

## Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies *Echeveria* en condiciones de invernadero\*

### Pollen viability, stigma receptivity and pollination type in five *Echeveria* species under greenhouse conditions

Teresa J. Rodríguez-Rojas<sup>1</sup>, María Andrade-Rodríguez<sup>1§</sup>, Jaime Canul-Ku<sup>2</sup>, Antonio Castillo-Gutiérrez<sup>1</sup>, Edgar Martínez-Fernández<sup>1</sup> y Dagoberto Guillén-Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001. 62209. Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. Tel: 01 777 3 70 29 46. (tererodrojas@hotmail.com; mariamaria.andrade65@gmail.com; acastillo-g@hotmail.com; edgar@uaem.mx; dagoguillen@yahoo.com). <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Carretera Zacatepec-Galeana, km 0.5. 62780. Colonia Centro, Zacatepec, Morelos, México. (canul.jaime@inifap.gob.mx). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: andradem65@hotmail.com.

#### Resumen

*Echeveria*, género representativo de *Crassulaceae* por representar 97% de especies endémicas; sus plantas tienen características morfológicas atractivas para la horticultura ornamental. El conocimiento de las características reproductivas es útil para el mejoramiento genético, necesario para ser utilizado en las polinizaciones y aumentar la posibilidad de éxito de la fecundación. El objetivo fue conocer la viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización de cinco especies de *Echeveria*, con fines de mejoramiento genético. El trabajo se realizó de 2011 a 2013, en Cuernavaca, Morelos. Se usaron cinco especies *E. agavoides*, *E. elegans*, *E. runyonii*, *E. pumila*, *E. perle*. La viabilidad de polen se determinó mediante el método de tinción con ácido acético-carmín. La receptividad del estigma se evaluó con el método de Osborn; la evaluación fue a las 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, y 18:00 h. Para tipo de polinización se realizaron cuatro modalidades: 1) autopolinización; 2) emasculación y cubrir flores; 3) polinización cruzada intra específica; y 4) polinización cruzada inter específica; se evaluó amarre de fruto y viabilidad de semillas. *E. agavoides* tuvo mayor porcentaje de polen viable (72.7%). La mayor receptividad se tuvo de 12:00 a 14:00 h (94.6 a 98%). En las cuatro modalidades de polinización se obtuvo 100% de

#### Abstract

*Echeveria*, is a representative genus from *Crassulaceae* to represent 97% of endemic genus; its plants have attractive morphological characteristics for ornamental horticulture. Knowledge of reproductive characteristics are useful for genetic improvement, necessary to be used in pollination and increase the chance of successful fertilization. The objective was to determine pollen viability, stigma receptivity and pollination type of five species of *Echeveria*, for breeding purposes. The work was done from 2011 to 2013, in Cuernavaca, Morelos. Five species *E. agavoides*, *E. elegans*, *E. runyonii*, *E. pumila*, *E. perle* were used. Pollen viability was determined by staining with carmine acetic acid. Stigma receptivity was assessed with the Osborn method; assessment was at 8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, and 18:00 h. For pollination type four modes were performed: 1) self-pollination; 2) emasculating and cover flowers; 3) intra-specific cross-pollination; and 4) inter-specific cross-pollination; fruit set and seed viability was evaluated. *E. agavoides* had higher percentage of viable pollen (72.7%). Greater receptivity was from 12:00 to 14:00 hrs (94.6 to 98%). In the four modes of pollination 100% of fruit set was obtained; there was only viable seeds in fruits of intra-specific cross pollination (12.3%) and inter-specific cross

\* Recibido: septiembre de 2014  
Aceptado: enero de 2015

amarre de fruto; solo hubo semilla viable en los frutos de polinización cruzada intra-específica (12.3%) y polinización cruzada inter-específica (11.3 a 12.3%). La polinización de las especies estudiadas fue cruzada. *E. perle* y *E. runyonii* no pueden fungir como hembras por no formar semillas viables.

**Palabras clave:** *Echeveria* spp., polinización cruzada, reproducción generativa, viabilidad de semillas.

## Introducción

La familia *Crassulaceae* es la más representativa de México, debido al alto endemismo de la mayoría de sus especies, su significado histórico-cultural, y por el papel que desempeñan en la estructura y función de los ecosistemas áridos del país (Toledo, 1988). Los géneros de mayor importancia son *Sedum*, *Echeveria*, *Villadia* y *Dudleya*, porque tienen mayor número de especies, y varias especies son endémicas de México. *Echeveria* cuenta con 127 especies, de las cuales 97.1% son endémicas (Thiede, 1995).

La *Echeveria* son plantas perenes, suculentas, glabras a hirsutas, fibrosa o tuberosas, compactas o difusas, con hojas en forma de roseta, submembranosas a muy suculentas, usualmente lanceoladas o oblanceoladas, inflorescencias con numerosas flores, las cuales varían de cilíndricas a pentagonales, con 5 pétalos de varios colores que van desde el blanco, amarillo, anaranjado, y rojo (Eggli, 2003).

Conocer aspectos de la biología reproductiva es el primer paso para el mejoramiento genético clásico, basado en la selección de individuos superiores y cruzamientos dirigidos. Poco se conoce de la biología reproductiva de estas especies; estos conocimientos son indispensables para ser utilizados en las polinizaciones, y poder aumentar la posibilidad de éxito de la fecundación. Algunos de estos aspectos son la viabilidad del polen (Nyffeler, 1992), la receptividad del estigma (Shivanna y Sawhney, 1997), y el tipo de polinización, ya que de estos depende una reproducción exitosa (Márquez *et al.*, 2013).

La viabilidad del polen es una medida de la fertilidad masculina (Kearns e Inouye, 1993), el polen viable es fundamental para el proceso de reproducción, por tanto, la evaluación de la fertilidad del polen es esencial (Nyffeler, 1992); en general la longevidad del polen puede ser afectada por la temperatura y la humedad relativa (Shivanna *et al.*, 1997); en muchos híbridos el polen puede ser encogido o contraído y no viable (Kearns e Inouye, 1993).

pollination (11.3 to 12.3%). The pollination of the species studied were crossed *E. perle* and *E. runyonii* can not serve as females by not forming viable seeds.

**Keywords:** *Echeveria* spp., cross-pollination, generative reproduction, seed viability.

## Introduction

The *Crassulaceae* family is the most representative of Mexico due to high endemism of the majority of their species, their historical and cultural significance and the role they play in the structure and function of arid ecosystems of the country (Toledo, 1988). The most important genus are *Sedum*, *Echeveria*, *Villadia* and *Dudleya*, because they have more species, and several species are endemic to Mexico. *Echeveria* has 127 species, of which 97.1% are endemic (Thiede, 1995).

*Echeveria* are perennial plants, succulent, glabrous to hirsute, fibrous or tuberos, compact or diffuse, with leaves rosette shaped, very succulent, usually lanceolate or oblanceolate, inflorescences with numerous flowers, which vary from cylindrical to pentagonal, with 5 petals of various colors ranging from white, yellow, orange, and red (Eggli, 2003).

Knowing aspects of reproductive biology is the first step to classical breeding, based on the selection of superior individuals and controlled crosses. Little is known of the reproductive biology of these species; this knowledge are essential to be used in pollinations, and to increase the chance of successful fertilization. Some of these aspects are pollen viability (Nyffeler, 1992), stigma receptivity (Shivanna and Sawhney, 1997), and pollination type, since these depend on successful reproduction (Márquez *et al.*, 2013).

Pollen viability is a measure of male fertility (Kearns and Inouye, 1993), viable pollen is critical to the process of reproduction, therefore, the evaluation of pollen fertility is essential (Nyffeler, 1992); overall pollen longevity can be affected by temperature and relative humidity (Shivanna *et al.*, 1997); in many hybrids, pollen can be shrunk or contracted and non-viable (Kearns and Inouye, 1993).

Stigma receptivity is the ability to receive pollen, allowing it to adhere, hydrate and germinate (Shivanna *et al.*, 1997). This can be determined by evaluating the presence of peroxidase enzymes (Kearns and Inouye, 1993).

La receptividad del estigma es la capacidad para recibir el polen, permitir que se adhiera, se hidrate y germine (Shivanna *et al.*, 1997). Esto puede determinarse mediante la evaluación de la presencia de enzimas peroxidasas (Kearns e Inouye, 1993).

La polinización consiste en la transferencia de polen desde los órganos sexuales masculinos a los órganos sexuales femeninos; a pesar de su aparente simplicidad, la incapacidad de las plantas para mover sus gametos por sí mismas ha propiciado su evolución mediante diferentes adaptaciones; es decir, diferentes tipos de polinización (Márquez *et al.*, 2013), como polinización autógena, y polinización alogama.

Para que el proceso de la polinización ocurra, la transferencia del polen al estigma debe suceder durante el periodo en que el estigma se encuentre receptivo, en caso contrario, el polen no puede adherirse y no puede germinar (Kearns e Inouye, 1993).

Para que la polinización autógena ocurra debe haber compatibilidad del polen, esto garantiza que se fertilice cada óvulo; la autoincompatibilidad evita la producción de semillas por autopolinización (autógena), esto se debe a que el polen que se adhiere al estigma no germina, y es incapaz de penetrar o crecer por el estilo (Kearns e Inouye, 1993).

La emasculación de todas las flores en plantas multiflorales puede demostrar si la polinización alogama ocurre, ya sea intra o inter específica, si se produce semilla debe ser de polinización cruzada a menos que ocurra apomixis (Kearns e Inouye, 1993); es decir, que se produzcan semillas independientemente de la fecundación (Márquez *et al.*, 2013).

Charlesworth y Charlesworth (1987); Cruden (1976) sugieren que la autopolinización es muy común en las especies de la familia *Crassulaceae*, y que presentan autogamia facultativa. En contraste, Carque *et al.* (1996) observaron que las *Crassulaceae* tienen polinización anemófila, hidrófila (produciendo autopolinización), y entomófila (produciendo polinización cruzada). Izco *et al.* (1998) observó que en *Kalanchoe* la polinización es entomófila u ornitófila.

En muchos estudios la producción de semillas es suficiente como indicador de una polinización exitosa, pero debido a la gran importancia de la semilla es necesario confirmar su viabilidad, para esto la prueba definitiva es la germinación

Pollination is the transfer of pollen from male sexual organs to female sexual organs; despite its apparent simplicity, the inability of plants to move their gametes by themselves has led to its evolution through different adaptations; that is, different types of pollination (Márquez *et al.*, 2013) such as self-pollinating and allogamy pollination.

For the pollination process to occur, the transfer of pollen to the stigma must happen during the period in which the stigma is receptive, otherwise, pollen can not stick and can not germinate (Kearns and Inouye, 1993).

For self-pollination to occur there must be pollen compatibility, this ensures that each egg is fertilized; self-incompatibility prevents seed production by self-pollination (autogamy), this is because pollen adheres to stigma does not germinate and is unable to penetrate or grow through the style (Kearns and Inouye, 1993).

The emasculation of all flowers in multiflowered plants may show whether allogamous pollination occurs, either intra or inter specific, if seed is produced must be cross-pollination unless apomixis occurs (Kearns and Inouye, 1993); ie, seed is set independently of fertilization (Márquez *et al.*, 2013).

Charlesworth and Charlesworth (1987); Cruden (1976) suggest that self-pollination is very common in the species of *Crassulaceae* family, and show facultative autogamy. In contrast, Carque *et al.* (1996) observed that *Crassulaceae* have anemophilous, hydrophily (producing self pollination) and entomophilous (producing cross pollination). Izco *et al.* (1998) noted that pollination is entomophilous or ornithophilous in *Kalanchoe*.

In many studies the production of seeds is enough as indicator of successful pollination, but due to the great importance of the seed is necessary to confirm its viability, for this the final test is germination (Kearns and Inouye, 1993), since seeds contain recombined genes and on them depends the survival of germplasm (Espinosa-Osornio and Engleman 1998).

Therefore, the aim of this investigation was to study some aspects of the reproductive biology of five species of the genus *Echeveria*, determining pollen viability, timing of stigma receptivity and pollination type, with breeding purposes.

(Kearns e Inouye, 1993), ya que las semillas contienen los genes recombinados y de ellas depende la supervivencia del germoplasma (Espinosa-Osornio y Engleman, 1998).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de cinco especies del género *Echeveria*, determinando la viabilidad de polen, el momento de receptividad del estigma y tipo de polinización, con fines de mejoramiento genético.

## Materiales y métodos

La investigación se desarrolló de agosto de 2011 a septiembre de 2013, en un laboratorio de propagación vegetativa y en un invernadero cubierto con plástico lechoso uv 2, con ubicación geográfica de 18° 58' 54.71" latitud norte y 99° 13' 59.14" longitud oeste, y 1 876 msnm, en Cuernavaca, Morelos. El clima es semicalido y subhúmedo, precipitación anual de 1 061 mm, temperatura media anual de 20 °C, (A) Ca(w1)(w)(i')gw'' (García, 1981).

El material genético estudiado fueron cinco especies del género *Echeveria* cultivadas en maceta: *E. agavoides* Lem., *E. elegans* Rose, *E. runyonii* topsy-turvy, *E. pumila* var. *glauca* x *E. walther*, *E. perle* von Nuremberg; obtenidas en viveros comerciales, éstas fueron seleccionadas por su porte, el color y forma de las hojas, la capacidad de producir hijuelos, ser algunas de las más comercializadas, así como por la coincidencia en época de floración (Figura 1).

### Viabilidad de polen

Para estudiar la viabilidad de polen se usaron tres plantas de cada especie, se colectaron tres flores por planta, y tres anteras por flor, antes de que ocurriera la anthesis, éstas se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, y a cada tubo se le agregó una solución Farmer (alcohol etílico absoluto, ácido acético glacial, 3:1), y se conservaron en refrigeración a 4 °C hasta su evaluación.

La viabilidad se evaluó mediante el método de tinción con ácido acético-carmín; cada antera se colocó sobre un portaobjetos, se cortó transversalmente con un bisturí, se agregó una gota de ácido acético-carmín y se aplastó con cuidado para que se liberará el polen en la gota de colorante; el portaobjetos se pasó ligeramente por la flama de un mechero, después se observaron los granos de polen

## Materials and methods

The research was conducted from August 2011 to September 2013, in a laboratory of vegetative propagation and in a greenhouse covered with milky plastic uv 2, with geographical location 18° 58' 54.71' north latitude and 99° 13' 59.14' west longitude, at 1 876 masl, in Cuernavaca, Morelos. The climate is temperate and semi humid, annual rainfall of 1 061 mm, mean annual temperature of 20 °C, (A)Ca(w1)(w)(i')gw'' (García, 1981).

The genetic material consisted of five species of the genus *Echeveria* grown in pots. *E. agavoides* Lem., *Rose E. elegans*, *topsy-turvy runyonii E.*, *E. pumila* var. *glauca* x *E. Walther*, *E. perle* von Nuremberg; obtained from commercial nurseries, they were chosen for their size, color and shape of leaves, the ability to produce tillers, be some of the most marketed and the coincidence in time of flowering (Figure 1).



**Figura 1. Especies de *Echeveria* estudiadas. A) *E. agavoides* Lem.; B) *E. elegans* Rose; C) *E. runyonii* topsy-turvy; D) Flores de *E. runyonii* topsy-turvy; E) *E. pumila* var. *glauca* x *E. walther*; F) *E. perle* von Nuremberg.**

**Figure 1. *Echeveria* species studied. A) *E. agavoides* Lem.; B) *E. elegans* Rose; C) *E. runyonii* topsy-turvy; D) Flowers of *E. runyonii* topsy-turvy; E) *E. pumila* var. *glauca* x *E. walther*; and F) *E. Perle* von Nuremberg.**

### Pollen viability

To study pollen viability three plants of each specie were used, three flowers per plant were collected, and three anthers per flower before anthesis occurred, these were placed in an eppendorf tube of 1.5 mL, and to each tube was added Farmer solution (absolute ethyl alcohol, glacial acetic acid, 3: 1) and kept refrigerated at 4 °C until evaluation.



al microscopio (40 x). Se realizó una preparación por cada antera, en cada preparación se observaron cuatro campos, los granos de polen fértiles se tiñeron de color rojo y los no viables sin coloración, y la variable fue el porcentaje de polen viable, además se observó la ornamentación de los granos de polen y se midieron con una regla para microscopio cuyas unidades de medición fueron las micras.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, se tuvieron cinco tratamientos (especies) con tres repeticiones (plantas) y se evaluaron nueve anteras por repetición.

### Receptividad del estigma

Se estudio la receptividad del estigma durante el transcurso del día (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, y 18:00 h), cuando la flor estaba en apertura floral; se empleó el método de Osborn *et al.* (1988), que se basa en la reacción de la enzima peroxidasa al colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 40% sobre los estigmas de las flores, la producción de burbujas indica que el estigma esta receptivo.

Este experimento se realizó en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 5 \* 6 (5 especies - 6 horarios); se usaron cinco repeticiones (plantas), en cada repetición se evaluaron tres flores por planta, así se estudiaron 15 flores por especie en cada horario. La variable de respuesta fue la receptividad o no receptividad del estigma.

### Tipo de polinización

Se realizaron cuatro modalidades de polinización para saber si las plantas de las cinco especies son autógamas, apomícticas, alógamas intra-específicas o alógamas inter-específicas. Las flores seleccionadas se cubrieron con agribon® después de aplicar el tratamiento de polinización correspondiente, se etiquetaron y se cuidaron hasta cosechar los frutos. Los tratamientos fueron: 1) polinización autógama, las flores en botón se cubrieron para evitar la llegada de polen externo y así se mantuvieron hasta el desarrollo de fruto; 2) apomixis, se emasclaron las flores antes de la antesis y se cubrieron para comprobar si desarrollan fruto; 3) polinización cruzada intra-específica, las flores se emasclaron antes de la antesis, se cubrieron y posteriormente se llevó polen de otra planta de la misma especie colocándolo en el estigma de las flores, éstas se cubrieron y se mantuvieron así hasta observar fruto; y 4) polinización cruzada inter-específica, las flores se emasclaron antes de la antesis y se cubrieron,

Viability was assessed using the staining method with carmine acetic acid; each anther was placed on a glass slide, cut transversely with a scalpel, a drop of carmine acetic acid was added and gently crushed to release pollen at the drop of dye; the slide is passed slightly by the flame of a burner, then pollen grains were observed under the microscope (40 x). Preparation for each anther was made, in each preparation four fields were observed, fertile pollen grains were stained red and nonviable without coloration, and the variable was the percentage of viable pollen, besides ornamentation of the pollen grains were observed and measured with a ruler for microscope whose measurements units were microns.

The experimental design was completely randomized, with five treatments (species) with three replications (plants) and nine anthers were evaluated by repetition.

### Stigma receptivity

Stigma receptivity during the course of the day (8:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00, and 18:00 h) was studied, when the flower was in anthesis; the Osborn method was used, Osborn *et al.* (1988), based on the reaction of the peroxidase enzyme by putting a drop of hydrogen peroxide at 40%, on the stigmas of the flowers, bubble production indicates that the stigma is receptive.

This experiment was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement of treatments 5 \* 6 (5 species - 6 hours); five replicates (plants), in each replication three flowers per plant were evaluated, thus 15 flowers per species were studied in each time. The response variable was receptivity or not receptivity of stigma.

### Types of pollination

Four modes of pollination were made to know if plants of the five species are self-pollinated, apomictic, intra-specific allogamy or inter-specific allogamy. Selected flowers were covered with agribon® after applying the corresponding pollination treatment, labeled and were looked after to reap. The treatments were: 1) self-pollinating, flower buds were covered to prevent the arrival of foreign pollen and so remained until the development of fruit; 2) apomixis, flowers were emasculated before anthesis and covered to check if develops fruit; 3) intra-specific cross-pollination, flowers were emasculated before anthesis, covered and subsequently pollen from another plant of the same species was applied by placing it on the stigma of the flower, these were covered

se aplicó polen de una planta de otra especie colocándolo en el estigma de las flores, éstas se cubrieron nuevamente hasta que ocurrió desarrollo de fruto.

El experimento fue desarrollado en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 5 \* 4 (5 especies - 4 modalidades de polinización), en cada tratamiento se tuvieron cinco repeticiones (plantas) por especie, con tres flores por planta. Se evaluó porcentaje de amarre de fruto y viabilidad de semillas.

Porcentaje de amarre de fruto. Se cosecharon los frutos desarrollados en cada una de las cuatro modalidades de polinización y se observó la presencia de semillas. Dado que se obtuvo 100% de amarre de fruto y no hubo varianza en cuanto a tratamientos, no se realizó el análisis estadístico de los datos.

Viabilidad de semillas. La presencia de semillas no es garantía de viabilidad, razón por la cual las semillas desarrolladas en cada uno de los cuatro tratamientos de polinización se pusieron a germinar *in vitro*, dado que son muy pequeñas (0.3 a 0.6 mm) para evaluar su viabilidad. Se usó el medio de cultivo WPM modificado por Parada y Villegas (2009), adicionando 5 ppm de AG<sub>3</sub>. Se contó el número de plántulas por frasco (repetición) y se obtuvo el porcentaje de germinación.

Los datos de los tres experimentos fueron estudiados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## Resultados y discusión

### Viabilidad de polen

Los granos de polen de las cinco especies midieron de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro, el polen maduro es esférico y tricolporado (cuenta con tres polos), se observó la misma forma de polen en las cinco especies estudiadas (Figura 2). Lo anterior fue similar a lo encontrado por Arreguín-Sánchez *et al.* (1990) quienes estudiaron la morfología del polen de los géneros *Echeveria*, *Sedum* y *Villadia*, y observaron que en los tres géneros los granos de polen son prolato-esférico y tricolporados; indican que en *Echeveria* el tamaño varió de 27 a 42  $\mu\text{m}$  y concluyen que los granos de polen de la familia *Crassulaceae* son homogéneos en su forma,

and remained so until observing fruit; and 4) inter-specific cross-pollination, flowers were emasculated before anthesis and covered, pollen from another plant species was applied by placing it on the stigma of the flowers, these were covered again until fruit development occurred.

The experiment was carried out in a completely randomized design with factorial arrangement of treatments 5 \* 4 (5 species - 4 modes of pollination), in each treatment there were five replicates (plants) by specie, with three flowers per plant. Percentage of fruit set and seed viability was evaluated.

Percentage of fruit set. The fruits developed on each of the four modes of pollination were harvested and the presence of seeds was observed. Since 100% of fruit set was obtained and there was no variance regarding the treatment, no statistical analysis of the data was performed.

Seed viability. The presence of seeds does not guarantee viability, reason why seeds developed in each of the four pollination treatments were germinated *in vitro*, since they are very small (0.3 to 0.6 mm) to assess their viability. Woody plant medium (WPM) modified by Parada and Villegas (2009), adding 5 ppm of AG<sub>3</sub> was used. The number of seedlings per bottle (replication) were counted and the percentage of germination was obtained.

Data from three experiments were evaluated through analysis of variance and mean comparison test (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

## Results and discussion

### Pollen viability

Pollen grains of the five species measured from 30 to 40 microns in diameter, mature pollen is spheroidal and tricolporate (has three poles), the same form of pollen was observed in all five species examined (Figure 2). This was similar to that found by Arreguín-Sánchez *et al.* (1990) who studied pollen morphology of the genus *Echeveria*, *Sedum* and *Villadia* and found that in all three genera the pollen grains are prolate-spheroid and tricolporate; indicate that in *Echeveria* the size ranged from 27 to 42 microns and conclude that pollen grains of the family *Crassulaceae* are homogeneous in shape, size and ornamentation. Similarly, other authors observed ornamentation of pollen grains of *Crassulaceae* and describe them as tricolporate (Huang, 1972). However, Karaer *et al.*

tamaño y ornamentación. De igual forma, otros autores observaron la ornamentación de los granos de polen de las *Crassulaceae* y los describen como tricolporados (Huang, 1972). Sin embargo, Karaer *et al.* (2010) reportan que las características de polen de tres especies *Crassulaceae*, *Sempervivum sosnowskyi*, *S. armenum* y *S. glabrifolium* fueron similares entre ellas, la forma fue sub oblonga a ovalada esferoidal y su tamaño varió de 3 a 23.2  $\mu\text{m}$ , mencionan que la forma del polen puede ser significativo en la distinción de especies. También Parnell (1991) evaluó el polen de 32 taxones del género *Sempervivum* y *Jovibarba* (*Crassulaceae*) y mencionan que ambos géneros tienen pequeños granos de polen (diámetro  $<30 \mu\text{m}$ ), pero con diferente ornamentación.



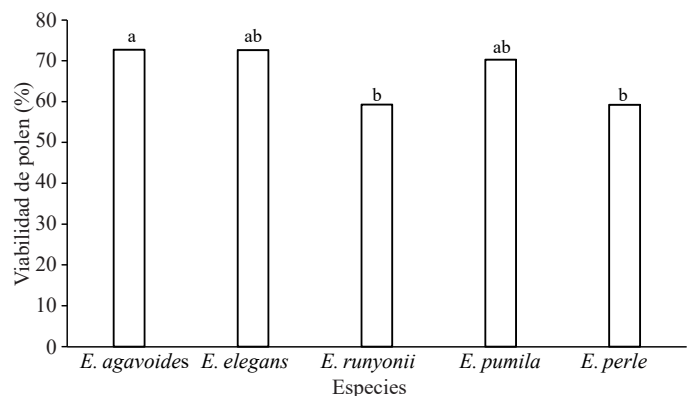
**Figura 2.** Características de polen de *Echeveria*. A: tamaño de granos de polen; y B: ornamentación de granos de polen de *E. elegans*.

**Figure 2.** Pollen characteristics of *Echeveria*. A: size of pollen grains; and B: ornamentation of pollen grains of *E. elegans*.

Los resultados en viabilidad de polen mostraron que existen diferencias estadísticas ( $p \leq 0.1$ ) entre especies, *E. agavoides* presentó mayor porcentaje de viabilidad de polen, en comparación con *E. runyonii* y *E. perle* que presentaron la menor cantidad de gametos masculinos fértiles (Figura 3). El bajo porcentaje de viabilidad en *E. runyonii* (59%) y *E. perle* (59.27%) puede deberse a su origen genético, *E. runyonii* proviene de una mutación con rayos gama de *Echeveria* Chalk Rose 'Lucita', realizada en California, E.U; *E. perle* es un híbrido inter-específico de *Echeveria gibbiflora* var. *metalica* por *E. potosina*, creada en Alemania (Sajeva y Constanzo, 1997; Anónimo, 2013), y de acuerdo con Uhl (1982), los granos de polen de los mutantes e híbridos interespecíficos son altamente estériles. La baja viabilidad de polen puede afectar la cantidad de semillas viables en los cruzamientos donde se usen como progenitores masculinos éstas dos especies de *Echeveria*.

(2010) reported that pollen characteristics of three species *Crassulaceae*, *Sempervivum sosnowskyi*, *S. armenum* and *S. glabrifolium* were similar to each other, sub oblong to oval spheroid shaped and its size ranged from 3 to 23.2 microns, mention that pollen shape can be significant in distinguishing species. Parnell (1991) also evaluated pollen from 32 taxons of the genus *Sempervivum* and *Jovibarba* (*Crassulaceae*) and mentioned that both genus have small pollen grains (diameter  $<30 \mu\text{m}$ ), but with different ornamentation.

The results from pollen viability showed that there are statistical differences ( $p \leq 0.1$ ) among species, *E. agavoides* showed higher percentage of pollen viability, compared to *E. perle* and *E. runyonii* who had the least amount of fertile male gametes (Figure 3). The low percentage of viability in *E. runyonii* (59%) and *E. perle* (59.27%) may be due to their genetic origin, *E. runyonii* comes from a mutation of gamma rays of *Echeveria* Chalk Rose 'Lucita', held in California, USA; *E. perle* is an inter-specific hybrid of *Echeveria gibbiflora* var. *metal* x *E. potosina*, created in Germany (Sajeva and Constanzo, 1997; Anonymous, 2013), and according to Uhl (1982), pollen grains of mutants and interspecific hybrids are highly sterile. The low viability of pollen can affect the amount of viable seeds in crosses where used as male parents these two species of *Echeveria*.



**Figura 3.** Viabilidad de polen en cinco especies de *Echeveria*. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3.** Pollen viability in five species of *Echeveria*. Values with the same letter are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

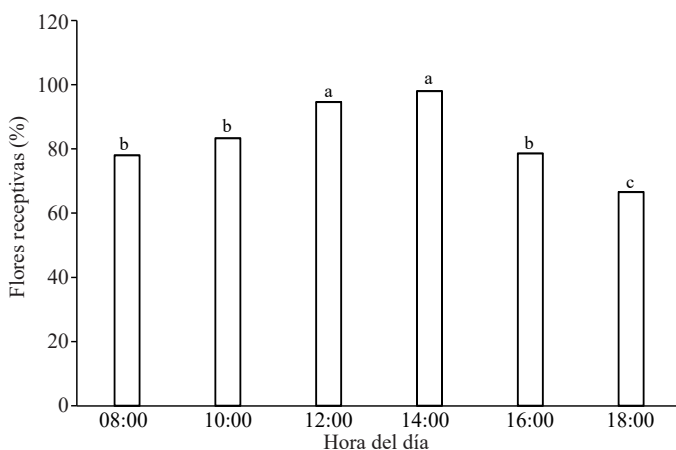
### Stigma receptivity

The analysis of variance showed no difference in stigma receptivity by effect of the species, as it was similar in the five species studied. However, this characteristic varied in function of time at which the evaluation was made, which had a highly significant effect ( $p \leq 0.01$ ); interaction among species and times of evaluation was not significant (Table 1).

## Receptividad del estigma

El análisis de varianza indicó que no hubo diferencias en receptividad del estigma por efecto de la especie, ya que ésta fue similar en las cinco especies estudiadas. Sin embargo, ésta característica sí varió en función del horario en que se hizo la evaluación, el cual tuvo efecto altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ); la interacción entre las especies y los horarios de evaluación no fue significativa (Cuadro 1).

El horario en que hubo mayor porcentaje de estigmas receptivos fue de 12:00 a 14:00 h; además, en estos horarios se observó que el burbujeo fue de mayor duración y las burbujas fueron más grandes, en comparación con las 8:00, 10:00 y 16:00 h, sin diferencias estadísticas entre ellos. A las 18:00 h hubo el menor porcentaje de estigmas receptivos, menor cantidad de burbujas y de menor duración (Figura 4 y 5). Esto concuerda con Consiglio y Bourne (2001), quienes mencionan que el calor puede servir para atraer a los insectos hacia una flor abierta a través de la volatilización del aroma floral durante la antesis, y también ayuda a mantener un período de máxima receptividad del estigma; lo cual explica porque hubo mayor receptividad estigmática entre las 12:00 y 14:00 h, debido a que fue el período en que se registró mayor temperatura ambiental (30 °C).



**Figura 4. Receptividad del estigma en flores de *Echeveria* en función de la hora del día.** Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

**Figure 4. Stigma receptivity in *Echeveria* flowers in function of time of the day.** Values with the same letter are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

En otras especies se ha observado que las flores pueden ser receptivas desde antes de abrir hasta el cierre de las mismas. Así, Parés *et al.* (2002) evaluaron la receptividad del estigma con la metodología de peróxido de hidrógeno en flores de

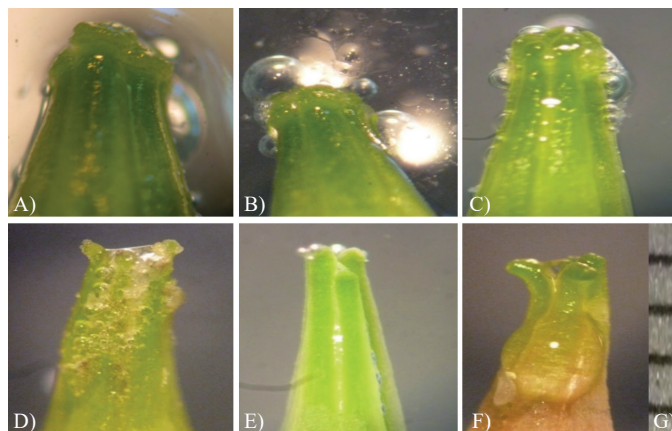
## Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia en receptividad estigmática de cinco especies de *Echeveria* en función de la especie y horario de evaluación.

**Table 1. Mean squares and significance in stigma receptivity of five species of *Echeveria* in function of the species and evaluation time.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculada
Especie	4	0.04 ns	7.78
Horario	5	2.89 **	
Especie*Horario	20	0.08 ns	
Error	240	0.07	
CV (%)		7.63	

\*\*= altamente significativo con  $p \leq 0.05$ ; ns= no significativo con  $p \leq 0.05$ ; CV= coeficiente de variación.

The time at which there was a greater percentage of receptive stigmas was from 12:00 to 14:00 h; besides, in these times, was observed that the bubbling was longer and the bubbles were larger, in comparison to 8:00, 10:00 and 16:00 h, no statistical difference among them. At 18:00 h there was the lowest percentage of receptive stigma, fewer and shorter bubbles (Figure 4 and 5). This is consistent with Consiglio and Bourne (2001), who mentioned that the heat may serve to attract insects towards an open flower through volatilization of floral aroma during anthesis, and also helps to maintain a maximum period of stigma receptivity; which explains why there was higher stigmatic receptivity between 12:00 and 14:00 h, because it was the period that recorded the highest environmental temperature (30 °C).



**Figura 5. Receptividad del estigma de *E. pumila* en seis horarios del día.** A) 8:00; B) 10:00; C) 12:00; D) 14:00; E) 16:00; F) 18:00 h; y G) escala = 3 mm.

**Figure 5. Stigma receptivity of *E. pumila* at six times of the day.** A) 8:00; B) 10.00 am; C) 12.00pm; D) 14:00; E) 16:00; F) 18:00; and G) scale = 3 mm.



*Caricapapaya* L. y observaron que la receptividad estigmática comenzó antes de la apertura floral. Sin embargo, Ángel-Coca *et al.* (2011) investigaron la receptividad estigmática en *Passiflora edulis* con el método de la enzima peroxidasa y obtuvieron resultados positivos desde la apertura floral hasta el cierre de la misma, en tanto que en la presente investigación la receptividad estigmática ocurrió en la apertura floral, y no se observó burbujeo antes del cierre de la flor.

Los resultados de esta investigación indican que las polinizaciones que se realicen entre las 12:00 y las 14:00 h tendrán mayor probabilidad de generar frutos y semillas, pues es cuando la mayoría de las flores abiertas están receptivas.

### Tipo de polinización

Amarre de fruto. Se observó que todas las flores evaluadas desarrollaron folículos después de realizar los tratamientos de polinización, por lo cual hubo 100% de amarre de fruto. El porcentaje obtenido en esta investigación fue similar al reportado por Jones *et al.* (2010) quienes mencionan que en *Dudleya multicaulis* (*Crassulaceae*) el amarre de frutos varió desde 86.9 hasta 94.4%, ellos reportan que el alto porcentaje de cuajado de frutos no está limitado por polinizadores; indican que *D. multicaulis* es capaz de auto-polinizarse en ausencia de vectores de polen; también Jimeno-Sevilla *et al.* (2014) reportan que el amarre de fruto es más alto en condiciones naturales que en condiciones controladas. Contrario a esto, Parra *et al.* (1993) reportan que en *E. gibbiflora* el amarre del fruto es de 35.5 a 56.6% en promedio, y mencionan que esto ocurrió aun cuando expusieron el polen al mismo tiempo en que los estigmas estuvieron receptivos.

El alto porcentaje de amarre de fruto no necesariamente indicó que se hallan desarrollado semillas viables; cabe destacar, que en los estudios citados no se evaluó la germinación de las semillas obtenidas para determinar si eran viables; de igual manera no reportan número de semillas por fruto ni el color de las mismas.

Viabilidad de semillas. En todos los frutos de las cinco especies de *Echeveria* se desarrollaron semillas y en promedio fueron 900; se observó que un mismo fruto hubo semillas café y semillas blancas. En los frutos generados por polinización cruzada intra-específica y polinización cruzada inter-específica hubo mayor cantidad de semillas café (600 y 900 respectivamente); por el contrario, en la polinización autógama y apomixis hubo mayor cantidad de semillas blancas (700 y 900 respectivamente). Con respecto a las

In other species has been found that the flowers may be receptive before opening to the closing thereof. So, Parés *et al.* (2002) evaluated stigma receptivity with the methodology of hydrogen peroxide in flowers of *Carica papaya* L. and found that stigma receptivity started before anthesis. However, Ángel-Coca *et al.* (2011) investigated stigmatic receptivity in *Passiflora edulis* with the method of peroxidase enzyme and obtained positive results from floral opening to the closing thereof, whereas in the present investigation the stigmatic receptivity occurred at floral opening and no bubbling was observed before the closing of the flower.

The results of this investigation indicate that pollinations carried out between 12:00 and 14:00 h will be more likely to bear fruit and seeds, as this is when most of the open flowers are receptive.

### Pollination types

Fruit set. It was observed that all flowers developed follicles after performing the pollination treatments, for which there was 100% fruit set. The percentage obtained in this study was similar to that reported by Jones *et al.* (2010) who mentioned that *Dudleya multicaulis* (*Crassulaceae*) fruit set ranged from 86.9 to 94.4%, they report that the high percentage of fruit set is not limited by pollinators; indicate that *D. multicaulis* is capable of self-pollinating in the absence of pollen vectors; also Jimeno-Sevilla *et al.* (2014) reported that fruit set is higher in natural conditions than in controlled conditions. Contrary to this, Parra *et al.* (1993) reported that in *E. gibbiflora*, fruit set is 35.5 to 56.6% on average, and mention that this occurred even when exposed pollen at the same time when stigmas were receptive.

The high percentage of fruit set not necessarily indicated that viable seeds were developed; noteworthy, that in studies cited, seed germination of the seed obtained to determine whether they were viable were not evaluated; likewise they do not report the number of seeds per pod or color thereof.

Seed viability. In all the fruits of the five species of *Echeveria*, seeds were developed and on average were 900; it was observed that the same fruit had brown seeds and white seeds. In fruits generated by intra-specific cross-pollination and interspecific cross-pollination there were as many brown seeds (600 and 900 respectively); by contrast, in self-pollination and apomixis there were as many white seeds (700 and 900 respectively). Regarding to the species,

especies, en *E. perle* y *E. runyonii* se observó que las semillas eran casi en su totalidad blancas independientemente del tipo de polinización. Con respecto a las semillas, la familia de plantas suculentas produce miles de semillas de color parduzco que son fértiles y semillas blancas que son infértiles o vanas, en cada inflorescencia estas semillas se encuentran dentro de los folículos y se pueden coleccionar antes de su maduración total.

El análisis de varianza indicó que la viabilidad de las semillas varió en función de la especie, tipo de polinización, así como por la interacción entre ambos, ya que los tres tuvieron efecto altamente significativo (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Cuadros medios y significancia en viabilidad de semillas por efecto de especie, y tipo de polinización.**

**Tables 2. Square means and significance in seed viability by effect of species and pollination type.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Viabilidad de semillas (%)
Especie	4	4.58**
Tipo de polinización	3	16.35**
Especie*tipo de polinización	12	5.66**
Error	40	0.036
CV (%)		21.9

\*\*= altamente significativo con  $p \leq 0.1$ . CV= coeficiente de variación.

Solo tres de las cinco especies estudiadas produjeron semillas viables (Cuadro 3), *E. runyonii* y *E. perle* tuvieron 0% de germinación de semillas, lo que indica que sus gametos no generaron descendencia fértil, por ser un mutante y un híbrido inter-específico respectivamente. Al respecto, Uhl (1982), indica que los gametos de los mutantes e híbridos inter-específicos son en su mayoría estériles.

**Cuadro 3. Germinación de semillas (%) en cinco especies de *Echeveria*, obtenida por efecto de cuatro modalidades de polinización.**

**Table 3. Seed germination (%) in five species of *Echeveria*, obtained by effect of four modes of pollination.**

Especie	Autógama	Apomixis	Cruza intraespecífica	Cruza interespecífica
<i>E. agavoides</i>	0 b	0 b	12.33 a	11.33 a
<i>E. elegans</i>	0 b	0 b	12.33 a	12.33 a
<i>E. runyonii</i>	0 b	0 b	0 b	0 b
<i>E. pumila</i>	0 b	0 b	12.33 a	0 b
<i>E. perle</i>	0 b	0 b	0 b	0 b

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

*E. perle* and *E. runyonii* was observed that seeds were white almost entirely independently of the pollination type. In regard to seeds, the family of succulent plants produce thousands of fertile brownish seed and infertile white seeds, in each inflorescence these seeds are within the follicles and can be collected before full maturation.

The analysis of variance indicated that seed viability varied in function of the species, pollination type, as well as the interaction between them, since all three were highly significant (Table 2).

Only three of the five species studied produced viable seeds (Table 3), *E. runyonii* and *E. perle* had 0% seed germination, indicating that their gametes did not generate fertile offspring, for being a mutant and a inter-specific hybrid respectively. In this regard, Uhl (1982), indicates that gametes of mutants and inter-specific hybrids are mostly sterile.

Moreover, it was observed that the seeds were viable in intra-specific allogamy and inter-specific allogamy; whereas, in the treatment of selfpollination and apomixis no seeds did not germinate, indicating no viability (Figure 6). This indicates that under greenhouse conditions was not possible self pollination and that there was no agamospermy. However, Charlesworth and Charlesworth (1987) and Cruden (1976), say that it is very common selfpollination in *Crassulaceae*, noteworthy that this research was carried out in open field.

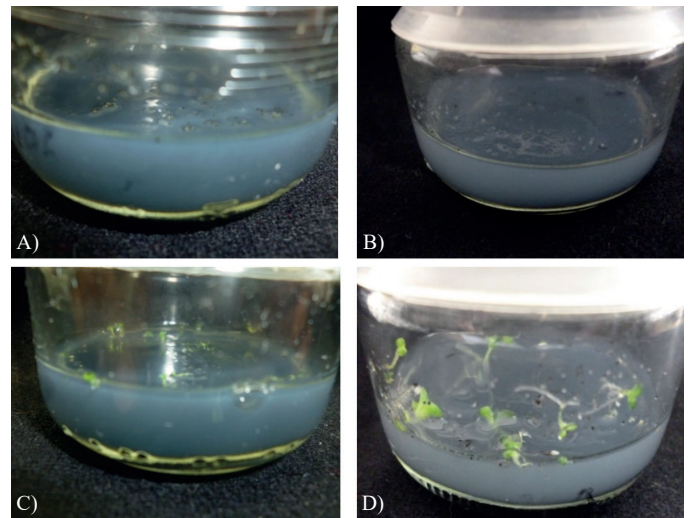
The interaction species and pollination type was highly significant, demonstrating that the type of pollination has a direct effect on the species; based on the latter, it is clear that there was synergy between *E. agavoides*, *E. elegans* and *E. pumila* with intra-specific allogamous pollination. Something similar happened with *E. agavoides* and *E. elegans* with interspecific allogamous pollination

Por otra parte, se observó que las semillas fueron viables en las polinizaciones alógama intra-específica y alógama inter-específica; en tanto que, en el tratamiento de autopolinización y posible apomixis no germinó ninguna semilla, indicando no viabilidad (Figura 6). Lo anterior indica que en condiciones de invernadero no fue posible la autofecundación y que no existió agamosperma. Sin embargo, Charlesworth y Charlesworth (1987) y Cruden (1976), dicen que es muy común la autofecundación en las *Crassulaceae*, cabe destacar que estas investigaciones se realizaron a cielo abierto.

La interacción especies y tipo de polinización resultó altamente significativa, lo que demuestra que el tipo de polinización tiene un efecto directo en las especies; con base en lo anterior, es claro que hubo sinergia entre *E. agavoides*, *E. elegans* y *E. pumila* con la polinización alógama intra-específica. Algo similar ocurrió con *E. agavoides* y *E. elegans* con la polinización alógama inter-específica (Cuadro 3). Lo anterior indicó que los gametos de diferentes plantas de la misma especie generaron descendencia fértil en tres de las cinco especies evaluadas. Los gametos de plantas de diferente especie formaron semilla viable sólo en el caso de *E. agavoides* y *E. elegans*; en tanto que, *E. runyonii* y *E. perle* no produjeron semilla viable, independientemente del tipo de polinización, lo anterior pudo deberse a que los óvulos son estériles o con baja fertilidad como ocurrió con su polen que tuvo 59 y 59.27% de viabilidad, respectivamente. La escasa fertilidad de los gametos, como ya se mencionó, se debe a que *E. runyonii* es una mutación generada por rayos gama y *E. perle* es un híbrido inter-específico; al respecto, Uhl (1982) señala que los gametos de los mutantes e híbridos inter-específicos son estériles en su mayoría. De igual forma, Wyatt (1981) menciona que los híbridos de *Sedum* no generan semillas viables cuando se realiza un cruzamiento artificial, como se realizó en la presente investigación.

La cantidad de semillas viables fue baja posiblemente porque la cantidad de polen depositado en los estigmas fue insuficiente. Es probable que estas especies generen mayor descendencia si se cultivan en un área abierta para los polinizadores, pues como señala Charlesworth y Charlesworth (1987), Cruden (1976), Carque *et al.* (1996), Izco *et al.* (1998) y Jimeno-Sevilla *et al.* (2013), la polinización de las *Crassulaceae* ocurre por insectos, aves, viento, y agua; la cantidad de polen disponible sería mayor. Al respecto, Parra-Tabla *et al.* (1998) indican que el amarre de semillas puede disminuir por efecto de la disponibilidad de polen, más aun cuando la polinización es manual.

(Table 3). This indicated that the gametes from different plants of the same species generated fertile offspring in three of the five species evaluated. Gametes from different plant species formed viable seed only in *E. agavoides* and *E. elegans*; whereas, *E. runyonii* and *E. perle* did not produce viable seed, regardless of the type of pollination, the above could be due to ovules are sterile or with low fertility as happened with its pollen, that had 59.0 and 59.27% viability, respectively. The scarce fertility of gametes, as already mentioned, is because *E. runyonii* is a mutation generated by gamma rays and *E. perle* is an inter-specific hybrid; in this regards, Uhl (1982) pointed out that gametes of mutants and inter-specific hybrids are mostly sterile. Similarly, Wyatt (1981) mentions that hybrids from *Sedum* do not generate viable seeds when artificial breeding is done, as was done in this research.



**Figura 6. Germinación *in vitro* de semillas de *Echeveria*, generadas en cuatro modalidades de polinización. A) polinización autógama; B) apomixis; C) polinización cruzada intra-específica; y D) polinización cruzada inter-específica.**

**Figure 6. Seed germination *in vitro* of *Echeveria*, generated in four modes of pollination. A) self-pollinating; B) apomixis; C) intra-specific cross-pollination; and D) interspecific cross-pollination.**

The amount of viable seeds was low possibly because the amount of pollen deposited on stigmas was insufficient. These species are likely to generate more offspring if grown in an open area for pollinators, as Charlesworth and Charlesworth (1987), Cruden (1976), Carque *et al.* (1996), Izco *et al.* (1998) and Jimeno-Sevilla *et al.* (2013), pollination of *Crassulaceae* occurs by insects, birds, wind, and water; the amount of pollen available would be greater.

Aunque se reporta que puede haber autopolinización (Charlesworth y Charlesworth, 1987 y Cruden, 1976), los resultados obtenidos indican que la polinización en *Echeveria* fue cruzada, lo cual concuerda con Izco *et al.* (1998); Jimeno-Sevilla *et al.* (2013); Jimeno-Sevilla *et al.* (2014).

También Rojas-Aréchiga y Batis (2001) mencionan que la baja viabilidad de semillas se puede deber a que el embrión no se encuentra totalmente desarrollado al momento de su dispersión, por lo que se necesita de un periodo de tiempo para completar su maduración; cabe señalar que en la presente investigación, la semilla fue cosechada cuando los folículos estaban abriendo y las semillas habían madurado. De igual manera, Rojas-Aréchiga *et al.* (1998) señalan que la baja germinación se puede deber a que las especies suculentas desarrollan diversos mecanismos de germinación para poder persistir en ambientes desérticos. Sin embargo, en esta investigación se aplicó AG<sub>3</sub> (5 ppm) porque en un primer ensayo de siembra no hubo germinación de semillas, lo cual evidencio presencia de algún tipo de inhibidor de la germinación.

Con los resultados anteriores se pudo conocer el tipo de polinización de las cinco especies de *Echeveria* estudiadas, para poder proponer un método de mejoramiento genético y poder generar nuevas variedades mediante hibridación, y poder introducir al comercio ornamental especies generadas en México.

## Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y las condiciones en que se llevó a cabo el estudio, se concluye que la viabilidad de polen de cinco especies de *Echeveria* varió de 59.2 a 72.7%. El momento de receptividad del estigma de las cinco especies de *Echeveria* ocurrió de las 12:00 a las 14:00 h. Solo los cruzamientos intra e inter específicos generaron semillas con capacidad germinativa; lo que indica que las *Echeverias* son de polinización cruzada. Las especies de *E. perle* y *E. runyonii* no fomaron semillas, por lo cual no pueden ser parte de un programa de mejoramiento genético, fungiendo como hembras.

In this regard, Parra-Tabla *et al.* (1998) indicate that fruit set can decrease by effect of pollen availability, even more when pollination is made by hand.

Although there are reports that there could be selfpollination (Charlesworth and Charlesworth, 1987 and Cruden, 1976), the results indicate that pollination in *Echeveria*, was crossed, which agrees with Izco *et al.* (1998); Jimeno-Sevilla *et al.* (2013); Jimeno-Sevilla *et al.* (2014).

Also Rojas-Arechiga and Batis (2001) mentioned that low seed viability can be due to the embryo is not fully developed at the time of their dispersion, so it needs a period of time to complete their maturation; should be noted that in the present investigation, the seed was harvested when the follicles were opened and the seeds were mature. Similarly, Rojas-Aréchiga *et al.* (1998) point out that the low germination may be due to succulent species develop various mechanisms of germination to persist in desert environments. However, in this study AG<sub>3</sub> (5 ppm) was applied, because in the first plating trial there was no seed germination, which evidenced the presence of some type of sprout inhibitor.

With the above results it was able to know the pollination type of five species of *Echeveria*, to be able to propose a breeding method and to generate new varieties through hybridization, and be able to introduce to the market ornamental species generated in Mexico.

## Conclusions

Based on the results obtained and the conditions under which the study was conducted, it is concluded that pollen viability from five species of *Echeveria* ranged from 59.2 to 72.7%. The timing of stigma receptivity of the five species of *Echeveria* occurred from 12:00 to 14:00 h. Only intra and inter-specific crosses generated seed with germination capability; indicating that *Echeverias* are cross pollination. Species of *E. perle* and *E. runyonii* did not produce seeds, so they can not be part of a breeding program, as females parents.

*End of the English version*





## Agradecimientos

El primer autor agradece a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo a través de la beca, y su valioso apoyo para la realización de los estudios de doctorado.

## Literatura citada

- Ángel-Coca, C.; Nates-Parra, G.; Ospina-Torres, R. y Melo, C. D. O. 2011. Biología floral y reproductiva de la gulupa *Passiflora edulis* Sims. *F. edulis*. *Caldasia* 33:433-451.
- Anónimo. 2013. Especies de *Crassulaceae*. <http://www.worlfieldguide.com>.
- Arreguín-Sánchez, M. L.; Palacios-Chávez, R. y Quiroz-García, D. L. 1990. Morfología de los granos de polen de los géneros *Echeveria*, *Sedum* y *Villadia* (*Crassulaceae*) del Valle de México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 3: 51-61.
- Carque, A. E.; Arco, A. M.; León, A. M. C. y Wilpret, T. W. 1996. Estudio seminal germinativo y de plántulas de la flora vascular endémica canaria. I. *Crassulaceae* (1ª parte). *Vieraea* 25:7-30.
- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Systematics* 18:237-268.
- Consiglio, T. K. and Bourne, G. R. 2001. Pollination and breeding system of a neotropical palm *Astrocaryum vulgare* in Guyana: a test of the predictability of syndromes. *J. Trop. Ecol* 17:577-592.
- Cruden, R. W. 1976. Pollen-ovule ration: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- Eggli, U. 2003. Illustrated Handbook of succulent Plants: *Crassulaceae*. Springer. Zürich Switzerland. 458 p.
- Espinosa-Osornio, G. y Engleman, E. M. 1998. Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Texcoco, Estado de México. 43 p.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarla a las condiciones de la República Mexicana): Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Instituto de Geografía. México, D. F. 246 p.
- Huang, T. C. 1972. Pollen flora of Taiwan National Taiwan University Botany Department Press. 276 p.
- Izco, J.; Barreno, E.; Brugués, M.; Costa, M. y Devesa, J. 1998. Botánica. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 781 p.
- Jimeno-Sevilla, H. D.; Hernández-Ramírez, A. M and Krömer, T. 2013. *Echeveria rosea* Lindley (*Crassulaceae*): a hummingbird-dependent succulent epiphyte. *Cactus and Succulent Journal*. 85:128-131.
- Jimeno-Sevilla, H.; Hernández-Ramírez, A. M.; Ornelas, J. F. and Marten-Rodríguez, S. 2014. Morphological and néctar traits in *Echeveria rosea* Lindley (*Crassulaceae*) linked to humminbird pollination in Central Veracruz, Mexico. *Haseltonia* 19:17-25.
- Jones, C. E.; Shropshire, F. M.; Allen, R. L.; and Atallah, Y. C. 2010. Pollination and reproduction in natural and mitigation populations of the many-stemmed *Dudleya*, *Dudleya multicaulis* (*Crassulaceae*). *California Botanical Society* 57:42-53.
- Karaer, F.; Celep, F. and Kutbay, H. G. 2010. Morphological, ecological and palynological studies on *Sempervivum sosnowskyi* Ter-Chatsch. (*Crassulaceae*) with a new distribution record from Turkey. *Aust. J. Crop Sci.* 4:247-251.
- Kearns, C. A.; and Inouye, D. W. 1993. Techniques for pollination biologist. University press of Colorado. Niwot, Colorado. 583 p.
- Márquez, G. J.; Collazo, O. M.; Martínez, G. M.; Orozco, S. A. y Vázquez, S. S. 2013. Biología de angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F. 755 p.
- Nyffeler, R. 1992. A taxonomic revisión of the genus *Monanthes* (*Crassulaceae*). *Bradleya*. 10:49-82.
- Osborn, M.; Kevan, P. and Meredith, A. 1988. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (*Cactaceae*) in souther Colorado. *Plant. Syst. Evol.* 159:139-144.
- Parada, P. D. M. y Villegas, A. M. 2009. Propagación *in vitro* del híbrido almendro x durazno h1. *Rev. Fitotec. Mex.* 32:103-109.
- Parés, J.; Basso, C. y Jáuregui, D. 2002. Momento de antesis, dehiscencia de anteras y receptividad estigmática en flores de lechosa (*Carica papaya* L.) Cv. Cartagena Amarillas. *Bioagro* 14:17-24.
- Parnell, J. 1991. Pullen morphology of *Jovibarba* Opiz and *Sempervivum* L. (*Crassulaceae*). *Kew Bulletin*. 46:733-738.
- Parra, V.; Vargas, C. F. and Eguiarte, L. E. 1993. Reproductive biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora* (*Crassulaceae*). *Am. J. Bot.* 80:153-159.
- Parra-Tabla, V.; Vargas, C. F. and Eguiarte, L. E. 1998. Is *Echeveria gibbiflora* (*Crassulaceae*) fecundity limited by pollen availability? An experimental study. *Funcional Ecol.* 12:591-595.
- Rojas-Aréchiga, M.; Vázquez-Yanes, C. and Orozco-Segovia, A. 1998. Seed responses to temperatura of Mexican cacti species from two life forms: an ecophysiological interpretation. *Plant Ecol.* 135:207-241.
- Rojas-Aréchiga, M. y Batis, A. I. 2001. Las semillas de cactáceas... forman bancos en el suelo? *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 46:76-82.
- Sajeva, M.; and Constanzo, M. 1997. Succulents the illustrated dictionary. Ed. Timber Press. Portland, Oregon. 239 p.
- Shivanna, K. R. and Sawhney, V. K. 1997. Pollen biotechnology for crop production and improvement. 28-29 pp.
- Thiede, J. 1995. Quantitative phytogeography, species richness, and evolution of American *Crassulaceae*. In: evolution and systematics of the *Crassulaceae*, Henk't Harty Urs Eggli (Eds.). Backhuys, Leiden. 89-123 pp.
- Toledo, V. M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* 81:17-30.
- Uhl, C. H. 1982. The problem of ploidy in *Echeveria* (*Crassulaceae*): I diploidy in *E. ciliata*. *Am. J. Bot.* 62:843-854.
- Wyatt, R. 1981. Ant.- pollination of the granite outcrop Endemic *Diamorpha smallii* (*Crassulaceae*). *Am. J. Bot.* 68:1212-1217.