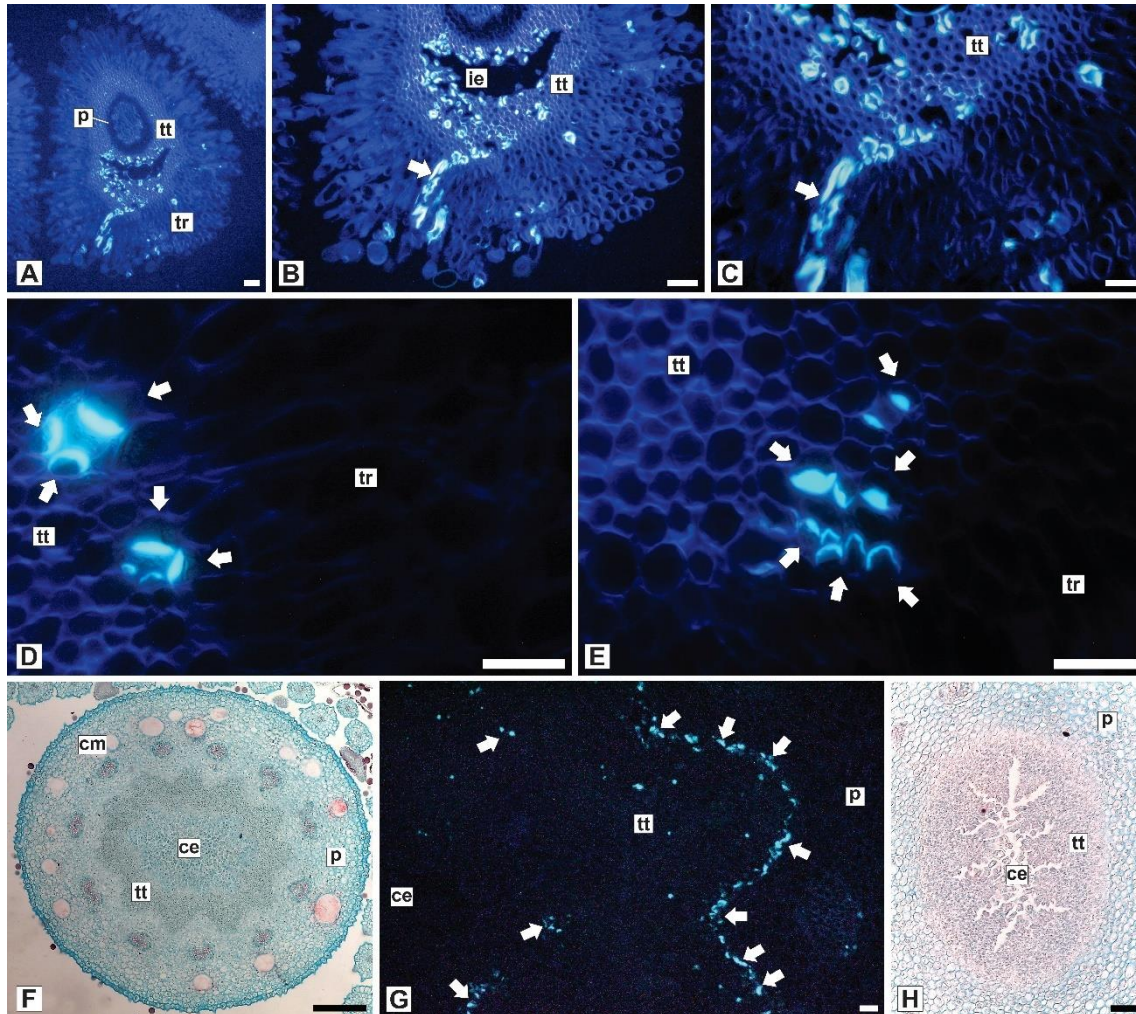


Figura 32. Recorrido del tubo polínico en especies de *Gymnocalycium*. **A-E.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio de fluorescencia en estigma de *G. spagazzinii*. **A.** Lóbulo estigmático con granos de polen germinados y tubos polínicos. **B.** Detalle de porción de lóbulo, se observa un tubo polínico creciendo en un tricoma (flecha blanca), note los espacios intercelulares en el tejido de transmisión. **C.** Detalle de tejido de transmisión con varios tubos germinados. **D- E.** Detalle del crecimiento de los tubos polínicos a través de las paredes de células del tejido de transmisión de lóbulos estigmáticos (flechas blancas). **F-H.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de estilo en secciones transversales de *G. saglionis*. **F.** Porción distal de estilo semicerrado, note que los tricomas que tapizan la cavidad estilar dan apariencia de estilo sólido. **G.** Porción de estilo, observe la fluorescencia de la calosa de los tubos polínicos en el límite entre el tejido de transmisión y el parénquima subyacente (flechas blancas). **H.** Porción basal del estilo, note el estrechamiento del canal estilar. Abreviaturas: hv= haz vascular; tt= tejido de transmisión. Escalas: A-E, G= 0,05 mm; F= 300 μ m; H= 50 μ m.

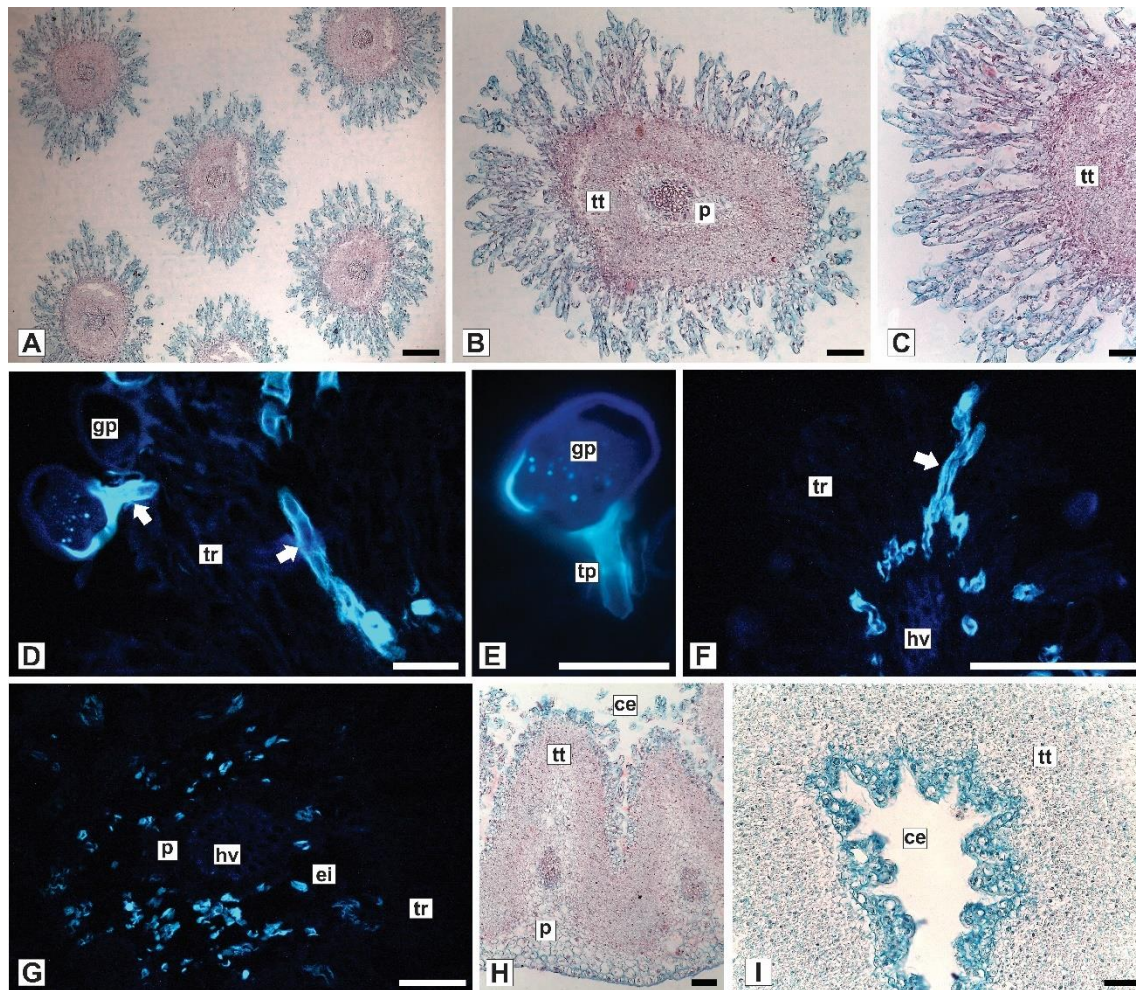


Figura 33. Recorrido del tubo polínico en *Harrisia pomanensis*. **A-C, H-I.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio óptico (MO) de estilo y estigma en secciones transversales. **A.** Estigma. **B.** Detalle de un lóbulo estigmático. **C.** Detalle de tejido de transmisión y tricomas estigmáticos. **D-G.** Fotomicrografías obtenidas con microscopio de fluorescencia en estigma. **D.** Grano de polen germinando sobre tricoma estigmático. **E.** Detalle de grano de polen germinado. **F.** Porción de lóbulo estigmático con polen germinado (flecha blanca). **G.** Detalle de un lóbulo estigmático. **H.** Porción distal de estilo. **I.** Porción basal de estilo. Abreviaturas: ce= cavidad estilar; ei= espacio intercelular; gp= grano de polen; hv= haz vascular; p= parénquima; tp= tubo polínico; tr= tricoma estigmático; tt= tejido de transmisión. Escalas: A= 200µm; B, H= 100µm; C, I=50 µm; D-E, G= 0,05mm; F= 0,1mm.

DISCUSIÓN

En todas las especies analizadas, el tejido del tallo que embebe al ovario (pericarpelo) muestra rasgos similares. Además, las características anatómicas de epidermis, parénquima cortical y tejido vascular se corresponden con las observadas en tallos de miembros de la subfamilia Opuntioideae (Terrazas & Mauseth, 2002; Mauseth, 2006; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009).

Los ovarios ínferos caracterizan a grupos altamente especializados como orquídeas, girasoles y lirios (Gibson & Nobel, 1986). Sin embargo, aunque la mayoría de los botánicos interpreta a los ovarios de los cactus como ínferos, esta condición ha derivado de manera muy diferente a la del ovario ínfero de otras angiospermas (Boke, 1964).

La tendencia hacia gineceos sincárpicos es ampliamente aceptada en angiospermas, y las reversiones se consideran improbables (Soltis *et al.*, 2003). Esta condición ofrece una ventaja selectiva sobre la apocarpia debido a la mayor eficiencia de polinización y la selección centralizada de gametofitos masculinos (Endress, 1994; Soltis *et al.*, 2003). En los gineceos sincárpicos, el tejido estilar constituye el cómpito interno que permite la competencia y selección de los granos de polen (Endress, 1994). En las especies analizadas, al igual que en el resto de la familia los carpelos se encuentran connados congénitamente a lo largo de la mayor parte de su longitud, y libres en la porción distal, que forma los lóbulos del estigma (Boke, 1964).

La placentación parietal es considerada característica de la familia y ha sido registrada en miembros de todas las subfamilias (Boke, 1963, 1964, 1966, 1968, 1980; Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010), sin embargo, esta condición no es estrictamente homóloga a la placentación parietal de otras familias de angiospermas (Boke, 1964).

El número de óvulos en la familia es ciertamente variable, aunque se observa una tendencia al aumento en el número de los mismos. Por ejemplo, en *Pereskia* en general es menor a 100 (Boke, 1963, 1964), mientras que en especies de *Hylocereus* es muy elevado con alrededor de 2000 a 7200 óvulos según la especie (Nerd & Mizrahi, 1997; Tel-Zur *et al.*, 2005; Cisneros *et al.*, 2011).

El tipo de óvulo circinótrofo registrado en las especies analizadas es típico de Cactaceae (Johri *et al.*, 1992; Stritmatter *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2010). Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 3, se han registrado en algunas especies óvulos de tipo anfítropos (Cisneros *et al.*, 2011), y campilótrofos (Boke, 1964; Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). De acuerdo a Johri *et al.* (1992), en Aristolochiaceae, Cactaceae y Plumbaginaceae, los óvulos anátropos se vuelven circinótrofos, debido al crecimiento desigual del eje del funículo que hace que el óvulo se curve hasta que el micropilo queda hacia arriba. Funículos elongados y curvos, fueron registrados en otras Cactaceae en las que se describen óvulos de tipo anfítropo y campilótrofo (Cisneros *et al.*, 2011; Elizondo-Elizondo *et al.*, 1994; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009).

La presencia de una pequeña cámara de aire entre los tegumentos interno y externo en la región calazal es un rasgo común en los miembros de Cactaceae (Johri *et al.*, 1992; Cisneros *et al.*, 2011). En especies de *Hylocereus*, se ha observado que esta cavidad es posteriormente ocupada por el embrión en la etapa cotiledonar temprana (Cisneros *et al.*, 2011).

En la gran mayoría de las angiospermas, la nucela se mantiene delimitada por el o los tegumentos (Bhojwani *et al.*, 2015). La presencia de picos nucelares representa una variación estructural de la nucela muy poco frecuente en angiospermas (Johri, 1984; Bhojwani *et al.*, 2015). Solo ha sido registrada en unas pocas familias de angiospermas, tales como Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Malphigiaceae Polygonaceae, Rhamnaceae y Trapaceae (Bouman, 1984; Rangan & Rangaswamy, 1999; Lizarazu & Pozner, 2014; Bhojwani *et al.*, 2015). El pico nucelar constituye una extensión de la nucela en el extremo micropilar, puede estar completamente rodeada por los tegumentos o sobresalir parcialmente hacia la placenta o el tejido transmisor en el ovario (Lizarazu & Pozner, 2014). De manera que representa el camino obligatorio para que el tubo polínico fertilice a la ovocélula. Los datos arrojados en esta investigación constituyen el primer reporte de esta estructura en la familia Cactaceae.

Tres tipos básicos de estilos se han registrado en angiospermas: abierto, cerrado y semicerrado (Johri, 1984; Gotelli *et al.*, 2017). Los estilos abiertos se distinguen por presentar uno o más canales entre el estigma y el ovario, rodeados de un epitelio secretor, y aparecen como la condición más común entre angiospermas basales y monocotiledóneas; los cerrados presentan uno o más cordones de tejido de transmisión y son comunes en Eudicotiledóneas; y los estilos semicerrados, exhiben características

intermedias, con tejido de transmisión rodeando el canal estilar (Hanf, 1935; Johri, 1984; Gotelli *et al.*, 2017). En general, este último tipo es considerado poco común, reportado en unas pocas angiospermas como por ejemplo *Persea americana* (Sedgley & Buttrose, 1978) y *Mangifera indica* L. (de Wet *et al.*, 1990).

En Cactaceae, se ha documentado la presencia de los tres tipos: abierto en especies de *Opuntia* (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009), *Pereskia* (Boke, 1963, 1966, 1968) y miembros de la tribu Pachycereeae (Fuentes-Pérez, 2004); semicerrado en *Cereus tortuosus* (Hanf, 1935), *Consolea spinosissima* (Strittmatter *et al.*, 2002), y especies de la tribu Pachycereeae (Fuentes-Pérez, 2004); y cerrado en especies de Pachycereeae (Fuentes-Pérez, 2004), *Blossfeldia* y *Mammillaria* (Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). El estilo de tipo semicerrado registrado en los taxones de Trichocereae aquí analizados, no aparece como el más extendido en la familia (Boke, 1963, 1964, 1966, 1968; Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009).

En general, las características anatómicas estructurales observadas en los estilos aquí analizados, se corresponden con lo registrado en otras Cactaceae (Strittmatter *et al.*, 2002; Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2010).

El tipo de estigma más extendido en angiospermas es húmedo y con epidermis papilosa (Esau, 1987; Endress, 1994). Este rasgo puede aparecer constante o ser variable dentro de un grupo taxonómico grande (Endress, 1994). De acuerdo a la clasificación de Heslop-Harrison & Shivanna (1977), el estigma de Cactaceae se clasifica como tipo húmedo y no papiloso. Sin embargo, todas las especies aquí analizadas presentan estilos tricromáticos (papilosos), además, no se han encontrados pruebas suficientes, como una secreción copiosa, que permita clasificar a los estigmas de las especies de Trichocereae analizadas como húmedos. Así, el tipo de estigma aparece como un carácter variable para la familia, dado que se han registrado estigmas húmedos y no papilosos en *Opuntia* y *Schlumbergera* (Heslop-Harrison & Shivanna, 1977). No obstante, es importante mencionar que los estigmas de tipo húmedo comúnmente ocurren en flores protandras, y en estos casos la superficie de los estigmas en anthesis puede parecer “seca”, de manera que, los estigmas de flores abiertas pueden ser erróneamente clasificados como estigmas de tipo “seco” (Heslop-Harrison & Shivana, 1977). Será necesario realizar estudios de ultraestructura que permitan confirmar si se trata de estigmas de tipo húmedo como reportaron los mismos autores para la familia.

Los rasgos estructurales observados en los estigmas de las especies analizadas demostraron ser muy conservados, aun dentro de especies que difieren en su especialización fenotípica a diferentes tipos de polinizadores. De acuerdo a Heslop-Harrison & Shivana (1977), las particularidades de las superficies de captura de polen varían considerablemente entre las familias y, a veces incluso dentro de éstas; a menudo se relacionan con el funcionamiento del sistema de reproducción.

La importancia del tipo de estigma se muestra en la correlación que existe entre la naturaleza de la superficie receptiva y el sistema de autoincompatibilidad. Los sistemas de autoincompatibilidad esporofítica se asocian con estigmas papilosos secos, mientras que la mayoría de los sistemas gametofíticos se relacionan con estigmas húmedos (Harrison & Shivana, 1977). Se ha reportado que la mayoría de las especies aquí analizadas presentan sistemas de autoincompatibilidad (Gorostiague, 2016; Gorostiague & Ortega Baes, 2015; Ortega Baes *et al.* 2011), sin embargo, no se ha profundizado en la comprensión del tipo de autoincompatibilidad (esporofítica o gametofítica).

El significado adaptativo de la presencia de papilas o tricomas en la superficie de los estigmas ha sido relacionado con el aumento del área de captura, también reduce la oportunidad de interacción al garantizar que los materiales de la superficie de polen no puedan distribuirse con demasiada libertad en la superficie del estigma a partir de granos individuales o grupos pequeños (Heslop-Harrison & Shivana, 1977).

El recorrido que realiza el tubo polínico a través de estigma y estilo, en muchos casos, depende de la estructura del tejido de transmisión (Gotelli *et al.*, 2017). De acuerdo a los subtipos de recorridos del tubo polínico, definidos por Gotelli *et al.* (2017), la categoría que se ajustaría a lo observado en las especies analizadas a través de microscopía de fluorescencia es la del tubo polínico creciendo a través de la matriz intercelular del tejido transmisor (Tipo IIIA). En un futuro, sería necesario realizar estudios ultraestructurales que permitan confirmar esta interpretación.

CONCLUSIONES

*La presencia de picos nucelares en *E. aurea* y *E. haematantha* representa el primer registro de esta estructura para Cactaceae.

*Las características estructurales del estigma de las especies analizadas que difieren en su especialización fenotípica a la polinización a diferentes tipos de animales se muestran muy conservadas, sin diferencias que se puedan asociar a los diferentes tipos de agentes polinizadores de cada especie.

*El tipo de estilo semicerrado y el patrón de recorrido del tubo polínico aparecen como caracteres conservados en las especies de Trichocereae analizadas.

CAPÍTULO 7

MAPEO DE CARACTERES FLORALES EN LA FILOGENIA MOLECULAR DE *ECHINOOPSIS* S.L Y GÉNEROS AFINES



INTRODUCCIÓN

En los últimos años, estudios basados en evidencia molecular han apoyado clasificaciones en Cactaceae a nivel familia, subfamilia, tribu y género (Wallace, 1995; Wallace & Cota, 1996; Butterworth *et al.*, 2002; Griffith, 2002; Nyffeler, 2002, 2007; Wallace & Dickie, 2002; Edwards *et al.*, 2005; Ritz *et al.*, 2007; Griffith & Porter, 2009; Korotkova *et al.*, 2010; Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Bárcenas *et al.*, 2011; Calvente *et al.*, 2011; Demaio *et al.*, 2011; Schlumberger & Renner, 2011). Sin embargo, debido al elevado nivel de convergencia de los caracteres morfológicos encontrados, la controversia sobre la taxonomía de la familia entre diferentes autores persiste a niveles genéricos e infragenéricos (Hunt, 2006; Bárcenas *et al.*, 2011; Schlumberger & Renner, 2012; Franck *et al.*, 2013).

La optimización de caracteres, o mapeo de caracteres, sobre una filogenia molecular conocida permite representar la historia evolutiva de un carácter determinado y reconocer caracteres morfológicos y anatómicos útiles para identificar o apoyar un grupo monofilético particular, además de contrastar hipótesis sobre procesos evolutivos, como el origen de caracteres adaptativos, patrones de diversificación y convergencias evolutivas (Morrone, 2000, 2013).

En Cactaceae, son pocos los estudios enfocados en la optimización de caracteres morfológicos (Ritz *et al.*, 2007; Demaio *et al.*, 2011; Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Schlumberger & Renner, 2012; Moreno *et al.*, 2014), y resultan aún más escasos los análisis que contemplen la optimización de caracteres anatómicos (Fuentes-Pérez, 2008; Martínez Quezada, 2018). En general, los estudios que han puesto a prueba los caracteres estructurales propuestos como sinapomorfías en la familia se enfocan en caracteres vegetativos, particularmente en la anatomía de los tallos (Terrazas & Arias, 2002; Martínez Quezada, 2018).

La alta convergencia morfológica sumada a la escasez de sinapomorfías fenotípicas dificultan la comprensión de las relaciones y tendencias evolutivas entre linajes (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). A pesar de que se ha reconocido que los caracteres morfológicos de las flores representan rasgos importantes en la identificación taxonómica (Boke, 1980), la evolución de la diversidad floral en Cactaceae resulta altamente intrigante y es aún enigmática. Por este motivo, resulta interesante explorar caracteres

anatómicos florales en busca de posibles sinapomorfías que apoyen a los diferentes clados de este linaje tan diverso.

El análisis de mapeo de caracteres aquí realizado contempla a 18 especies, que representan a seis de los siete géneros *sensu* Hunt (2006) de la tribu Trichocereae que se distribuyen en el noroeste de Argentina: *Cleistocactus*, *Denmoza*, *Echinopsis*, *Gymnocalycium*, *Harrisia* y *Rebutia*. De acuerdo a Schlumberger & Renner (2012), *Echinopsis s.l.* incluye a los representantes de *Cleistocactus*, *Denmoza* y *Harrisia* aquí analizados. En este contexto se destaca que *Echinopsis thionantha* se cita bajo *Acanthocalycium thionanthum* en Schlumberger & Renner (2012).

Tradicionalmente se ha diferenciado congruentemente a las tribus Cereeae y Trichocereae con base en un único rasgo morfológico de la superficie del pericarpelo, el cual generalmente en las especies de Cereeae es desnudo, o con unas pocas escamas, mientras que en los representantes de Trichocereae, usualmente el pericarpelo es piloso o escamoso (Barthlott & Hunt, 1993; Anderson, 2005). Sin embargo, la presencia/ausencia de pelos o cerdas en el pericarpelo se revela como una homoplasia con respecto al árbol completo del clado monofilético BCT, conformado por miembros de las tribus Browningiaeeae, Cereeae y Trichocereae, *sensu* Nyffeler (2002) y Ritz *et al.* (2007), y entonces carece de sentido para la delimitación de tribus. No obstante, los mismos autores sostienen que esta inconstancia desaparece a menor escala en la filogenia molecular, cuando se consideran subclados específicos, y así la superficie pilosa o desnuda del pericarpelo, en combinación con otros caracteres morfológicos, como la presencia/ausencia de cefalio (porción del tallo donde las aréolas de la zona florífera se modifican y no continúan con su función vegetativa), demuestran ser caracteres muy útiles para circunscribir grupos monofiléticos más pequeños. Otro carácter morfológico que resulta informativo si se lo considera a menores niveles de jerarquía es la forma de crecimiento (ej. cactus columnares vs. globosos) (Hernández-Hernández *et al.*, 2011). De acuerdo a Ritz *et al.* (2007), el subclado conformado por Trichocereae comprende cactus andinos, columnares y globosos, con pericarpelos que tienen areolas pilosas o rizadas.

Por otra parte, el género *Gymnocalycium* también ha sido clasificado con base en caracteres morfológicos, tradicionalmente definido por presentar el pericarpelo escamoso y sin pelos (Anderson, 2001). Till (2001) ha reconocido dos subgéneros basándose en el tipo de fruto y la morfología de las semillas, pero la filogenia molecular revela que estos subgéneros no son monofiléticos (Ritz *et al.*, 2007; Demaio *et al.*, 2011).

De acuerdo a Ritz *et al.* (2007), la clasificación morfológica actual dentro de Cactaceae no es soportada por los análisis de filogenia molecular. Muchos rasgos morfológicos que son utilizados en clasificaciones, como la forma de crecimiento, los síndromes de polinización y la presencia de cefalio, son altamente homoplásicos y por ende no adecuados para la definición de grandes grupos monofiléticos. En este análisis se consideran estos caracteres altamente homoplásicos en relación a la definición de grandes grupos, con el fin de dilucidar si son informativos en los subclados más pequeños dentro de Trichocereae.

RESULTADOS

Los datos morfo-anatómicos florales obtenidos en esta investigación fueron mapeados sobre una topología de árbol simplificada de Schlumberger & Renner (2012) (Fig. 35).

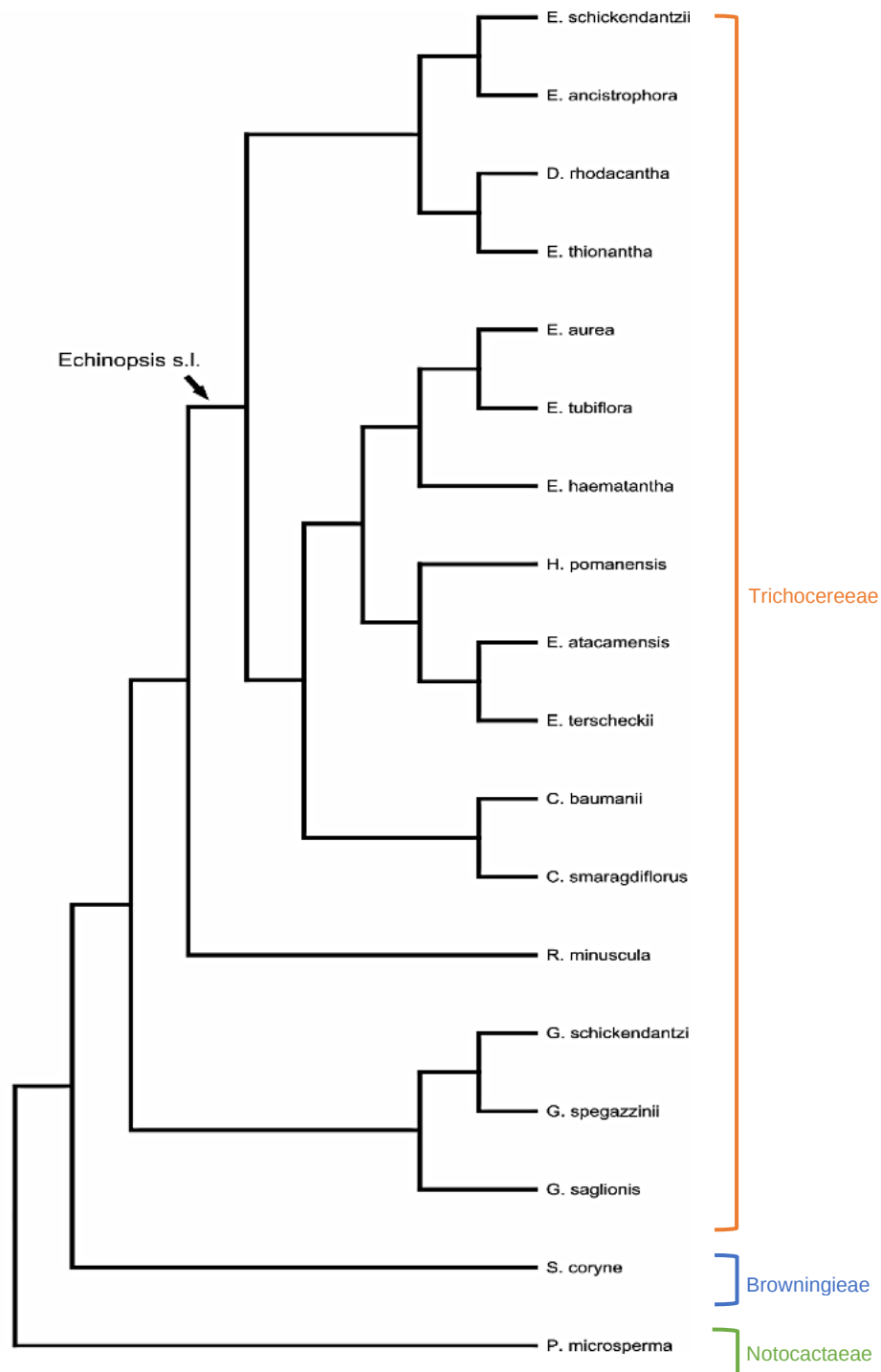


Figura 35. Topología de árbol modificada de Schlumberger & Renner (2012), en base a la cual se mapearon los caracteres florales seleccionados.

A través del análisis de los diferentes verticilos florales, de las 18 especies aquí estudiadas, se codificaron 45 caracteres, de los cuales 17 son morfológicos y 28 anatómicos. Del total de caracteres contemplados, se reconocieron 24 como binarios y 21 como multiestados (Tabla 4).

Tabla 4. Caracteres y estados de caracteres analizados en las especies de Trichocereae.

Tipo de carácter	Carácter	Estados de carácter
Morfológico	Forma de la flor	(0) campanulada; (1) tubiforme; (2) infundibuliforme larga; (3) infundibuliforme corta
	Simetría	(0) actinomorfa; (1) zigomorfa
	Color del tubo	(0) rojo; (1) magenta; (2) verde; (3) marrón; (4) verde-violáceo; (5) amarillo
	Color de tépalos petaloideos	(0) rojo; (1) magenta; (2) crema; (3) rosa; (4) verde; (5) blanco; (6) amarillo; (7) rojo-naranja
	Forma de tépalos	(0) lanceolada; (1) oblonga; (2) oblanceolada
	Color de escamas	(0) verde; (1) rojo; (2) magenta; (3) marrón; (4) verde-violáceo; (5) amarillo
	Forma de escamas	(0) lanceolada; (1) oblonga
	Escamas en pericarpelo y tubo floral	(0) desnudas; (1) con tricomas; (2) con tricomas y cerdas (pelos rígidos)
	Color de anteras	(0) rojo; (1) fucsia; (2) amarillo; (3) blanco; (4) marrón
	Color de filamentos	(0) blanco; (1) amarillo; (2) fucsia; (3) verde
	Color de estigmas	(0) blanco; (1) amarillo; (2) verde; (3) magenta
	Color de estilo	(0) blanco; (1) amarillo; (2) verde; (3) rosa; (4) crema
	Estaminodios	(0) ausencia; (1) presencia
	Hilos conectando granos de polen	(0) ausencia; (1) presencia
	Forma del lóculo del ovario en CL	(0) ovoideo, (1) reniforme; (2) elipsoide
	Contorno del estilo en CT	(0) circular; (1) estrellado
	Desarrollo del nectario	(0) cámara profunda y desarrollada; (1) cámara pequeña; (2) apenas diferenciado
Anatómico	Células de epidermis anteral	(0) globosas; (1) papilosas
	Taninos en epidermis anteral	(0) ausencia; (1) presencia
	Contorno del filamento en corte transversal	(0) circular; (1) irregular; (2) subcircular;

Células de epidermis del filamento	(0) globosas; (1) rectangulares; (2) irregulares; (3) tricomas unicelulares breves
Células mucilaginosas en parénquima del filamento	(0) ausencia; (1) presencia
Amiloplastos en parénquima del filamento	(0) ausencia; (1) presencia
Tricomas estigmáticos	(0) multicelulares uniseriados; (1) multicelulares multiseriados; (2) unicelulares
Tricomas estigmáticos con taninos	(0) ausencia; (1) presencia
Células de epidermis estilar	(0) papilosas; (1) no papilosas
Hipodermis estilar	(0) ausencia; (1) presencia
Cavidades mucilaginosas en parénquima estilar	(0) ausencia; (1) presencia
Epidermis del canal estilar	(0) sin tricomas; (1) tricomas sin tanino; (2) tricomas con tanino
Estratos del tejido nectarífero	(0) < 3 estratos de células; (1) > 3 estratos de células
Epidermis del nectario	(0) células no papilosas; (1) tricomas unicelulares; (2) células papilosas; (3) tricomas multicelulares uniseriados
Taninos en células epidérmicas del nectario	(0) ausencia; (1) presencia
Drusas en parénquima nectarífero	(0) ausencia; (1) presencia
Epidermis del pericarpelo	(0) células cuadrangulares; (1) rectangulares; (2) subrectangulares; (3) globosas; (4) papilosas
Hipodermis en pericarpelo	(0) ausencia; (1) presencia
Drusas en pericarpelo	(0) ausencia; (1) presencia
Forma del lóculo del ovario	(0) Ovoideo; (1) Reniforme; (2) Elipsoide
Taninos en células epidérmicas del ovario	(0) ausencia; (1) presencia
Tricomas en el funículo	(0) ausencia; (1) presencia
Taninos en células epidérmicas del funículo	(0) ausencia; (1) presencia
Cámara de aire entre los tegumentos del óvulo	(0) ausencia; (1) presencia
Taninos en células epidérmicas del tegumento externo	(0) ausencia; (1) presencia
Pico nucelar	(0) ausencia; (1) presencia
Tipo de estilo	(0) semicerrado; (1) cerrado en la base

Los caracteres enumerados en la Tabla 4 aportan información filogenética que se visualiza en las Figs. 36 a 46.

Algunos de los rasgos morfo-anatómicos florales estudiados fueron altamente variables, con numerosos estados de carácter, y no permiten sugerir tendencias evolutivas dentro del grupo, mientras que otros caracteres, al ser mapeados sobre la filogenia, se evidencian como posibles apomorfías. El análisis reveló caracteres novedosos, y se identificaron algunos de ellos como sinapomorfías de clados soportados por la filogenia molecular publicada para el género.

Los resultados más interesantes se detallan a continuación:

El análisis reveló que la mayoría de los 45 caracteres analizados son homoplásicos, ya que sus estados de carácter aparecen de manera independiente en más de dos oportunidades en taxones no emparentados. Sin embargo, muchos de ellos son útiles para apoyar subclados dentro de esta filogenia.

Se destaca que la morfo-anatomía del gineceo aportó datos interesantes en este análisis. Por ejemplo, la presencia de tricomas estigmáticos multicelulares sin contenidos aparentemente tánicos pueden constituir una sinapomorfia de la tribu. Adicionalmente, la ausencia de células papilosas en el pericarpelo, y la ausencia de taninos en la epidermis del ovario y del funículo son rasgos conservados en todos los representantes de Trichocereae aquí analizados (Figs. 41C, 42A).

Por otra parte, el novedoso registro de la presencia de pico nucelar en la familia, aparece como dos eventos de evolución independiente en *E. aurea* y *E. haematantha* (Fig. 46B).

El clado *Echinopsis s.l.*, *sensu* Schlumpberger & Renner (2012), está respaldado por varios caracteres morfológicos y anatómicos tales como la forma lanceolada de tépalos y escamas, la presencia de tricomas lanosos en las axilas de las brácteas que recubren el pericarpelo y el tubo floral, el contorno circular del estilo en corte transversal, la epidermis estilar con células glabra, el tipo de estilo semicerrado y la presencia de tricomas epidérmicos sin taninos en lóbulos estigmáticos (Figs. 37B, 38A-B, 40B, 42B, 46C).

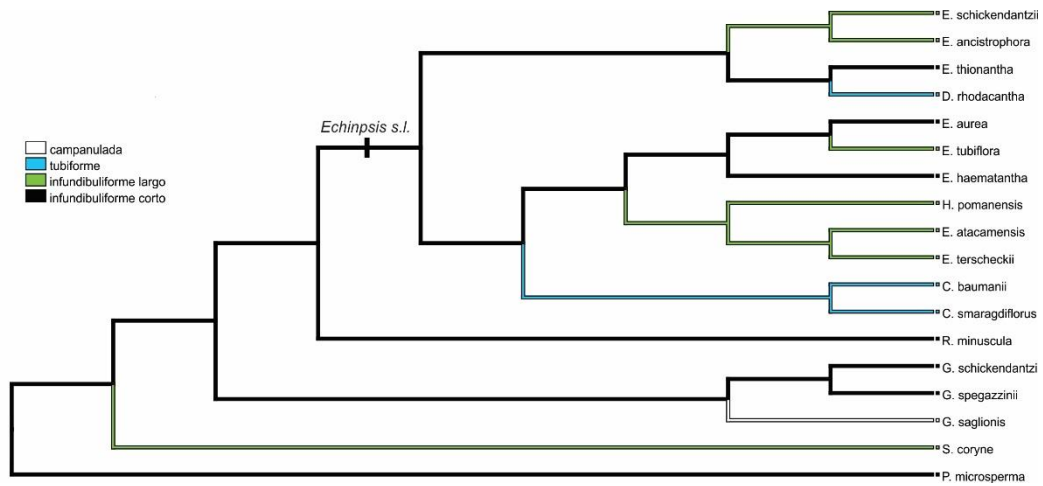
El subclado de *Echinopsis s.l.* formado por los representantes de *Cleistocactus* (clado *Cleistocactus sensu* Schlumpberger & Renner, 2012), se apoya por la presencia de epidermis simple (células no papilosas) en el nectario floral; la presencia de tricomas epidérmicos unicelulares define a las restantes especies del linaje (Fig. 43B).

Por otro parte, el subclado de *Echinopsis* s.l. conformado por *D. rhodacantha* + *E. thionantha*, se apoya por la presencia de estaminodios transformados en tricomas lanosos por encima del nectario floral (Fig. 39B).

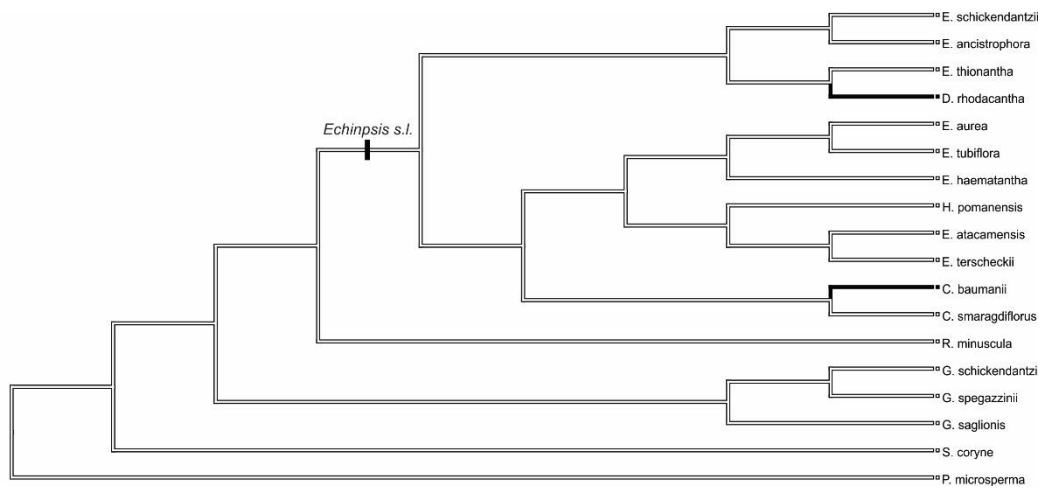
Los representantes de *Gymnocalycium*, empleados como grupo externo, presentan varios caracteres que pueden ser interpretados como sinapomorfías del género, como por ejemplo, la presencia de hilos que conectan granos de polen, la presentación secundaria del polen, la presencia de nectarios con tricomas multicelulares uniseriados, y los filamentos con breves tricomas unicelulares en la base (Figs. 39C, 43B).

Por último, entre los múltiples caracteres variables y altamente homoplásicos, se pueden mencionar el color de tépalos y la forma de las flores (Figs. 36A,37A).

A.



B.



C.

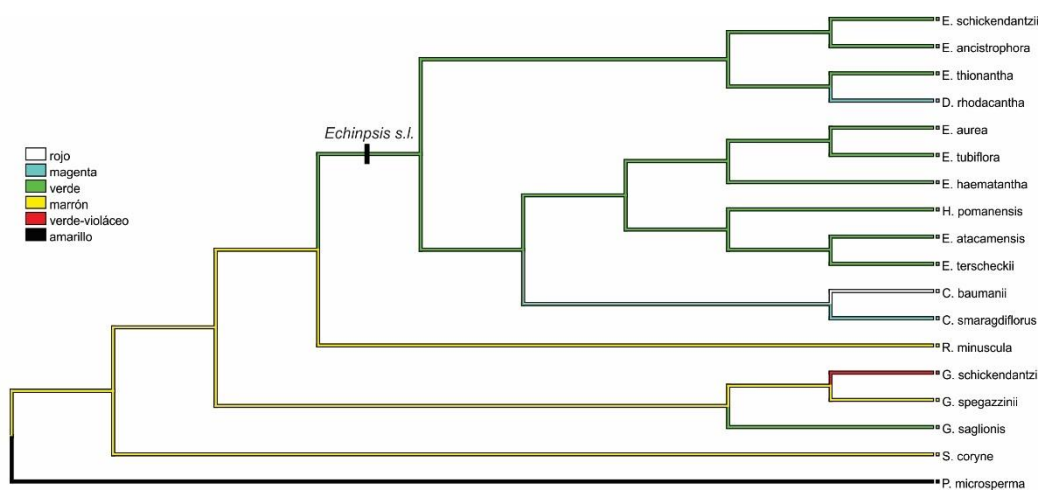
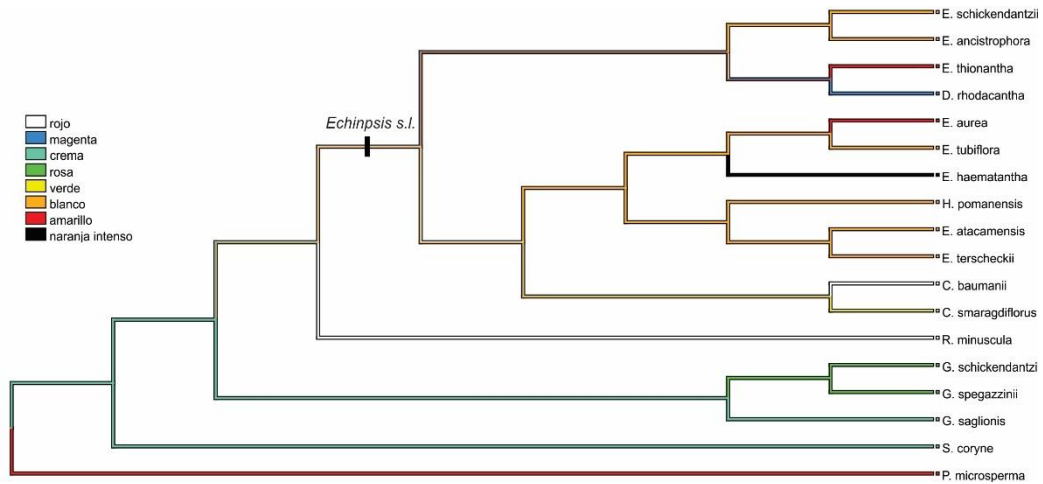
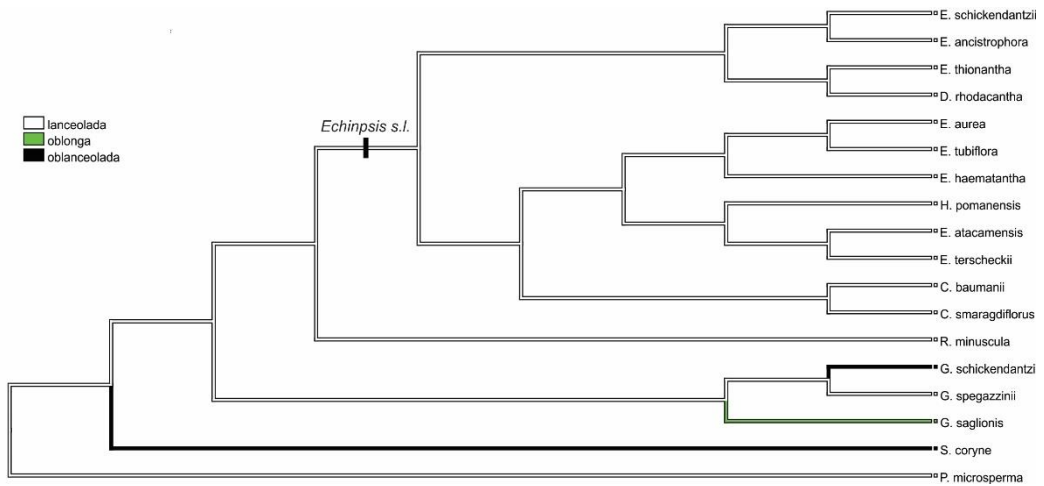


Figura 36. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Forma de la flor (7 pasos). **B.** Simetría (2 pasos). **C.** Color del tubo (7 pasos).

A.



B.



C.

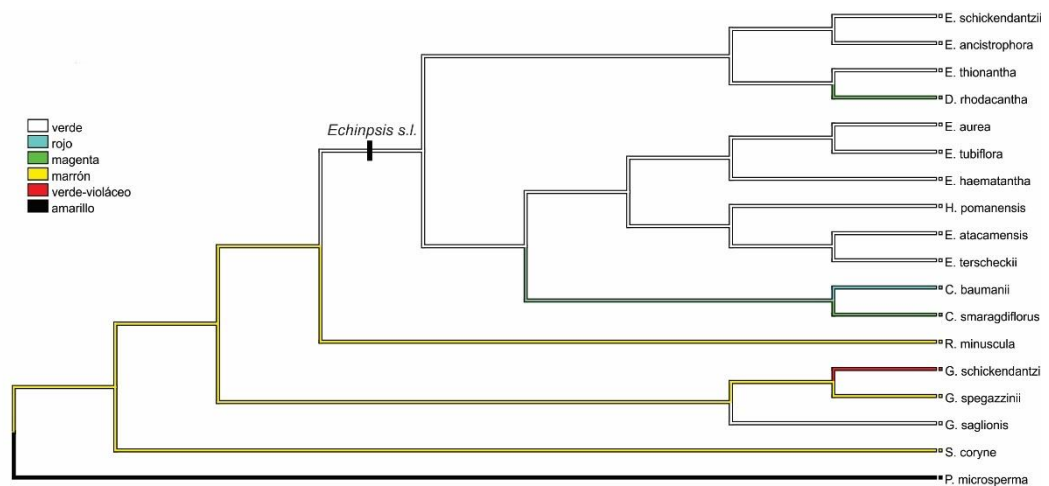
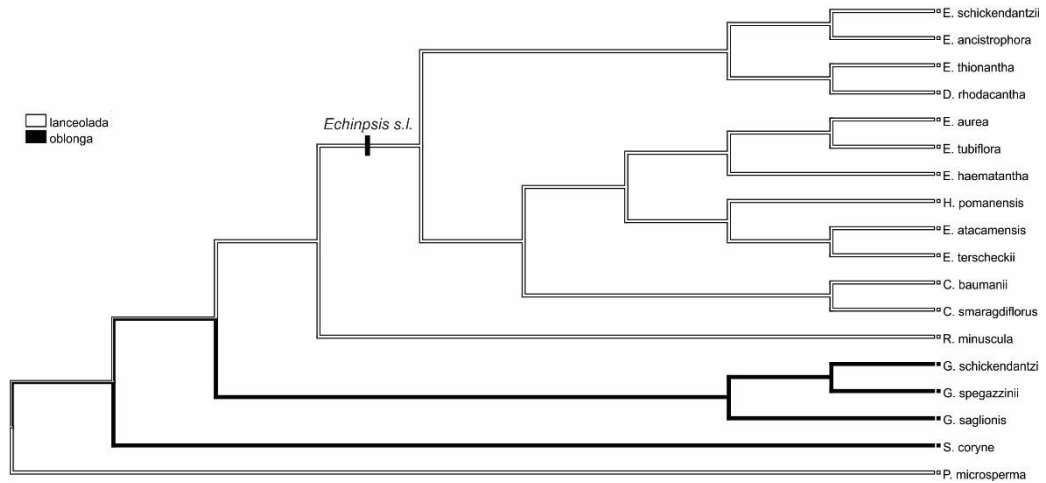
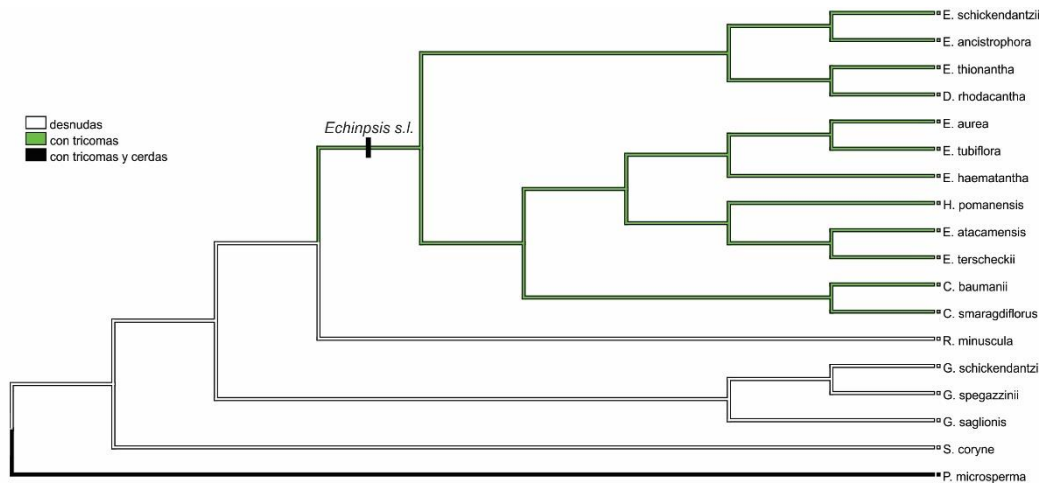


Figura 37. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. A. Color de tépalos petaloideos (10 pasos). B. Forma de tépalos (3 pasos). C. Color de escamas (7 pasos).

A.



B.



C.

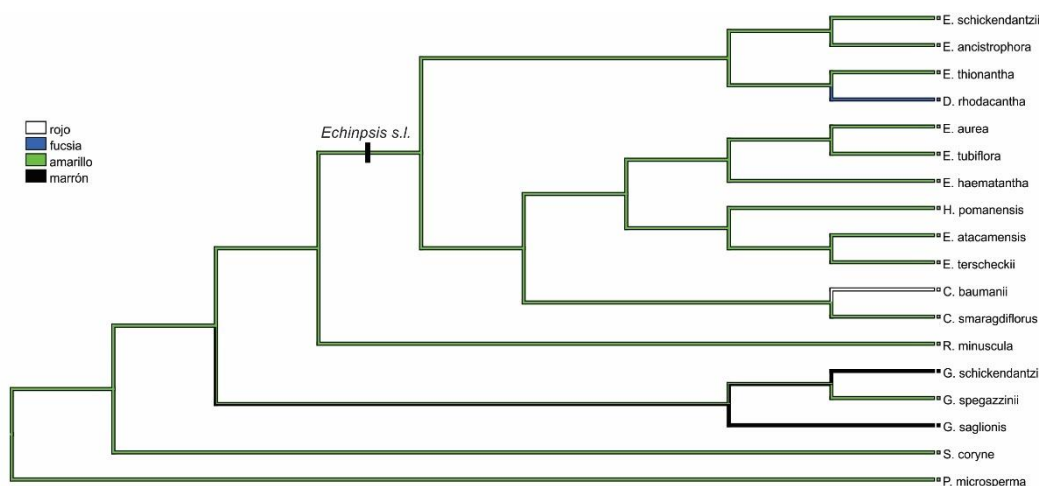
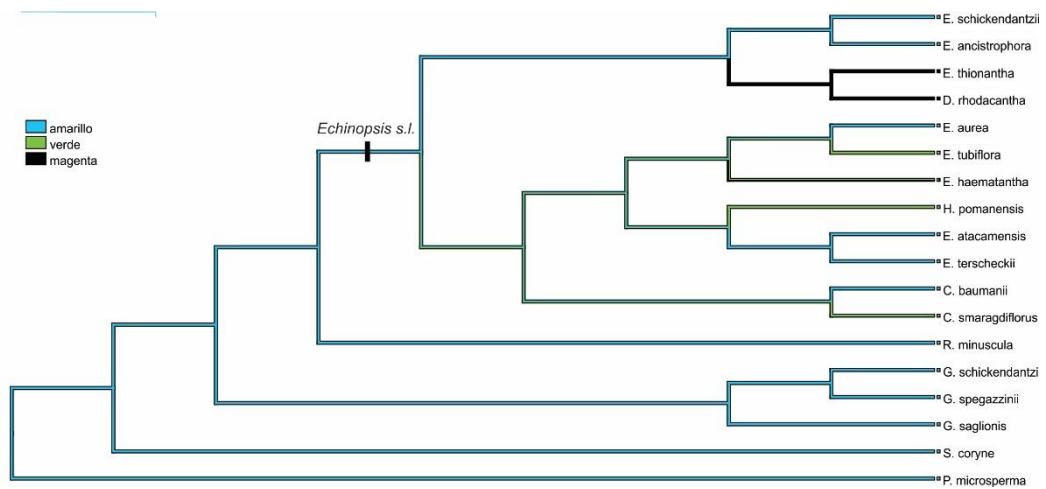
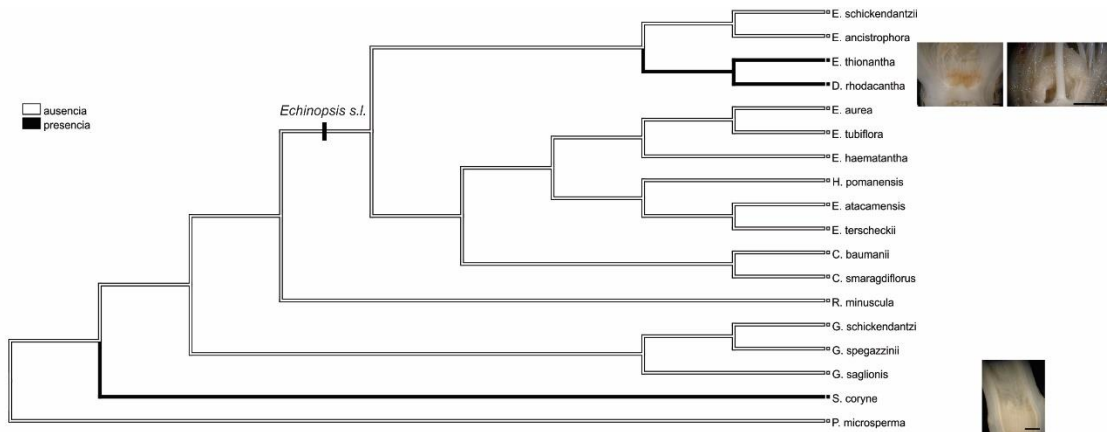


Figura 38. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Forma de escamas (2 pasos). **B.** Escamas en pericarpelo y tubo floral (2 pasos). **C.** Color de anteras (4 pasos).

A.



B.



C.

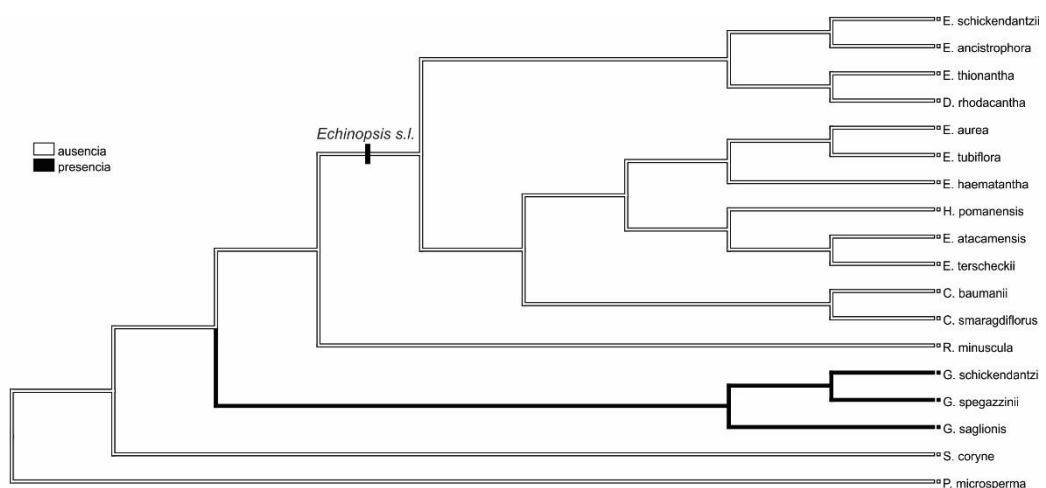
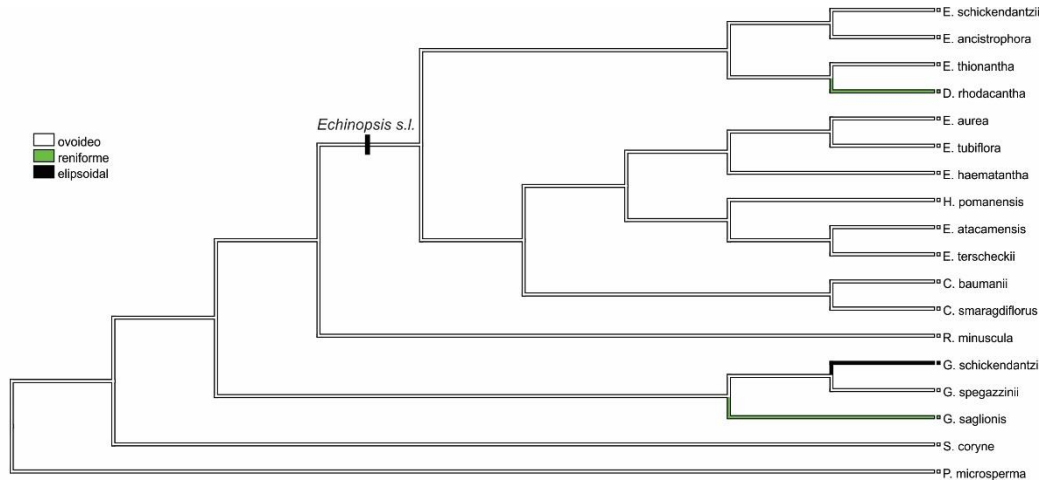
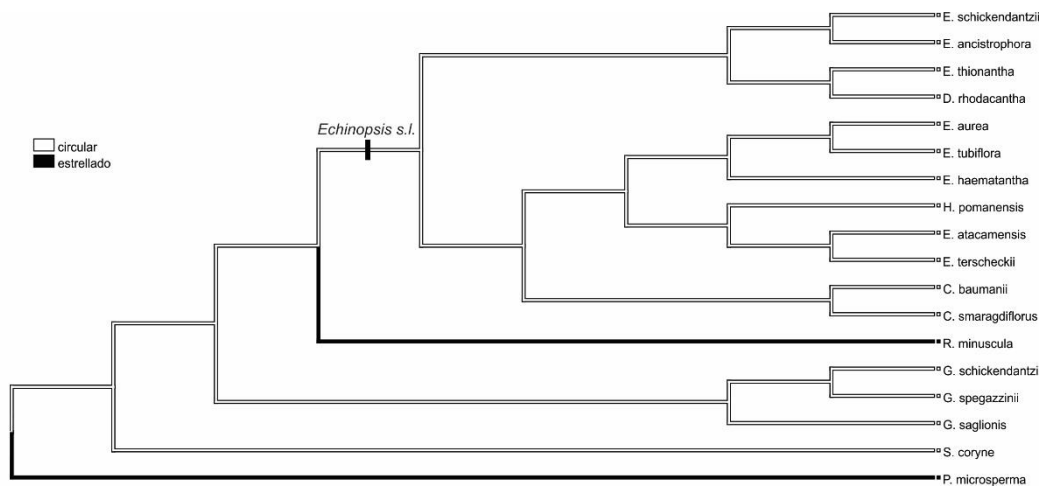


Figura 39. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Color de estigmas (6 pasos). **B.** Estaminodios (2 pasos). **C.** Hilos conectando granos de polen (1 paso).

A.



B.



C.

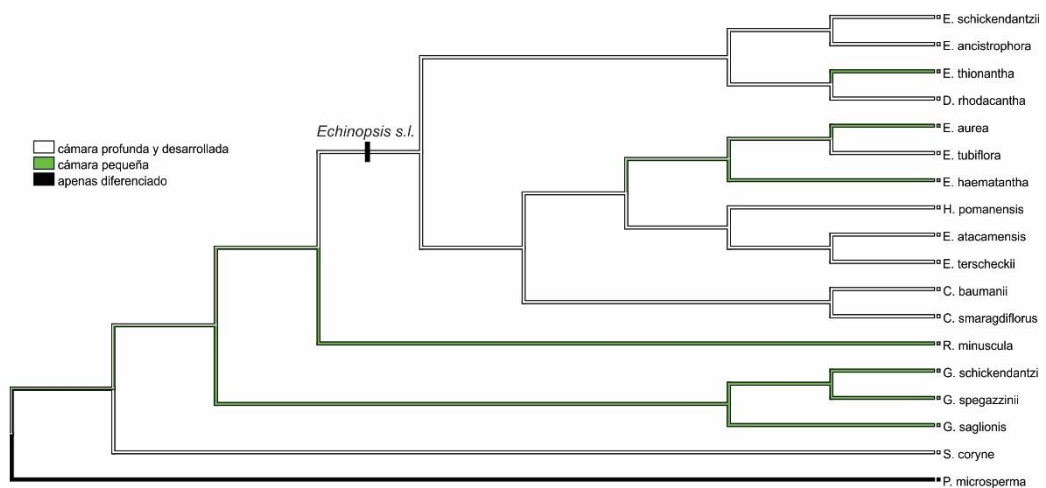
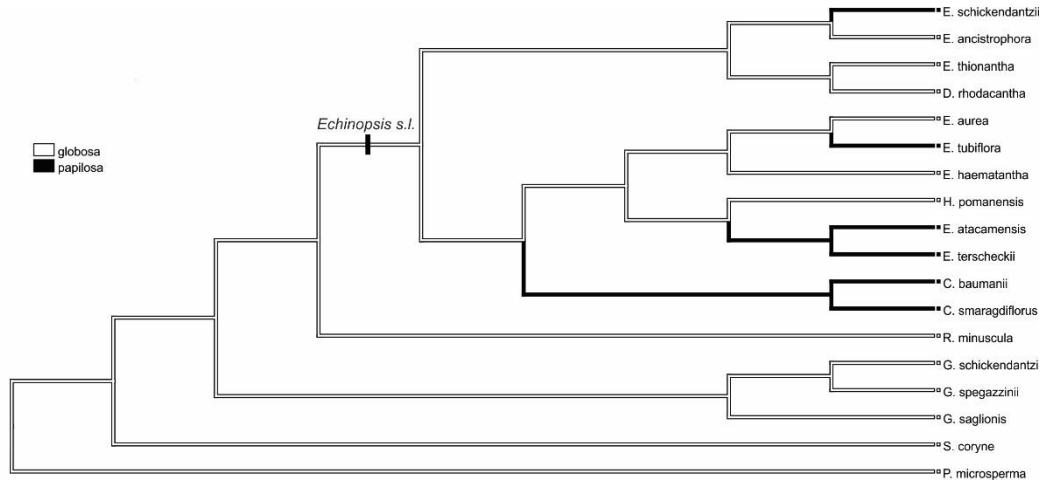
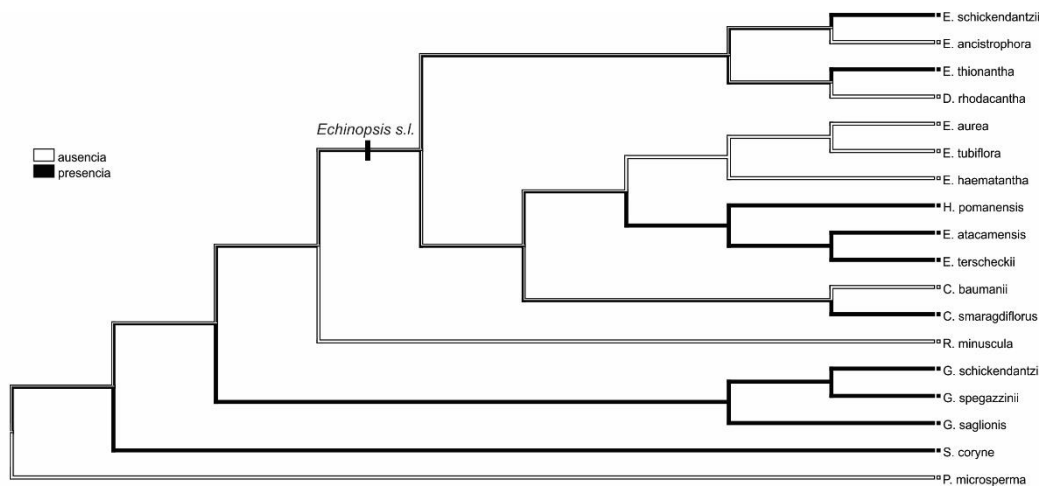


Figura 40. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Forma del lóculo del ovario en CL (3 pasos). **B.** Contorno del estilo en CT (2 pasos). **C.** Desarrollo del nectario (6 pasos).

A.



B.



C.

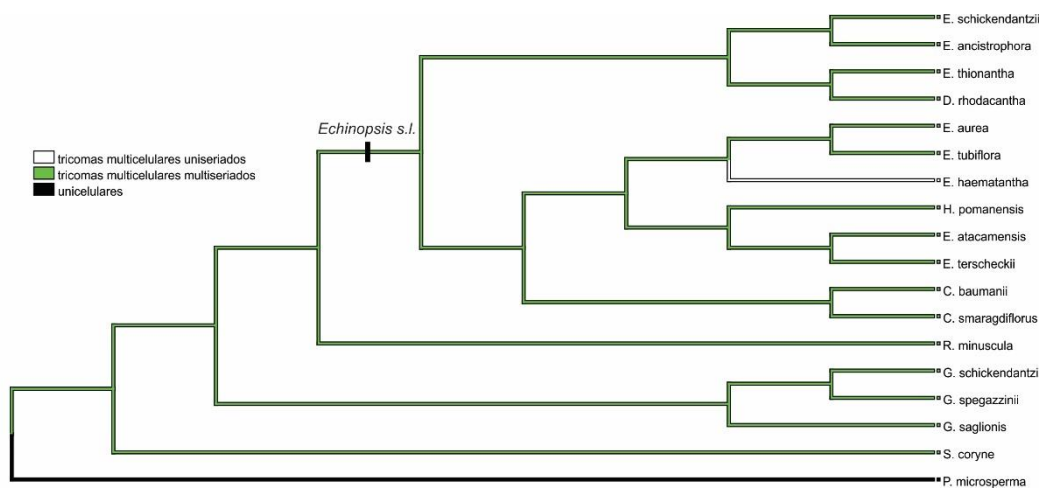
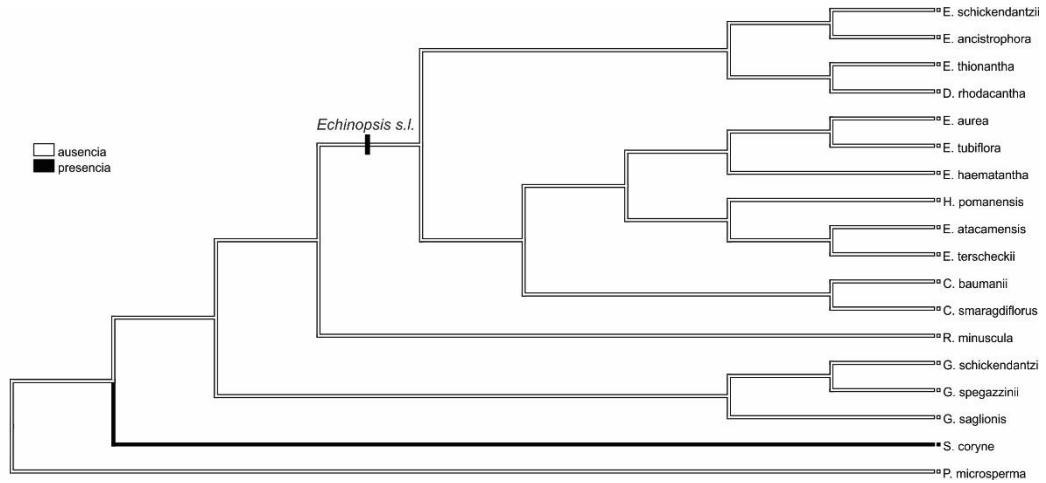
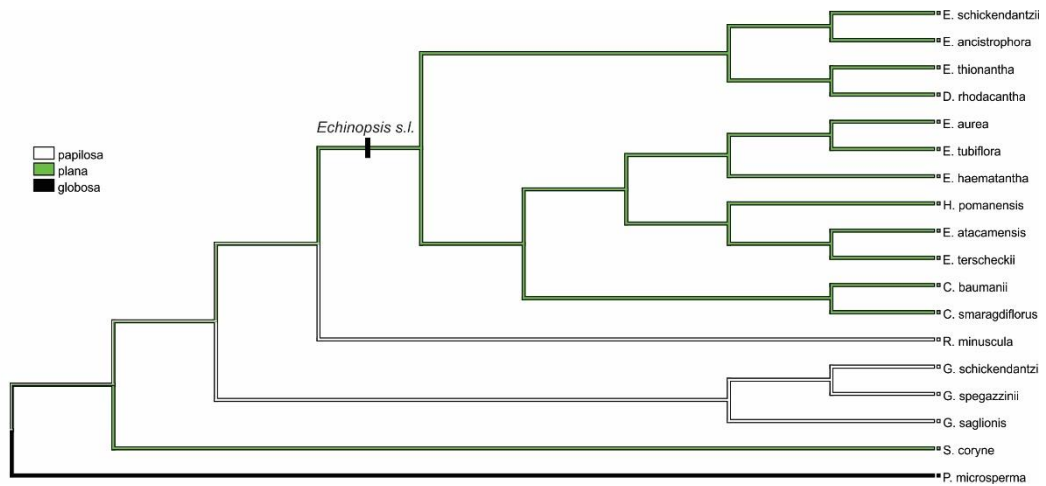


Figura 41. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Células de epidermis anteral (4 pasos). **B.** Taninos en epidermis anteral (6 pasos). **C.** Tricomas estigmáticos (2 pasos).

A.



B.



C.

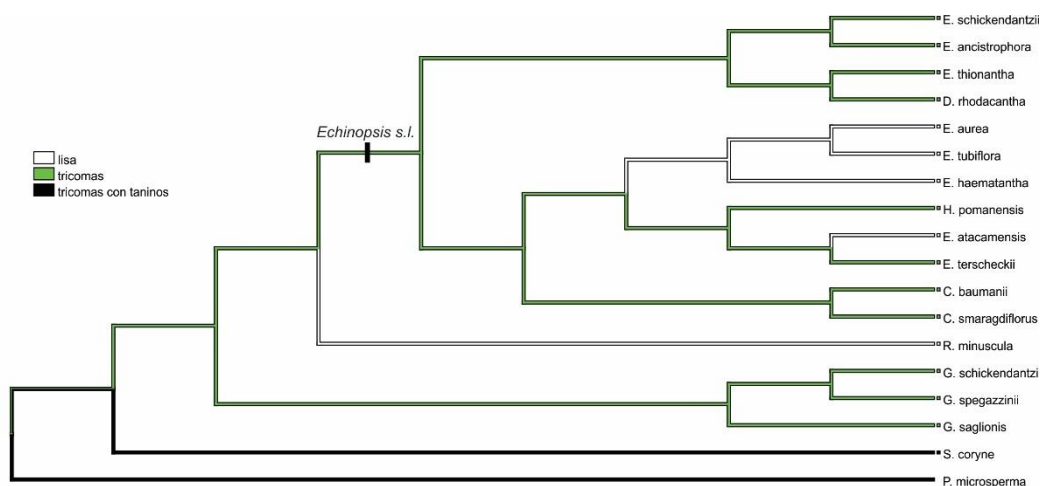
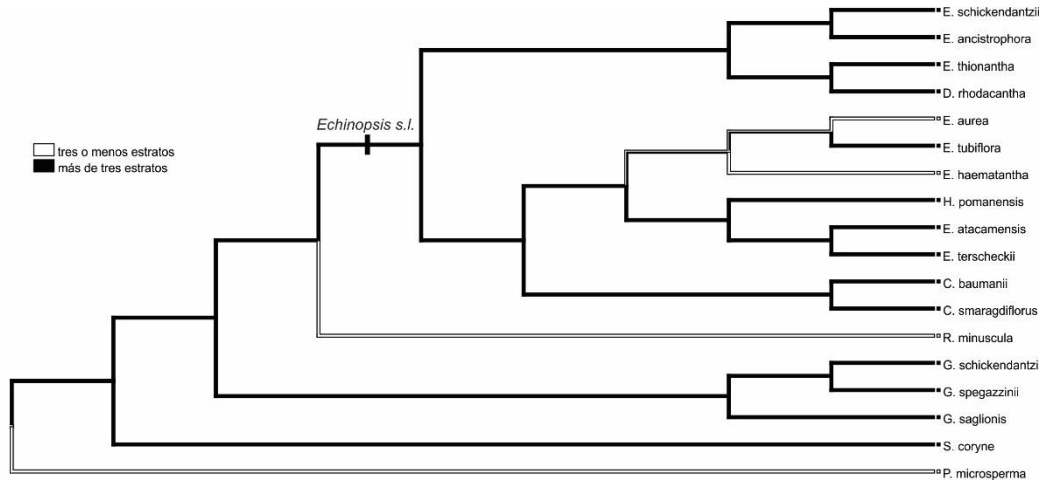
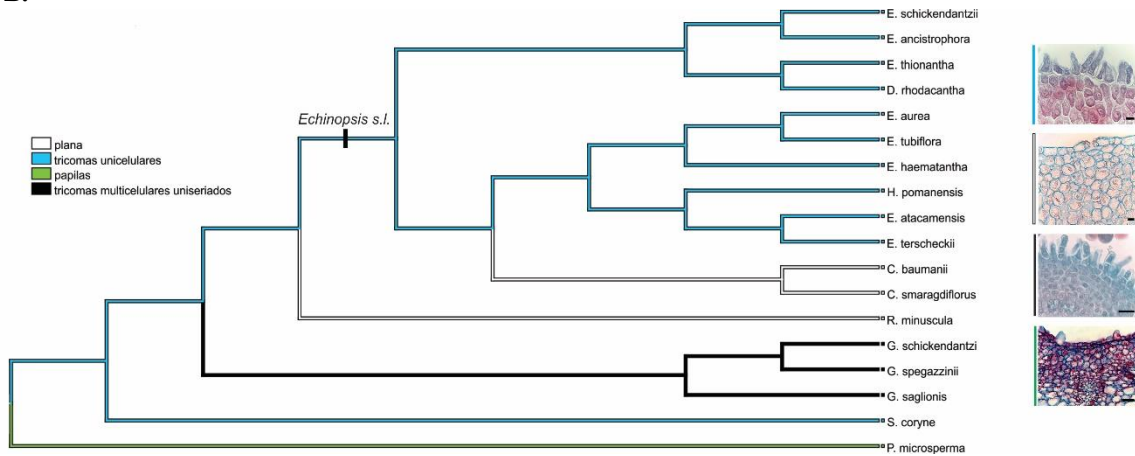


Figura 42. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Tricomas estigmáticos con taninos (1 paso). **B.** Células de epidermis estilar (3 pasos). **C.** Epidermis del canal estilar (4 pasos).

A.



B.



C.

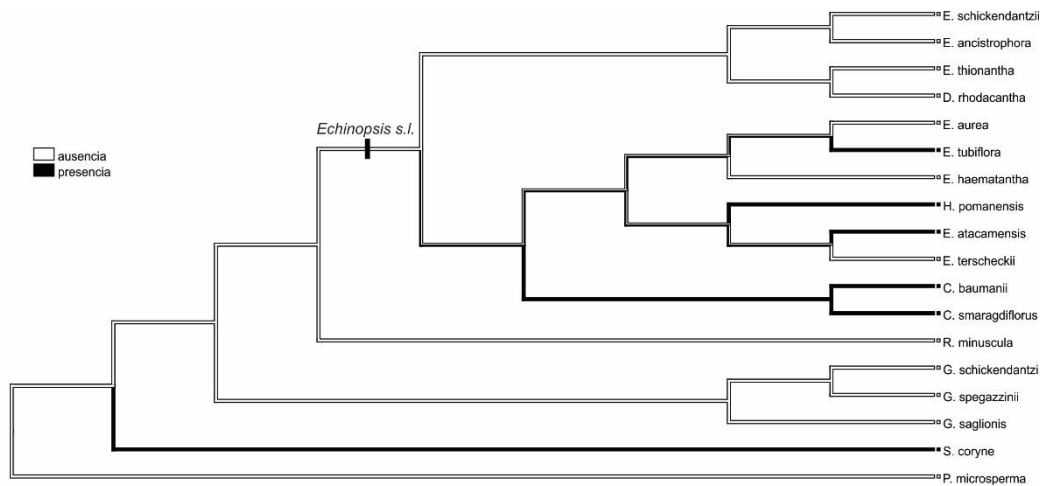
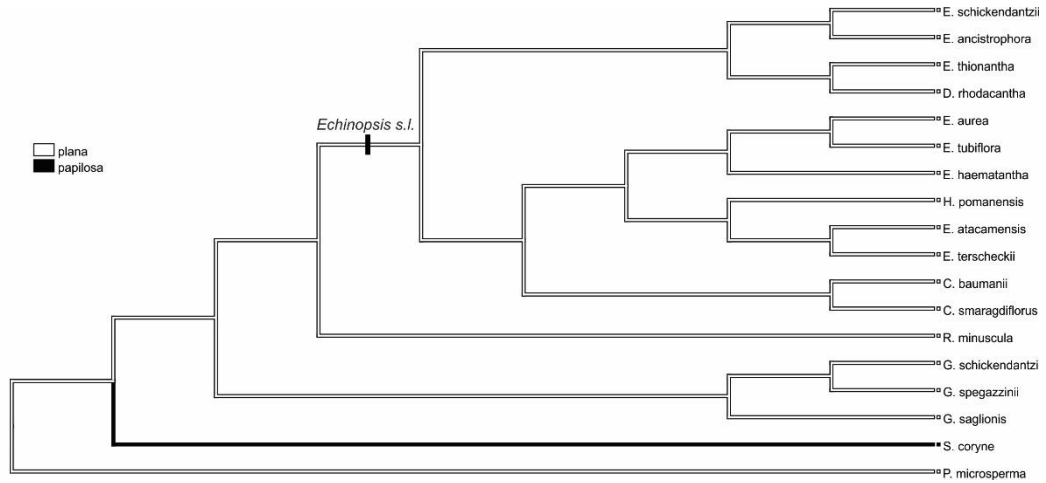
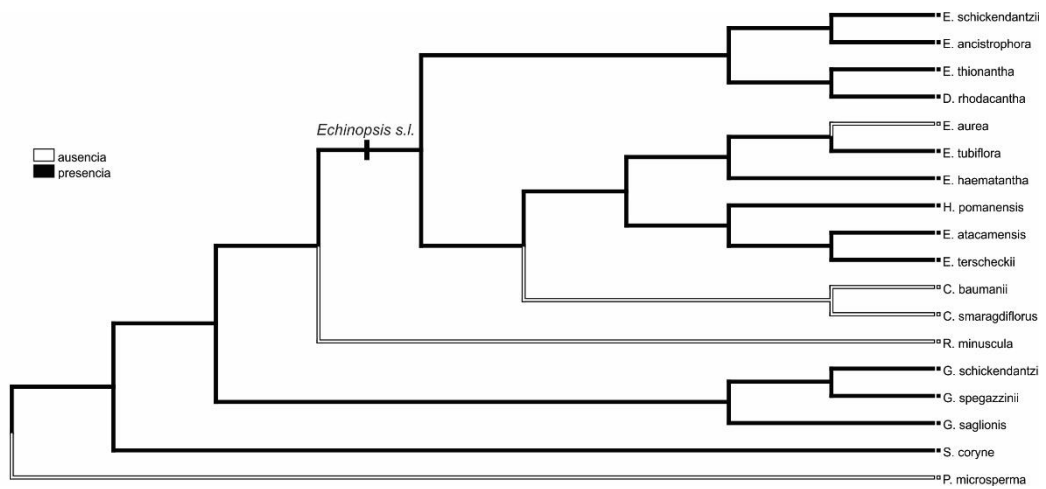


Figura 43. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Estratos del tejido nectarífero (4 pasos). **B.** Epidermis del nectario (4 pasos). **C.** Drusas en parénquima nectarífero (5 pasos).

A.



B.



C.

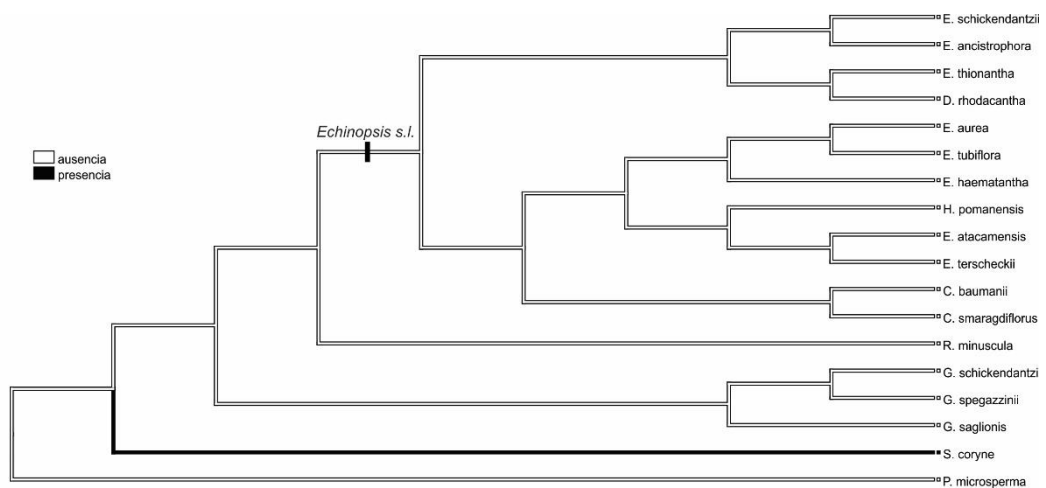
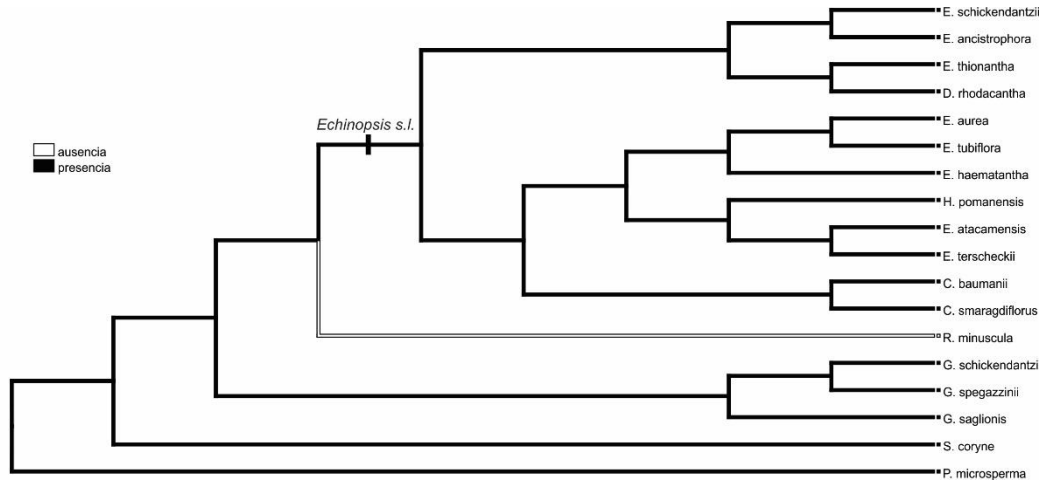
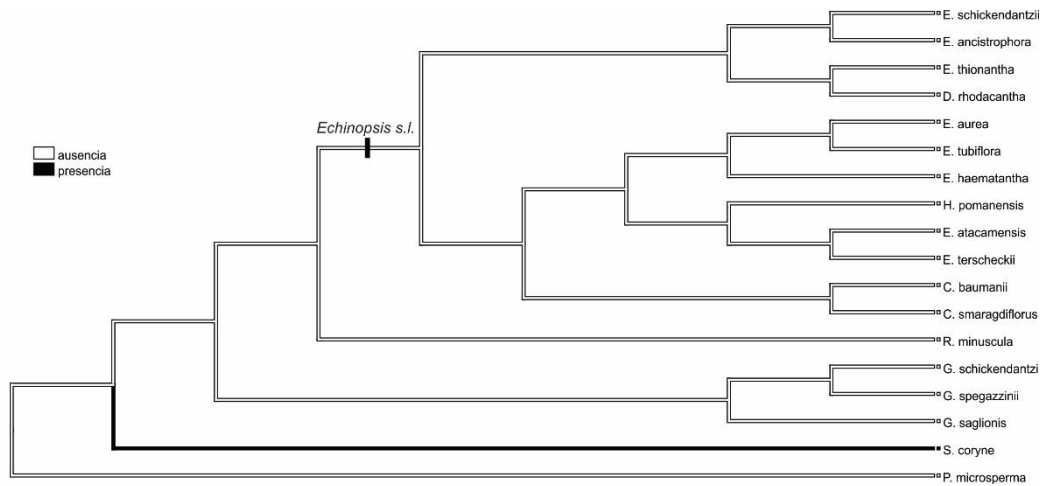


Figura 44. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Epidermis del pericarpelo (1 paso). **B.** Hipodermis en pericarpelo (4 pasos). **C.** Taninos en células epidérmicas del ovario (1 paso).

A.



B.



C.

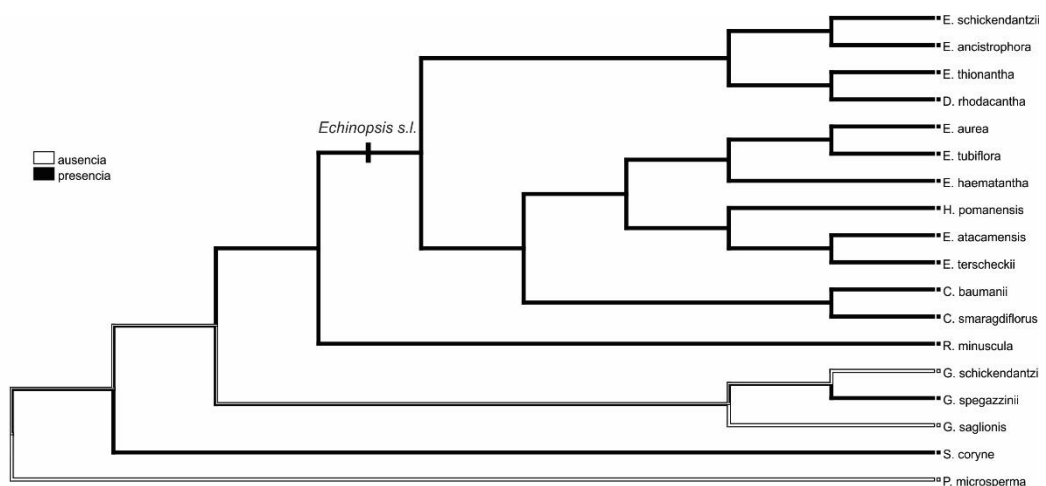
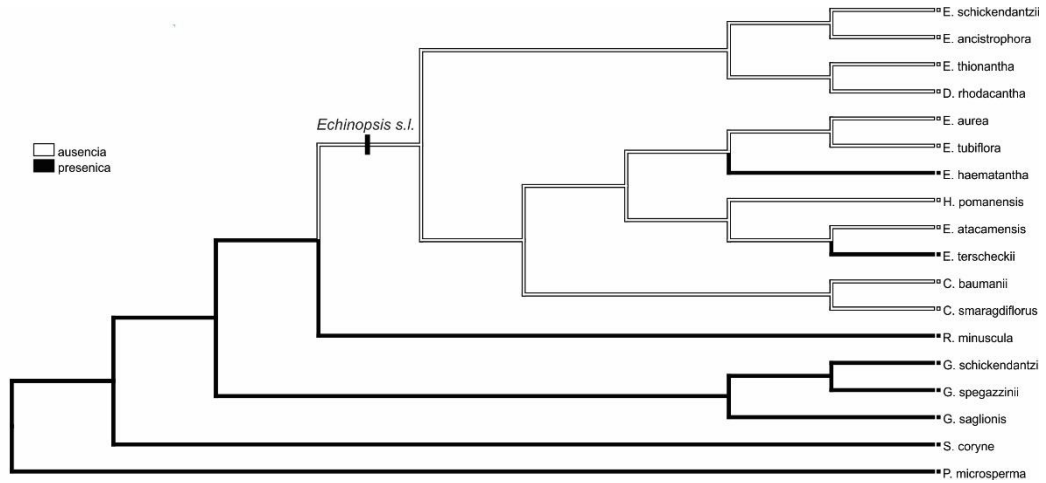
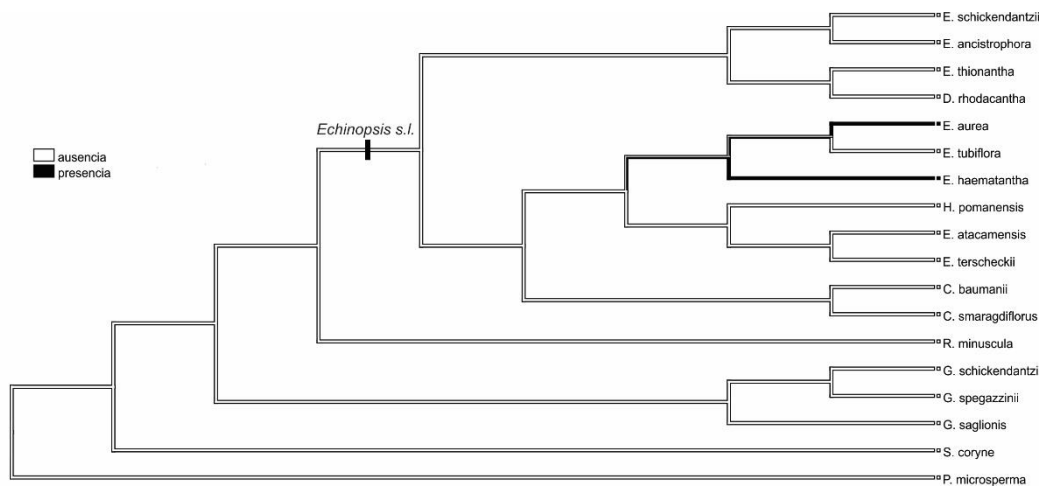


Figura 45. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Tricomas en el funículo (1 paso). **B.** Taninos en células epidérmicas del funículo (1 paso). **C.** Cámara de aire entre los tegumentos del óvulo (3 pasos).

A.



B.



C.

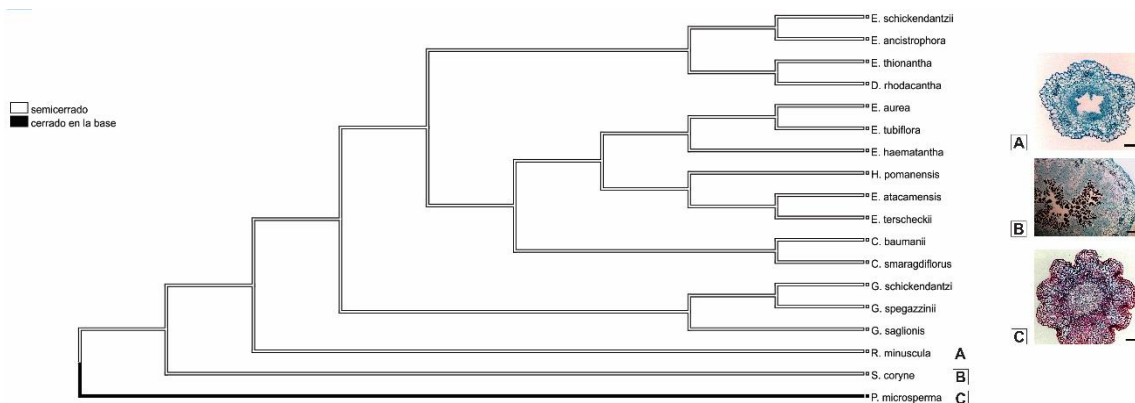


Figura 46. Topología de árbol de la filogenia de *Echinopsis s.l.* modificada de Schlumpberger & Renner (2012) mostrando reconstrucciones de estado ancestral de caracteres florales según máxima parsimonia. **A.** Taninos en células epidérmicas del tegumento externo (3 pasos). **B.** Pico nucelar (2 pasos). **C.** Tipo de estilo (1 paso).

DISCUSIÓN

Muchos caracteres morfológicos utilizados en las clasificaciones tradicionales de la familia, tales como la presencia de un cefalio, los síndromes de polinización, o la forma de crecimiento son caracteres altamente homoplásicos y, por ende, poco apropiados como sinapomorfías para grandes clados (Ritz *et al.*, 2007). Sin embargo, si se considera un nivel taxonómico menor, en combinación con otros rasgos morfológicos, estos caracteres pueden ser informativos. Por ejemplo, la presencia de pelos en el pericarpelo apoya a dos linajes de *Rebutia* filogenéticamente distanciados (Ritz *et al.*, 2007).

La simetría floral es un carácter estrechamente relacionado a los síndromes de polinización. Las flores actinomorfas son plesiomórficas dentro de los cactus aquí investigados, y en general dentro de Cactaceae (Griffith, 2004). Se ha señalado que flores zigomorfas ocurren en varios géneros de cactus (*Cleistocactus*, *Denmoza*, *Matucana*, *Oreocereus*) (Anderson, 2001; Hunt, 2006). Sin embargo, estos géneros no constituyen un grupo monofilético y, por lo tanto, la transición de las flores actinomorfas a las flores zigomorfas se produjo repetidamente en eventos independientes, o se produjeron múltiples reversiones (Ritz *et al.*, 2007; Schlumpberger & Renner, 2012). Los resultados del mapeo de este carácter concuerdan con esta postura, flores con simetría zigomorfa caracterizan a *D. rhodacantha* y *C. baumannii*, especies pertenecientes a subclados alejados filogenéticamente.

Algunas relaciones entre géneros de cactus fueron inferidas con base en el hecho de compartir el síndrome de polinización (p. ej., flores de anthesis diurna, con tubo corto, en su mayoría sin olor, de colores brillantes vs. *Echinopsis* s.s. adaptadas a la polinización por polillas, con flores blancas nocturnas, alargadas, en su mayoría perfumadas) (Gibson & Nobel, 1986; Barthlott & Hunt, 1993). Sin embargo, con el devenir de las filogenias moleculares, estas variaciones morfológicas resultaron ser el producto de un proceso de evolución convergente, dado que las mismas adaptaciones a la polinización se encuentran en cactus lejanamente emparentados (Ritz *et al.*, 2007; Schlumpberger & Renner, 2012). Debido a que estas morfologías son altamente homoplásicas en la familia, su valor en los análisis filogenéticos es limitado.

Schlumpberger & Renner (2012) sugirieron que los cambios en los síndromes florales observados en *Echinopsis* s.l. (asumiendo que los rasgos florales implican necesariamente ser especializados), como el salto de flores melitófilas a flores

esfingófilas en algunos taxones, aparece como un rasgo común a lo largo de la historia evolutiva del linaje. Sin embargo, dado el generalismo observado en muchas especies analizadas en este linaje (Schlumpberger & Badano, 2005; Ortega-Baes *et al.*, 2011; Alonso-Pedano & Ortega-Baes, 2012; Gorostiague & Ortega-Baes, 2015), los autores sugieren que los rasgos florales que presentan las especies no se corresponden necesariamente con los animales que visitan las flores.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, los caracteres florales correspondientes a forma, simetría, como así también el color de tépalos y el color de antera, estrechamente relacionados con los síndromes de polinización, (van der Pijl, 1961; Faegri K. & van der Pijl L., 1979), fueron muy variables y se revelaron como altamente homoplásicos y fueron los menos parsimoniosos en el análisis. Dentro del linaje, estos atributos florales reflejan convergencia evolutiva, es decir, que se produjeron múltiples orígenes independientes del mismo rasgo.

Las flores de todas las especies analizadas en esta tesis comparten ciertas características morfo-anatómicas. Sin embargo, algunos caracteres, al ser mapeados en la topología de árbol simplificado de Schlumberger & Renner (2012), se revelan como posibles apomorfías.

Ciertos caracteres anatómicos florales, como la epidermis de la cavidad estilar con papilas con contenidos tánicos en el citoplasma celular, son rasgos característicos de especies de la subfamilia Opuntioideae, y representan una sinapomorfía del linaje (Fuentes-Pérez, 2004; Fuentes-Pérez *et al.*, 2009). Con igual criterio, la ausencia de taninos en la epidermis que recubre la cavidad estilar de los miembros de Trichocereae analizados, se podría interpretar como una sinapomorfía de la tribu.

Por otro lado, el clado *Echinopsis s.l.* se podría apoyar por un rasgo distintivo común a todas las especies analizadas, que es la presencia de tricomas en las axilas de las escamas que recubren el pericarpelo y el tubo floral.

Siguiendo la clasificación de Hunt (2006), los géneros que reconoce en la tribu Trichocereae, se apoyan por caracteres epidérmicos de los nectarios florales, por ejemplo, los tricomas unicelulares presentes en todas las especies reconocidas bajo *Echinopsis* permiten distinguirlas, de los miembros de *Cleistocactus* que presentan nectarios con epidermis glabra; mientras que los taxones de *Gymnocalycium* presentaron

tricomas pluricelulares uniseriados. Sin embargo, los tricomas unicelulares se revelan como homoplásicos si se considera a los géneros *Denmoza* y *Harrisia*.

Dado que no hay registros previos en la familia, los picos nucelares registrados en *E. aurea* y *E. haematantha* representan una autapomorfía que se originó al menos dos veces de manera independiente dentro del linaje.

A pesar que la presencia de estaminodios en forma de tricomas lanosos en la región superior del nectario floral, es un carácter útil para apoyar al subclado de *Echinopsis* s.l. conformado por *D. rhodacantha* + *E. thionantha*, se trata de un carácter homoplásico que evolucionó independientemente en *S. coryne* de la tribu Browningieae.

En *Gymnocalycium* el análisis de caracteres morfológicos a lo largo de la filogenia molecular, ha demostrado una tendencia a la reducción del tamaño del tallo, a la reducción de la cantidad y la resistencia de las espinas, al aumento del tamaño de la semilla, al desarrollo de las raíces napiformes y el cambio de frutas jugosas y coloridas a frutos secos y verdes (Demaio *et al.*, 2011). A través del análisis morfo-anatómico floral aquí realizado, se han revelado caracteres exclusivos del género que permiten apoyar su monofilia, como la presencia de hilos conectando granos de polen, la presentación secundaria del polen, los nectarios florales con epidermis con tricomas multicelulares uniseriados y los tricomas unicelulares breves en la base de filamentos.

Este análisis revela evolución convergente en la mayoría de los caracteres morfológicos y anatómicos florales. Sin embargo, muchos de ellos resultan útiles para apoyar a diferentes subclados del linaje. A pesar de ello, los caracteres hallados deben confirmarse o refutarse en un análisis filogenético que incluya a un mayor número de representantes de la tribu.

CONCLUSIONES

*Las diferencias encontradas a nivel epidérmico en los diferentes verticilos sugiere que se tratan de rasgos de valor diagnóstico. Es necesario ampliar el estudio anatómico contemplando otros miembros de *Echinopsis* s.l. para evaluar con mayor precisión la importancia sistemática de la epidermis de los diferentes verticilos florales.

*Las variaciones halladas en la epidermis nectarífera permiten diferenciar a especies cercanamente emparentadas (*Cleistocactus* vs. *Echinopsis* vs. *Gymnocalycium*).

* Dentro de este linaje se observa la presencia de varios casos de evolución convergente en cuanto a determinados caracteres florales (por ejemplo, simetría floral, color de tubo floral y color de tépalos).

*Cabe destacar la relevancia de construir una hipótesis filogenética integrando caracteres morfológicos y anatómicos, con datos moleculares.

CONCLUSIONES FINALES

El análisis morfológico, anatómico y ultraestructural, constituye un aporte original y de suma importancia para la caracterización de las especies de la tribu Trichocereae. Además, contribuye con caracteres estructurales taxonómicamente útiles que permitirán una mejor interpretación de las relaciones filogenéticas de este complejo linaje, cuando se logre un profundo conocimiento para los demás representantes de la tribu aún no estudiados.

La mayoría de los rasgos anatómicos florales de las especies de *Echinopsis* Zucc. analizadas demostraron ser conservados en relación a lo que se conoce sobre el *Bauplan* de la familia. Las principales diferencias refieren a rasgos exomorfológicos tradicionalmente asociados a especialización fenotípica a diferentes tipos de polinizadores (especialmente el tamaño y la forma floral, y el color de tépalos).

El análisis ultraestructural del nectario floral reveló que la epidermis nectarífera podría constituir una vía de producción y secreción adicional a los nectarostomas.

La anatomía de nectarios y estigmas sugiere no guardar relación con los diferentes tipos de polinizadores.

En general la mayoría de las diferencias anatómicas encontradas a nivel epidérmico en los diferentes verticilos florales sugiere que se trata de rasgos de valor diagnóstico, sin embargo, ampliar el estudio contemplando otros miembros de la tribu permitirá evaluar con mayor precisión la importancia sistemática de la epidermis de los diferentes verticilos florales.

En cuanto a la especialización fenotípica a la polinización por aves, las características de los NFs aparentemente carecen de relación con el tipo de polinizador, y la especialización fenotípica de las flores, a pesar de que la polinización de las aves se ha verificado en esas especies.

La presencia de hilos que conectan granos de polen en todos los representantes de *Gymnocalycium* analizados sugieren que se trata de un carácter taxonómicamente fuerte que apoya la monofilia de este linaje de Cactaceae. Por otra parte, la distribución filogenética de la presentación secundaria del polen dentro de la familia merece mayor atención, para

detectar si este mecanismo surgió independientemente en otros linajes no relacionados evolutivamente.

La mayoría de los caracteres estructurales relacionados al gineceo de las especies de Trichocereae revelaron una alta uniformidad, los caracteres resultaron ser muy estables en términos evolutivos. Así, la morfología y anatomía del estigma de especies que difieren en su especialización fenotípica a la polinización por diferentes tipos de animales no muestran diferencias que se puedan asociar a los diferentes tipos de agentes polinizadores de cada especie. Otro rasgo conservado en Trichocereae es el tipo de estilo semicerrado y el patrón de recorrido del tubo polínico dentro del mismo.

El primer registro de picos nucelares en Cactaceae constituye un aporte muy valioso. Sin embargo, sería importante explorar los óvulos de taxones cercanamente emparentados a *E. aurea* y *E. haematantha*, con el fin de dilucidar si estas estructuras aparecieron en eventos evolutivos independientes.

Aunque a través del análisis mapeo de caracteres se pudieron detectar muchas homoplasias morfológicas y anatómicas en las flores de Trichocereae, ciertos rasgos resultan útiles si son considerados a niveles de jerarquías menores, como por ejemplo, la epidermis nectarífera que permiten diferenciar a especies cercanamente emparentadas (*Cleistocactus* vs. *Echinopsis* vs. *Gymnocalycium*).

Algunos de los caracteres compartidos por los miembros de Trichocereae con otros miembros de Cactoideae, pertenecientes a tribus filogenéticamente cercanas (Notocactaceae y Browningiaeeae), y con miembros de la subfamilia Opuntioideae son: la presencia de haces vasculares anficribales en filamentos, ovario ínfero embebido en el pericarpleo con numerosos óvulos de placentación parietal, el estilo semicerrado, cilíndrico y con un canal estilar rodeado por numerosos estratos de tejido de transmisión, y los numerosos lóbulos estigmáticos de epidermis tricomática. De manera que, estos caracteres reflejan un alto grado de uniformidad si se considera a las subfamilias Cactoideae y Opuntioideae.

Como corolario se plantea la necesidad de profundizar y ampliar el análisis morfológico y anatómico de las flores de este linaje, sumado a la importancia de construir hipótesis filogenéticas integrando caracteres morfológicos y anatómicos con datos moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Agthe C. (1951) Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. *Bericht der schweizerischen botanischen Gesellschaft*, **61**, 240–273.
- Almeida O.J.G., Sartori-Paoli A.A., 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., A.A. Sartori-Paoli, 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., 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.
- Almeida O.J.G., Souza L.A.D., Sartori-Paoli A.A., Davis A.R., Cota-Sánchez J.H. (2018) Pericarp development in fruits of epiphytic cacti: implications for fruit classification and macro-morphology in the Cactaceae. *Botany*, **96**, 621-635.
- Alonso-Pedano M., Ortega-Baes P. (2012) Generalized and complementary pollination system in the Andean cactus *Echinopsis schickendantzii*. *Plant systematics and evolution*, **298**, 1671-1677.
- Anderson E.F. (2001) *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Anderson E.F. (2005) *Das große Kakteen lexikon*. Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany.
- Andrés-Hernández A.R., Terrazas T. (2009) Leaf architecture of *Rhus* s.str. (Anacardiaceae). *Feddes Repertorium*, **120**, 293–306.
- Andrés-Hernández A.R., Espinosa D., Fraile-Ortega M.E. & Terrazas T. (2012) Venation patterns of *Bursera* species Jacq. ex L. (Burseraceae) and systematic significance. *Plant Systematic and Evolution*, **298**, 1723–1731.

- Applequist W.L., Wallace R.S. (2002) Deletions in the plastid trn T– trn L intergenic spacer define clades within Cactaceae subfamily Cactoideae. *Plant Systematics and Evolution*, **231**, 153-162.
- Arakaki M., Christin P.A., Nyffeler R., Lendel A., Eggli U., Ogburn R.M., Spriggs E., Moore M.J., Edwards E.J. (2011) Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **108**, 8379– 8384.
- Arreola-Nava, H. 1997. Formas de vida y características morfológicas. In *Suculentas Mexicanas Cactáceas*. Editorial CVS Publicaciones, México City. Pp 27-35.
- Avalos A.A., Zini L.M., Ferrucci M.S., Lattar E.C. (2019) Anther and gynoecium structure and development of male and female gametophytes of *Koelreuteria elegans* subsp. *formosana* (Sapindaceae): Phylogenetic implications. *Flora-Morphology Distribution Functional Ecology of Plants*, DOI: 10.1016/j.flora.2019.04.003
- Baker H.G. (1975) Sugar concentration in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica*, **7**, 37-41.
- Baker H.G., Baker I. (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: C.E. Jones, & R.J. Little (Eds.), *Handbook of experimental pollination biology* (pp. 117–141). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Baker H.G., Baker I. (1990) The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, **39**, 157–166.
- Bárcenas R.T., Yesson C., Hawkins J.A. (2011) Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics*, **27**, 470-489.
- Barthlott, W. (1983) Biogeography and evolution in neo and paleotropical Rhipsalinae. In *Dispersal and Distribution* (K. Kubitzki, ed.). Verlag Paul Parey, Hamburg, Germany. Pp. 241–248.
- Barthlott W., Hunt D.R. (1993) Cactaceae. In: Kubitzki K., Rohwer J.G., Bittrich V. (Eds), *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer, Verlag; Berlin: 161-197.

- Basso-Alves J.P., Agostini K., de Padua Teixeira S. (2010) Pollen and stigma morphology of some *Phaseoleae* species (Leguminosae) with different pollinators. *Plant Biology*, **13**, 602-610.
- Baum S.F, Eshed Y., Bowman J.L. (2001) The *Arabidopsis* nectary is an ABC-independent floral structure. *Development*, **128**, 4657-4667.
- Bello M.G., González F., 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*, **26** (99), 155-167.
- Belmonte E., Cardemil L., Kalin Arroyo M.T. (1994) Floral nectary structure and nectar composition in *Eccremocarpus scaber* (Bignoniaceae), a hummingbird pollinated plant of central Chile. *American Journal of Botany*, **81**, 493-503.
- Bernardello G. (2007) A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson S.W., Nepi M., Paccini E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, New York: 19-128.
- Bhojwani S.S., Bhatnagar S.P., Dantu P.K. (2015) The Embryology of Angiosperms, 6th Edition. New Delhi, Vikas Publishing House.
- 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. (1964) The cactus gynoecium: a new interpretation. *American Journal of Botany*, **51**, 598-610.
- 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.
- Bonnier G. (1879) Les nectaires: étude critique, anatomique et physiologique. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, VI. **8**, 5-212.

- Bouman F., (1984) The ovule. In: Johri, B.M. (Ed.), *Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin, pp. 123–157.
- Bravo-Hollis H., Scheinvar L. (1995) *El interesante mundo de las cactáceas*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Britton N.L., Rose J.N. 1919-1923. *The Cactaceae*. Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. Vol. 1: 1-236, 1919; 2: 1-239, 1920; 3: 1-255, 1922; 4: 1-318, 1923.- Carnegie Institution of Washington.
- Brockington S.F., Roolse A., Ramdial J., Moore M.J., Crawley S., Dhingra A., Hilu K., Soltis D.E., Soltis P.S. (2009) Phylogeny of the Caryophyllales sensu lato: revisiting hypotheses on pollination biology and perianth differentiation in the core Caryophyllales. *International Journal of Plant Science*, **170**, 627-643.
- Brown W.H. (1938) The bearing of nectaries on the phylogeny of flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **79**, 549–595.
- Brown J.H., Kodric-Brown A. (1979) Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird-pollinated flowers. *Ecology*, **60**, 1022-1035.
- Buchmann S.L. (1987) The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 343–369.
- Butterworth C.A., Cota-Sanchez J.H., Wallace R.S. (2002) Molecular systematics of tribe Cacteae (Cactaceae: Cactoideae): A phylogeny based on rpl16 intron sequence variation. *Systematic Botany*, **27**, 257 – 270.
- Buxbaum F. (1953) *Morphology of Cacti*. Section II: Flower. Abbey Garden Press, Pasadena, California.
- Calvente A., Zappi D.C., Forest F., Lohmann L.G. (2011) Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**, 456-468.
- Chase M.W., Christenhusz M.J.M., Fay M.F., Byng J.W., Judd W.S., Soltis D.E., Mabberley D.J., Sennikov A.N., Soltis P.S., Stevens P.F. (2016) An update of the Angiosperm

Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181**, 1–20
<https://doi.org/10.1111/boj.12385>

- Cisneros A., Benega García R., Tel-Zur N. (2011) Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). *Flora*, **206**, 1076-1084.
- Classen-Bockhoff R., Heller A. (2008) Floral synorganization and secondary pollen presentation in four Marantaceae from Costa Rica. *International Journal of Plant Science*, **169**, 745–760.
- Cocucci A.A., Vogel S. (2001) Oil producing species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) and their pollination by oil-collecting bees in subtropical South America. *Flora*, **196**, 26–46.
- Colaço M.A.S., Fonseca R.B.S., Lambert S.M., Costa C.B.N., Machado C.G., Borba E.L. (2006). Biologia reprodutiva de *Melocactus glaucescens* Buining & Brederoo e *M. paucispinus* G. Heimen & R. Paul (Cactaceae), na Chapada Diamantina, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, **29**, 239–249.
- Cota-Sánchez J. H., (1996) A Review of *Ferocactus* Britton & Rose. In: The Genus *Ferocactus*: Taxonomy and Ecology, pp. 35-80. Termites Press, San Diego, CA.
- Cota-Sánchez H., Almeida O.J.G., Falconer D.J, Choic H.J., Bevan L. (2013) Intriguing thigmonastic (sensitive) stamens in the Plains Prickly Pear *Opuntia polyacantha* (Cactaceae) J. *Flora*, **208**, 381-389.
- Crozier B.S. (2005) Subfamilies of Cactaceae Juss., including Blossfeldioideae subfam. nov. *Phytologia*, **86**, 52–64.
- Davis A.R., Peterson R.L., Shuel R.W. (1986) Anatomy and vasculature of the floral nectaries of *Brassica napus* (Brassicaceae). *Canadian Journal of Botany*, **64**, 2508-2516.
- Davis A.R., Peterson R.L., Shuel R.W. (1988) Vasculature and ultrastructure of the floral and stipular nectaries of *Vicia faba* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, **66**, 1435-1448.

- Davis A.R., Gunning B.E.S. (1992) The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 1. Development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma*, **166**, 134-152.
- Demaio P.H., Barfuss M.H.J., Kiesling R., Till W., 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.
- De Luna E., Mishler B.D. (1996) El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **59**, 131-146.
- De Viana M.L., Ortega-Baes P., Saravia M., Badano E.I., Schlumpberger B. (2001) Biología floral y polinizadores de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) en el Parque Nacional Los Cardones, Argentina. *Revista de Biología Tropical*, **49**, 279-285.
- De Wet E., Robert J.P., Coetzee J. (1990) Ultrastructure of the stigma and style of *Mangifera indica* L. *South African Journal of Botany*, **56**, 206-213.
- Del Castillo R.F., González-Espinosa M. (1988) Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia*, **71**, 185-199.
- Díaz L., Cocucci A.A. (2003) Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology*, **5**, 531–539.
- Dickison W.C. (1993) Floral anatomy of the Styracaceae, including observations on intra-ovarian trichomes. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **112**, 223-255.
- Durkee L.T., Gaal D.J., Reisner W.H. (1981) The floral and extra-floral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. *American Journal of Botany*. **68**, 453-462.
- Durkee, L.T. (1983) The ultrastructure of floral and extrafloral nectaries. In: Bentley B, Elias T., eds. The biology of nectaries. New York: Columbia University Press, 1-29.
- Edwards E.J., Nyffeler R., Donoghue M.J. (2005) Basal cactus phylogeny: Implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany*, **92**, 1177-1188.

- Eggli U., Giorgetta M. (2015) Flowering Phenology and Observations on the Pollination Biology of South American Cacti. 1. *Denmoza rhodacantha*. *Haseltonia*, **20**, 3-12.
- Elizondo-Elizondo J., Valdes Reyna J., Arias Montes S., Hatch S.L. (1994) Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cacteeae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, **39**, 59-67.
- Endress P.K. (1994) Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Endress P.K. (2002) Morphology and angiosperm systematics in the molecular era. *The Botanical Review*, **68**, 545-570.
- Endress P.K., Baas P., Gregory M. (2000) Systematic morphology and anatomy: 50 years of progress. *Taxon*, **49**, 401-434.
- Erbar C., Leins P. (1999) Secondary pollen presentation and a curious rupture of the style in *Spigelia* (Spigeliaceae, Gentianales). *Plant Biology*, **1**, 389-402.
- Erbar C., Leins P. (2015) Diversity of styles and mechanisms of secondary pollen presentation in basal Asteraceae – new insights in phylogeny and function. *Flora*, **217**, 109-130.
- Esau K. (1987) Anatomía de las Plantas con Semillas. Ed. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
- Faegri K., van der Pijl L. (1979) The principles of pollination ecology. Pergamon Press, London, UK.
- Fahn A. (1952) On the structure of floral nectarines. *Botanic Gazette*, **113**, 464-470.
- Fahn A. (1978) Anatomía Vegetal. H. Blume ediciones, Madrid, España, pp 524-527.
- Fahn A. (1979) Ultrastructure of nectarines in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany*, **66**, 977-985.
- Fahn A. (1979) Secretory Tissues in Plants. Academic Press, San Francisco, pp 302.
- Fahn A. (1982/5) Plant anatomy 3º edición, Madrid, Spain, pp 481
- Fahn A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, **108**, 229-257.

- Fahn A. (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, **31**, 37–75.
- Fahn A., Shimony C. (2001) Nectary structure and ultrastructure of unisexual flowers of *Ecballium elaterium* (L.) A. Rich. (Cucurbitaceae) and their presumptive pollinators. *Annals of Botany*, **87**, 27-33.
- Fagua J.C., Ackerman J.D. (2011) Consequences of floral visits by ants and invasive honeybees to the hummingbird- pollinated, Caribbean cactus *Melocactus intortus*. *Plant Species Biology*, **26**, 193–204.
- Fan Y.L., Kress W.J., Li Q.J. (2015) A new secondary pollen presentation mechanism from a wild ginger (*Zingiber densissimum*) and its functional roles in pollination process. PLoS ONE. 10:e0143812.
- Fenster C.B., Armbruster W.S., Wilson P., Dudash M.R.; Thomson J.D. (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 375–403.
- Fleming T.H., Shaley C.T., Holland J.N., Nason J.D., Hamrick J.L. (2001) Sonoran desert columnar cactus and the evolution of generalized pollination systems. *Ecological Monographs*, **71**, 511-530.
- Franck A.R., Cochrane B.J., Garey J.R. (2013) Phylogeny, biogeography and infrageneric classification of *Harrisia* (Cactaceae). *Systematic Botany*, **38**, 210-223.
- Frey-Wyssling A., Agthe C. (1950) Nektar ist ausgeschiedener Phloemsaft. *Verhandlung der schweizerischen naturforschenden Gesellschaft*, **130**, 175–176.
- Fuentes-Pérez M. 2004. Anatomía floral de siete especies de la tribu Pachycereeae (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Autónoma de México. México, DF.
- Fuentes-Pérez M. 2008. Estudio comparativo de la anatomía floral en Opuntioideae K. Schum. (Cactaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Posgrado de Botánica. Campus Montecillo. México.

- Fuentes-Pérez M., Terrazas T., Arias S. (2009) Anatomía floral de cinco especies de *Opuntia* (Opuntioideae, Cactaceae) de México. *Polibotánica*, **27**, 89-102.
- Gaffal K.P., Heimler W., El-Gammal S. (1998) The floral nectary of *Digitalis purpurea* L., structure and nectar secretion. *Annals of Botany*, **81**, 251-262.
- Galen C. (1999). Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience*, **49**, 631-640.
- Galetto L. (1995). Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. *Plant Systematics and Evolution*, **196**, 99–121.
- Galetto L. (1997). Flower structure and nectar chemical composition in three Argentine Apocynaceae. *Flora*, **192**, 197–207.
- Galetto L. (2006) Morfología y anatomía floral en especies de Apocynaceae- Asclepiadoidea. *Kurtziana*, **32**, 5-11.
- Galetto L., Bernardello G. (2004) Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six Ipomoea species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*, **94**, 269–280.
- Gibson A.C., Nobel P.S. (1986) *The cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA, pp 286.
- Giuliani C., Bini L.M., Lippi, M.M., 2012. Two structures and functions in the nectary of Frankincense tree (*Boswellia sacra* Flueck.). *Flora*, **207**, 74–79.
- Glinos E, Cocucci A. (2011) Pollination biology of *Canna indica* (Cannaceae) with particular reference to the functional morphology of the style. *Plant Systematics and Evolution*, **291**, 49–58.
- Godínez-Alvarez H., Valverde T., Ortega-Baes P. (2003) Demographic trends in the Cactaceae. *Botanical Review*, **69**, 173-203.
- Gonzalez A.M., Cristóbal C.L. (1997) Anatomía y ontogenia de semillas de *Helicteres lhotzkyana* (Sterculiaceae). *Bonplandia*, **9**, 287-294.

- González V.V., Solís S.M., Ferrucci M.S. (2017) Embryological studies of *Magonia pubescens* (Dodonaeae, Sapindaceae): development of male and female gametophytes in both floral morphs and its phylogenetic implications. *Australian Systematic Botany*, **30**, 279–289.
- Gorostiague P. (2012) Flores ornitófilas en Cactaceae: biología de la polinización de dos especies del género *Cleistocactus*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta.
- 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.
- Gorostiague P., Ortega-Baes P. (2015) How specialised is bird pollination in the Cactaceae? *Plant Biology*, doi: 10.1111/plb.12297
- Gorostiague P., Ortega-Baes P. (2017) Pollination biology of *Echinopsis leucantha* (Cactaceae): passerine birds and exotic bees as effective pollinators. *Botany*, **95**, 53–59.
- Gotelli M.M., Lattar E.C., Zini L.M., Galati B.G. (2017) Style morphology and pollen tube pathway. *Plant Reproduction*, **30**, 155–170.
- Grant V., Grant K.A. (1979) The pollination spectrum in the southwestern America cactus flora. *Plant Systematics and Evolution*, **133**, 29-37.
- Griffith M.P. (2002) Phylogenetic relationships in the Opuntioideae (Cactaceae) based on nrITS sequences. *International Organization for Succulent Plant Study Bulletin*, **10**, 15-16.
- Griffith M.P. (2004) What did the first cactus look like? An attempt to reconcile the morphological and molecular evidence. *Taxon*, **53**, 493 -499.
- Griffith M.P., Porter J.M. (2009) Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **170**, 107-116.

- Gudiño W., Marquez-Guzman J., De la Barrera E. (2015) Structural implications for nectar secretion by nectaries of three columnar cacti. *Maejo international journal of science and technology*. DOI: 10.14456/mijst.2015.13
- Giaquinta, R.T. (1979) Phloem loading of sucrose. Involvement of membrane ATPase and proton transport. *Plant Physiology*, **63**, 744-748.
- Hanf M. (1935) Vergleichende and Cactaceae eitwichulungsgeschichtliche. Untersuchungen über Morphologie und Anatomie der Griffel und Griffelläste. *Beihefte zum Botanische Centralblatt A*, **54**, 99-141.
- Halbritter H., Hesse M., Buchner R. (1997) Pollen-connecting threads in *Gymnocalycium* (Cactaceae): their origin, function, and systematic relevance. *Grana*, **36**, 1-10.
- Halbritter H., Till W. (1996) Morphologie und Feinstrukturen des Pollens von *Gymnocalycium*. – *Gymnocalycium*, **9**, 1-22.
- Hernández-García G., García-Villanueva E. (1991) Anatomía comparada de óvulos y semillas de dos especies del género *Mammillaria* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **51**, 25-38.
- Hernández-Hernández T., Hernández H.M., De-Nova J.A., Puente R., Eguiarte L.E., Magallón S. (2011) Phylogenetic relationships and evolution growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*, **98**, 44-61.
- Hernández-Hernández T., Brown J.W., Schlumpberger B.O., Eguiarte L.E., Magallón S. (2014) Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New Phytologist*, **202**, 1382-1397.
- Heslop-Harrison Y., Shivanna K.R. (1977) The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. *Annals of Botany*, **41**, 1233–1258.
- Hesse M. (1981). Pollenkitt and viscin threads: their role in cementing pollen grains. *Grana*, **20**, 145–152.
- Hesse M. (2000) Pollen wall stratification and pollination. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 1–17.

- Hesse M., Vogel S., Halbritter H. (2000) Thread-forming structures in angiosperm anthers: their diverse role in pollination ecology. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 281-292.
- Howell G.J., Slater A.T., Knox R.B. (1993) Secondary pollen presentation in angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Botany*, **41**, 417–418.
- Horner H., Healy R., Cervantes-Martínez T., Palmer R. (2003) Floral nectary fine structure and development in *Glycine max* L. (Fabaceae). *International Journal of Plant Science*, **164**, 675-690.
- Hunt D. (2006) *The new cactus lexicon*. DH Books, Milborne Port, UK, pp 373-526.
- Jadeja S. (2015) First record on secondary pollen presentation in the Cucurbitaceae family. *Plant Ecology and Evolution*, **148**, 297–299.
- Johansen D.A. (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co. New York.
- Johri B.M. (1984) *Embryology of Angiosperms*. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Johri B.M., Ambegaokar K.B., Srivastava P.S. (1992) *Comparative Embryology of Angiosperms*. Vol. 1 y 2. Springer, New York.
- Kiesling R. (1975) Los géneros de Cactaceae de Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **16**, 197-227.
- Kiesling R., Ferrari O. (2005) *100 Cactus Argentinos*. Editorial Albatros. ISBN 950-24-1108-0.
- Kiesling R., Saravia M., Oakley L., Muruaga N., Metzinger D., Novara L. (2011) Cactaceae Juss. In *Flora del Valle de Lerma*, Vol. 10. Buenos Aires, pp 177 – 4400.
- Kim K., Kim H., Ho Park S., Joon Lee S. (2017) Hydraulic Strategy of Cactus Trichome for Absorption and Storage of Water under Arid Environment. *Frontiers in Plant Science*, **18**, 8-1777.
- Koch C.U., von Helversen O. (2006) Secondary pollen presentation in Cuban bat pollinated *Lobelia*: precise deposition of pollen and mechanical species isolation. *Botanische Jahrbucher fur Systematik*, **127**, 105-114.

- Korotkova N., Zabel L., Quandt D., Barthlott W. (2010) A phylogenetic analysis of *Pfeiffera* and the reinstatement of *Lymanbensonia* as an independently evolved lineage of epiphytic Cactaceae within a new tribe Lymanbensonieae. *Willdenowia*, **40**, 151 – 172.
- Ladd P.G. (1994) Pollen presenters in the flowering plants- form and function. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **115**, 165- 195.
- Larrea-Alcázar D.M., López R.P. (2011) Pollination biology of *Oreocereus celsianus* (Cactaceae), a columnar cactus inhabiting the high subtropical Andes. *Plant Systematics and Evolution*, **295**, 129–137.
- Lawrence, G.H.M. (1951) *Taxonomy of vascular plants*. Part. 2. The Macmillan Co. N.Y., pp 297-854.
- Leins P., Erbar C. (1994) Flowers in Magnoliidae and the Origin of Flowers in Other Subclasses of the Angiosperms. II. The Relationships between Flowers of Magnoliidae, Dilleniidae, and Caryophyllidae. *Plant Systematics and Evolution (Historical Archive)*, **8**, 209-218.
- Leins P., Erbar C. (2006) Secondary pollen presentation syndromes of the Asterales – a phylogenetic perspective. *Botanische Jahrbücher*, **127**, 83–103.
- Leitao C.A.E., Meira R.M.S.A., Azevedo A.A.A., Silva K.L.F., Collevatti R.G. (2005) Anatomy of the floral, bract, and foliar nectaries of *Triumfetta semitriloba* (Tiliaceae). *Canadian Journal of Botany*, **83**, 279–286.
- Leuenberger B.E. (1976) Die Pollenmorphologie der Cactaceae und ihre Bedeutung für die Systematik. *Dissertationes Botanicae*: 31.
- Lin H., Fan X., Zhou X., Gao J. (2012) Self-interference is reduced in a secondary pollen presentation species, *Duperrea pavettifolia* (Rubiaceae). *Flora*, **207**, 895–902.
- Lizarazu M.A., Pozner R.E. (2014) Nucellar beak structure and pollen tube growth in Cucurbitaceae. *Flora*, **209**, 340-348.

- Lopes A.V., Machado I.C. (1999) Pollination and reproductive biology of *Rauvolfia grandiflora* (Apocynaceae): secondary pollen presentation, herkogamy and self-incompatibility. *Plant Biology*, **1**, 547–553.
- Luque R., Sousa H.C., 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.
- Lumaga M.R.B., Cozzolino S., Kocyan A. (2006) Exine micromorphology of Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae): phylogenetic constraints or ecological influences? *Annals of Botany*, **98**, 237–244.
- Maddison W.P., Maddison D.R. (2018) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2 <http://www.mesquiteproject.org>
- Mandujano M.C., Carrillo-Angeles I., Martínez-Peralta C., Golubov J. (2010) Reproductive biology of Cactaceae. In: Ramawat K.J. (Eds), *Desert plants*. Springer, Berlin, Germany, pp. 197-230.
- Martínez Quezada M.D. (2018) Evolución de caracteres anatómicos del tallo en la tribu Hylocereeae (Cactoideae, Cactaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mauseth J. (2006) Structure-Function Relationships in Highly Modified Shoots of Cactaceae. *Annals of Botany*, **98**, 901-26.
- Mauseth J. (2016) Many cacti have leaves on their “flowers”. *Cactus and Succulent Journal (USA)*, **88**, 4–9.
- Metzing D., Meregalli M., Kiesling R. (1995) An annotated checklist of the genus *Gymnocalycium* Pfeiffer ex Mittler (Cactaceae). *Allionia*, **33**, 181-228.
- Montero Alfaro O.A. (2004) Localización, estructura e histoquímica de nectarios florales en Cactaceae. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Moreno N.C., Amarilla L.D., Las Peñas M.L., Bernardello G. (2014) Molecular cytogenetic insights into the evolution of the epiphytic genus *Lepismium* (Cactaceae) and related genera. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **177**, 263–277.
- Morrone J.J. (2000) *El lenguaje de la cladística*. Primera edición. Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad de México.
- Morrone J.J. (2013) *Sistemática, fundamentos, métodos, aplicaciones*. La prensa de Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Ciudad de México.
- Munguía-Rosas M.A., Sosa V.J., Ojeda M.M., De-Nova J.A. (2009) Specialization clines in the pollination systems of agaves (Agavaceae) and columnar cacti (Cactaceae): a phylogenetically controlled meta-analysis. *American Journal of Botany*, **96**, 1887–1895.
- Nassar J.M., Ramírez N., 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.
- Nassar J.M., Ramírez N. (2004) Reproductive biology of the melon cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **248**, 31–44.
- Nassar J.M., Ramírez N., Lampo M., González J.A., Casado R., Nava F. (2007) Reproductive biology and mating system estimates of two Andean melocacti, *Melocactus schatzlii* and *M. andinus* (Cactaceae). *Annals of Botany*, **99**, 29–38.
- Neff, J.L., Simpson B.B. (2005) Other rewards: oils, resins, and gums. In: Dafni A., Kevan P.G., Husband B.C., eds. *Practical pollination biology*. Ontario: Enviroquest, pp 314–328.
- Nerd A., Mizrahi Y. (1997) Reproductive biology of cactus fruits crops. *Horticultural Reviews*, **18**, 321–346.
- Nepi M., Ciampolini F., Pacini E. (1996) Development and ultrastructure of *Cucurbita pepo* nectaries of male flowers. *Annals of Botany*, **81**, 251–262.

- Nepi M. (2007) Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Berlin, pp 129-166.
- Nicolson S.W., Thornburg R.W. (2007) Nectar Chemistry. In: Nicolson S.W., Nepi M., Pacini E. (Eds.), *Nectaries and Nectar*. Springer, Berlin, pp 215-264.
- Nobel P.S. (1995) Environmental biology. In: G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta- Barrios (eds) *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO Plant Production and Protection Paper, 132, pp 36-48.
- Nobel P.S. (2002) *Cacti: biology and uses*. University of California Press, California, USA.
- Núñez-Mariel C., Engleman M.E., Márquez-Guzmán J. (2001) “Embriología de *Pachycereus militaris* (Audot) Hunt (Cactaceae)”. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **51**, 25-38.
- 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**, 312-326.
- Nyffeler R. (2007) The closest relatives of cacti: Insights from phylogenetic analyses of chloroplast and mitochondrial sequences with special emphasis on relationships in the tribe Anacampseroteae. *American Journal of Botany*, **94**, 89-101.
- Nyffeler R., Eggli U. (2010) A farewell to dated ideas and concepts- Molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia*, **6**, 109-149.
- O'Brien S.P., Loveys B.R., Grant W.J.R. (1996) Ultrastructure and function of floral nectaries of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Annals of Botany*, **78**, 189-196.
- Ollerton J., Killick A., Lamborn E., Watts S., Whiston M. (2007) Multiple meanings and modes: on the ways to be a generalist flower. *Taxon*, **56**, 717-728.
- Ollerton J., Alarcón R., Waser N.M., Price M.V., Watts S., Cranmer L., Hingston A., Peter C.I., Rotenberry J. (2009) A global test of the pollination síndrome hypothesis. *Annals of Botany*, **84**, 918-927.

- Ortega-Baes, P., Sührling S., Sajama J., Sotola E., Alonso-Pedano M., Bravo S., Godínez-Alvarez H. (2010) Diversity and conservation in the cactus family. In: K.G. Ramawat (Ed.) *Desert plants: Biology and Biotechnology*. Springer, pp 157-173.
- Ortega-Baes P., Saravia M., Sührling S., Godínez-Alvarez H., Zamar M. (2011) Reproductive biology of *Echinopsis terscheckii* (Cactaceae): the role of nocturnal and diurnal pollinators. *Plant Biology*, **13**, 33-40.
- Ortega-Baes P., Gorostiague P. (2013) Extremely reduced sexual reproduction in the clonal cactus *Echinopsis thelegona*. *Plant Systematic and Evolution*, **299**, 785–791.
- Ortega-Baes P., Godínez-Alvarez H., Sajama J., Gorostiague P., Sührling S., Galíndez G., Bravo S., López-Spahr D., Alonso-Pedano M., Lindow-López L., Barrionuevo A., Sosa C., Curti R.N., Juárez A. (2015) La familia Cactaceae en Argentina: patrones de diversidad y prioridades políticas para su conservación. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, **50**, 71-78.
- Oriani A., Scatena V.L. (2012) Floral anatomy of *Xyrids* (Poales): Contributions to their reproductive biology, taxonomy, and phylogeny. *International Journal of Plant Science*, **173**, 767-779.
- Pacini E. (2000) From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Systematics and Evolution*, **222**, 19–43.
- Pacini E., Franchi G.G. (1998) Pollen dispersal units, gynoecium and pollination. In: Owens S.J., Rudall P.J. (eds.) *Reproductive Biology*. The Royal Botanic Gardens, Kew, pp 183-195.
- Pacini E., Franchi G.G. (1999) Types of pollen dispersal units and pollen competition. In: Clément C., Pacini E., Audran J.C. (eds.) *Anther and Pollen. From Biology to Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 1-11.
- Pacini E., Nepi M., Vesprini J.L. (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 7-21.
- Pacini E., Hesse M. (2004) Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora*, **199**, 273–285.

- Pacini E., Hesse M. (2005) Pollenkitt – its composition, forms and functions. *Flora*, **200**, 399-415.
- Pimienta-Barrios E., del Castillo R.F. (2002) Reproductive biology. In *Cacti biology and uses*, P. S. Nobel (ed.). University of California Press, Berkeley, CA, pp 75-183.
- Porsch O. (1938) Das bestäubungsleben der kakeenblüte. I. Cactaceae. *Jahrbuch Deutsch. Kacteen-Gesellschaft*, pp 1-80.
- Radice S., Galati B. (2003) Floral nectary ultrastructure of *Prunus persica* (L.) Batch cv. Forastero (Newcomer), an Argentine peach. *Plant Systematics and Evolution*, **238**, 23-32.
- Rangan T.S., Rangaswamy N.S., (1999) Nucellus: a unique embryologic system. *Phytomorphology*, **49**, 337–376.
- Rauh W. (1979) *Kakteen an ihren Standorten*. Berlin, Hamburg, Parey.
- Rausher M. D. (2008) Evolutionary Transitions in Floral Color. *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 7–21.
- Razem F.A., Davis A.R. (1999) Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. *Protoplasma*, **206**, 57-72.
- Ren Y.Q., Deng G.Y., Li X.P., Marczewski T., Ma Y.P. (2018) Secondary pollen presentation on anther hairs enhances reproductive fitness in *Brandisia hancei*, a protogynous perennial with autonomous selfing. *Plant Ecology & Diversity*, **11**, 373-381.
- Rivera-Marchand B., Ackerman J.D. (2006). Bat Pollination Breakdown in the Caribbean Columnar Cactus *Pilosocereus royenii*. *Biotropica*, **38**, 635–642.
- Ritz C., Martins L., Mecklenburg R., Goremykin V., Hellwig F. (2007) The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *American Journal of Botany*, **94**, 1321-1332.
- Ronse De Craene L.P. (2007) Are petals sterile stamens or bracts? The origin and evolution of petals in the core eudicots. *Annals of Botany*, **100**, 621-630.

- Ronse De Craene L.P. (2008) Homology and evolution of petals in the core eudicots. *Systematic Botany*, **33**, 301-325.
- Ronse De Craene L.P. (2010) *Floral diagrams: an aid to understanding flower morphology and evolution*. Cambridge University Press.
- Ronse De Craene L.P. (2013) Reevaluation of the perianth and androecium in Caryophyllales: implications for flower evolution. *Plant Systematic Evolution*, **299**, 1599-1636.
- Rosas-Guerrero V., Aguilar R., Martén-Rodríguez S., Ashworth L., Lopezaraiza-Mikel M., Bastida J.M., Quesada M. (2015) A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters*, **17**, 388-400.
- Rose M.J., Barthlott W. (1994) Coloured pollen in Cactaceae: a mimetic adaptation to hummingbird- pollination? *Botanica Acta*, **107**, 402-406.
- Rose M.J., Barthlott W. (1995) Pollen-connecting threads in *Heliconia* (Heliconiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **195**, 61–65.
- Ross R. (1981) Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany*, **68**, 463-470.
- Ross R. (1982) Initiation of stamens, carpels and receptacle in the Cactaceae. *American Journal of Botany*, **69**, 369-379.
- Rowley G. (1980) Pollination Syndromes and Cactus Taxonomy. *The Cactus and Succulent Journal of Great Britain*, **42**, 95-98.
- Saleme Aona L.Y., Machado M., Pansarin E.R., Cardoso de Castro C., Zappi D., do Amaral M.C. (2006) Pollination biology of three Brazilian species of *Micranthocereus* Backeb. (Cereeae, Cactoideae) endemic to the “campos rupestres”. *Bradleya*, **24**, 39–52.
- Schlindwein C., Wittmann D. (1997) Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Plant Systematics and Evolution*, **204**, 179-193.
- Schlumpberger B.O., Badano E.I. (2005) Diversity of floral visitors to *Echinopsis atacamensis* subsp. *pasacana* (Cactaceae). *Haseltonia*, **11**, 18-26.

- Schlumpberger B.O., Renner S.S. (2012) Molecular phylogenetics of *Echinopsis* (Cactaceae): polyphyly at all levels and convergent evolution of pollination modes and growth forms. *American Journal of Botany*, **99**, 1335-1349.
- Schniewind-Thies J. (1897) Beiträge zur Kenntnis der Septal nectarien. Gustav Fischer, Jena, pp 12.
- Scobell S.A., Scott P.E. (2002) Visitors and floral traits of a hummingbird-adapted cactus (*Echinocereus coccineus*) show only minor variation along an elevational gradient. *The American Midland Naturalist*, **147**, 1–15.
- Sedgley M., Buttrose M.S. (1978) Structure of the stigma and style of the avocado. *Australian Journal of Botany*, **26**, 663-682.
- Silva M.J.A. (2007) Embriología de *Opuntia robusta* Wedland (Cactaceae). Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. México, DF.
- Silva W.S., Sazima M. (1995) Hawkmoth pollination in *Cereus peruvians*, a columnar cactus from southeastern Brazil. *Flora*, **190**, 339-343.
- Smets E.F., Decraene L.P.R., Caris P., Rudall P.J. (2000) Floral nectaries in monocotyledons: distribution and evolution. In: Wilson K.L., Morrison D.A. (Eds), *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia, pp 230–240.
- Sokoloff D.D., Remizowa M.V., Timonin A.C., Oskolski A.A., Nuraliev M.S. (2018) Types of organ fusion in angiosperm flowers (with examples from Chloranthaceae, Araliaceae and monocots). *Biologia Serbica*, **40**, 16-46.
- Solís S.M., Ferrucci M.S. (2009) The floral nectary of *Cardiospermum grandiflorum* and *Urvillea chacoensis* (Sapindaceae): morpho-anatomy and ontogeny. *Annales Botanici Fennici*, **46**, 485-495.
- Solís, S.M.; Zini L.M., González V.V., Ferrucci M.S. (2017) Floral nectaries in Sapindaceae s.s.: morphological and structural diversity, and their systematic implications. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-017-1108-x

- Soltis D.E., Fishbein M., Kuzoff R.K. (2003) Reevaluating the evolution of epigyny: data from phylogenetics and floral ontogeny. *International Journal of Plant Science*, **164**, 251–264.
- Soltis D., Soltis P., Endress P., Chase M.W., Manchester S., Judd W., Majure L., Mavrodiev E. (2018) *Phylogeny and Evolution of the Angiosperms: Revised and Updated Edition*. Chicago: University of Chicago Press.
- Stefano M., Papini A., Andaló C., Brighigna L. (2001) Ultrastructural aspects of the hypanthial epithelium of *Selenicereus grandiflorus* (L.) Britton & Rose (Cactaceae). *Flora*, **195**, 194-203.
- Stiles F.G. (1981) Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **68**, 323–351.
- Strittmatter L., Negrón-Ortiz V., Hickey R.J. (2002) Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany* **89**, 1373–1387.
- Suaza-Gaviria V., Pabón-Mora N., González F. (2016) Development and Morphology of flowers in Loranthaceae. *International Journal of Plant Science*, DOI: 10.1086/687280
- Tel-Zur, N., Abbo, S., Bar-Zvi, D., Mizrahi, Y., 2005. Cytogenetics of semi-fertile triploid and aneuploid intergeneric vine cacti hybrids. *Journal of Heredity*, **96**, 124–131.
- Terrazas T., Arias S. (2002) Comparative stem anatomy in the subfamily Cactoideae. *The Botanical Review*, **68**, 444-473.
- Terrazas T., Mauseth D.J. (2002) Shoot anatomy and morphology. En Nobel P. (ed) *Cacti: Biology and Uses*. California University Press. Los Angeles, pp 23-40.
- Tiagi D.Y. (1955) Studies in floral morphology II. Vascular anatomy of the flower of certain species of the Cactaceae. *Journal of the Indian Botanical Society*, **34**, 408-428.
- Till, H. (2001) Neuordnung der Gattung *Gymnocalycium*. *Gymnocalycium*, **14**, 385-404.

- Tölke E.D., Bachelier J.B, Lima E.A., Galetto L., Demarco D., Carmello-Guerreiro S.M. (2018) Diversity of floral nectary secretions and structure, and implications for their evolution in Anacardiaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **187**, 209–231.
- Valiente-Banuet A., del Corro Arizmendi M., Rojas-Martinez A., Domingez-Canseco L. (1996) Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, **12**, 103-119.
- van der Pijl L. (1961) Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution*, **15**, 44-59.
- Vogel S. (1990) The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores. Washington: Smithsonian Institution Libraries (Translated by S.S. Renner).
- Vranks S., Brys R., Hoffmann M., Jacquemyn H. (2014) Secondary pollen presentation and the temporal dynamics of stylar hair retraction and style elongation in *Campanula trachelium* (Campanulaceae). *Plant Biology*, **16**, 669–676.
- Wallace, R.S. (1995a) A family-wide phylogeny, subfamilial and tribal relationships, and suggestions for taxonomic realignments. *IOS Bulletin*, **6**, 13.
- Wallace R.S. (1995) Molecular systematic study of the Cactaceae: Using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya*, **13**, 1-12.
- Wallace R.S., Cota J.H. (1996) An intron loss in the chloroplast gene *rpo C1* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae. *Current Genetics*, **29**, 275-281.
- Wallace R.S., Dickie S.L. (2002) Systematic implication of chloroplast DNA sequence variation in subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Succulent Plant Research*, **6**, 9-24.
- Walter H.E. (2010) Floral biology of *Echinopsis chiloensis* ssp. *chiloensis* (Cactaceae): evidence for a mixed pollination syndrome. *Flora*, **205**, 757-763.

- Wang H., Yu W.B., Chen J.Q., Blackmore S. (2009) Pollen morphology in relation to floral types and pollination syndromes in *Pedicularis* (Orobanchaceae). *Plant Systematics and Evolution*, **277**, 153–162.
- Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M., Ollerton J. (1996) Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, **77**, 1043-1060.
- Weberling F. (1992) Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press
- Wist T.J., Davis A.R. (2006) Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany*, **97**, 177-193.
- Yeo P. (1993) Secondary Pollen Presentation. Form, Function and Evolution. *Plant Systematics and Evolution*, **6**, 1-268.
- Young B.A, Sherwood R.T., Bashaw E.C. (1979) Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixes in grasses. *Canadian Journal of Botany*, **57**, 1668-1672.
- 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.
- Zimmermann J. (1932) Über die extrafloralen nektarien der Angiospermen. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*, **49**, 99–196.
- Zarlavsky G.E. (2014) Histología Vegetal: Técnicas simples y complejas. Sociedad Argentina de Botánica. Buenos Aires, Argentina.
- Zini L.M., Solís S.M., Ferrucci M.S. (2014) Anatomical and developmental studies on floral nectaries in *Cardiospermum* species: an approach to the evolutionary trend in Paullinieae. *Plant Systematics and Evolution*, **300**, 1515-1523.