



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Micromorfología floral y embriología de un
supuesto híbrido dentro del género *Pinguicula*
(Lentibulariaceae, L. C. Richard).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

NORMA YVETTE CASTILLO SOSA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Castillo
Sosa
Norma Yvette
56 77 06 82
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
096238471

2. Datos del Tutor

Dra.
Sonia
Vázquez
Santana

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Sergio
Zamudio
Ruiz

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Silvia
Espinosa
Matías

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Rosenda Margarita
Ponce
Salazar

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
José Gonzalo
Ricardo
Wong

7. Datos del trabajo escrito

“Micromorfología floral y embriología de un supuesto híbrido dentro del género
Pinguicula (Lentibulariaceae, L. C. Richard)”
91pp
2007

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana, en el Laboratorio del Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, dentro del taller titulado “Biología del desarrollo y función de las estructuras reproductoras en cactáceas”, impartido por los profesores:

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Dra. Margarita Collazo Ortega

Dra. Sonia Vázquez Santana

Dra. Silvia Espinosa Matías

Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel

Dra. Ana Laura López Escamilla

Biol. Ana Patricia Olguín Santos

A mí mamá por enseñarme a ser fuerte en los momentos más difíciles.

A mí papá por enseñarme a ver la vida de una forma práctica.

A Yahalí por ayudarme a crecer como persona, me enorgullezco por ser tu hermana.

Gracias a ustedes por su cariño, apoyo, comprensión y principalmente...

iiiPor creer en mí!!!



AGRADEZCO

- ☞ A Dios por darme la oportunidad de vivir, por el libre albedrío para manejar mi vida, en donde el destino me ha demostrado que, siempre hay sorpresas gratas por las cuales vale la pena luchar.
 - ☞ A la Dra. Sonia Vázquez Santana por asesorarme a lo largo de la tesis y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente trabajo, por compartir su conocimiento e inspirar en mí una gran admiración.
 - ☞ A los integrantes del jurado revisor: Dr. Sergio Zamudio Ruiz, Dra. Silvia Espinosa Matías, M. en C. Rosenda Margarita Ponce y al M. en C. José Ricardo Wong, por sus valiosas observaciones y comentarios críticos a este trabajo.
 - ☞ A toda mi familia quienes con el paso del tiempo aprendieron a confiar en mí y a respetar mis decisiones. Es muy grato saber que cuento con su apoyo, cariño y comprensión. ¡¡ Los quiero mucho !!.
 - ☞ Especialmente a mis amigos quienes ocupan un lugar muy especial en mi corazón. Por todas las experiencias que compartimos y vivimos juntos a lo largo de estos años, ustedes saben lo importantes que son en mi vida y lo mucho que los quiero.
 - ☞ Ale, por ser mi hermanita clon y por brindarme una amistad incondicional basada en el cariño mutuo.
 - ☞ Elisa, tu hermosa amistad y la sinceridad de tus comentarios generalmente atinados.
 - ☞ Esther, por tu amistad, las experiencias de vida compartidas y por la paz interna que contagias.
 - ☞ Fabiola, las peleas, los momentos tristes y los que no lo fueron; por que nos permitieron afianzar nuestra amistad.
 - ☞ Julián, por quererme tal cual y por mostrarme las diferentes facetas que tiene una amistad.
 - ☞ Luis, el tenerte a mi lado en los eventos más importantes de mi vida. Gracias por se un gran amigo!!
 - ☞ Ma. Elena Mares, por ayudarme a enfrentar la complejidad de la vida.
 - ☞ Omar Fernando, por llegar a mi vida en el momento indicado. Te quiero mucho.
 - ☞ Oyuki, la amistad que hemos llevado y mantenido.
 - ☞ A mis queridos maestros y compañeros del Laboratorio de Desarrollo en Plantas, gracias por su amistad, ayuda y apoyo en el laboratorio.
 - ☞ Al M. en C. José Ricardo Wong, por sus múltiples asesorías durante el desarrollo de esta tesis, en cuanto al manejo de técnicas y equipo de laboratorio.
 - ☞ A la Dra. Silvia Espinosa Matías, por las imágenes al microscopio electrónico de barrido incluidas en este trabajo.
 - ☞ A los integrantes del Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias: Al M. en C. Alejandro Martínez Mena y Ana Isabel Bieler Antolín por la toma de fotografías que ilustran esta tesis.
-

Índice General

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
Biología de las plantas carnívoras	2
Mecanismos de captura	3
Hibridación en plantas	5
Barreras reproductivas a la hibridación	6
III. ANTECEDENTES	
Familia Lentibulariaceae	8
El género <i>Pinguicula</i> en México	9
Polinización en el género <i>Pinguicula</i>	11
Hibridación en el género <i>Pinguicula</i>	13
Estudios embriológicos en la familia Lentibulariaceae	14
Estudios embriológicos en el género <i>Pinguicula</i>	15
IV. OBJETIVOS	18
V. HIPOTESIS	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	
Especies estudiadas y sitios de colecta	
A. <i>Pinguicula debbertiana</i>	20
B. <i>Pinguicula ehlersiae</i>	20
C. <i>Pinguicula esseriana</i>	22
Colecta del material	23
Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	23
Técnicas histológicas	24
Otras técnicas	25
VII. RESULTADOS	
Morfología floral	28
Perianto	28
Paladar	34
Androceo	36
Gineceo	38
Desarrollo de la antera, microsporogénesis y microgametogénesis	41

Morfología de los granos de polen	45
Viabilidad de los granos de polen	45
Desarrollo del gineceo	47
Megasporogénesis	49
Germinación de los granos de polen dentro de las anteras	52
Polinizaciones manuales	52
Formación del haustorio antipodal, fecundación y desarrollo de la semilla ...	56
Endospermogénesis	57
Embriogénesis	60
VIII. DISCUSIÓN	64
IX. CONCLUSIONES	76
X. ANEXOS	77
XI. LITERATURA CONSULTADA	85

I. RESUMEN

México es considerado el principal centro moderno de diversificación del género *Pinguicula*, concentra casi el 50% de las especies existentes en el mundo, la mayoría de éstas son endémicas de México. El género *Pinguicula* comprende aproximadamente 84 especies de plantas herbáceas, perennes o anuales, de hábito terrestre o epífita; sus hojas se concentran en una roseta basal y están densamente cubiertas en el haz con tricomas glandulares que les permiten atrapar y digerir a sus presas. El objetivo de esta investigación fue demostrar si *Pinguicula esseriana* presenta características micromorfológicas florales constantes, así como evidencias embriológicas que ayuden a caracterizarla reproductivamente como un posible híbrido natural, resultado de la cruce entre *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana*. Se procesaron botones florales y flores en anthesis de cada uno de los taxa involucrados mediante técnicas histológicas convencionales y se analizaron por microscopía óptica, de fluorescencia y electrónica de barrido. Los resultados mostraron que los óvulos del posible híbrido natural *P. esseriana* siguen un desarrollo normal. Sin embargo, los granos de polen tuvieron un alto porcentaje de malformaciones. Los que llegan a formarse tienen baja viabilidad, por lo que hay una escasa producción de frutos y semillas. Básicamente la reproducción en *P. esseriana* fue asexual, por medio de las hojas de rosetas de invierno. También se encontraron anomalías en el desarrollo de los lóbulos de la corola, estigmas y anteras. Estas anomalías morfológicas y estructurales apoyan la hipótesis del posible origen híbrido de *P. esseriana*.

II. INTRODUCCIÓN

Biología de las plantas carnívoras

Las plantas de hábito carnívoro aparecen registradas por primera vez en la literatura botánica en el año de 1554, en un tratado sobre vegetación escrito por Dodonaeus y para el año de 1875 Darwin demuestra que la captura de presas incrementa el crecimiento y la producción de semillas (Lloyd, 1976; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997).

Las plantas carnívoras o insectívoras tienen estructuras para atrapar, digerir y asimilar a sus presas mediante modificaciones morfológicas y fisiológicas de las hojas. La habilidad de estas plantas para consumir tejidos animales depende del éxito de cada uno de los procesos que ocurren desde la llegada de la presa hasta su asimilación (Snyder, 1987; Albert *et al.*, 1992; Alcalá y Domínguez, 1997).

Es por esta razón que los atributos relacionados con la captura de presas, como la modificación de las hojas en complejas trampas y la maquinaria enzimática necesaria para digerir y asimilar a las presas, se han interpretado como adaptaciones y por lo tanto, como el resultado de la selección natural. Estas adaptaciones les proporcionan una fuente alterna de recursos minerales que les permiten la colonización de hábitats con suelos pobres en nutrientes, ácidos o tóxicos, que no son apropiados para otras especies de plantas (Cronquist, 1968; Slack, 1980; Snyder, 1987; Juniper *et al.*, 1989).

Las plantas carnívoras son herbáceas, perennes y de talla pequeña, se cree que estas características son el resultado de las exigencias ecológicas y fisiológicas que ha impuesto la evolución del hábito carnívoro. Estas adaptaciones han permitido una independencia relativa de los nutrimentos del suelo (en particular nitrógeno), pero también les ha generado demandas fotosintéticas muy altas (Pietropaolo y James, 1986; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997; Ellison y Gotelli, 2001). Estas demandas están asociadas con los altos costos en la producción de las trampas, glándulas y la síntesis de enzimas necesarias para la atracción, captura y digestión de las presas (Karlsson *et al.*, 1990; Alcalá y Domínguez, 1997).

En las angiospermas la carnivoría no es un fenómeno común, pero ha evolucionado en diferentes grupos como en las Poales (Bromeliaceae: *Brocchinia* y *Catopsis*), Oxalidales (Cephalotaceae: *Cephalotus*), Polygonales (Nepenthaceae: *Nepenthes*), Droseraceae (*Dionea* y *Drosera*), Ericales (Sarraceniaceae: *Sarracenia*, *Heliamphora* y *Darlingtonia*) y Lamiales (Lentibulariaceae: *Pinguicula*, *Utricularia* y *Gensilea*; Judd *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004).

Mecanismos de captura

Se cree que el hábito carnívoro en las plantas se originó a partir de la evolución de algunas características que en un principio tenían otra función. Por ejemplo, el mucílago y los tricomas glandulares en *Pinguicula* y *Drosera*, se propone que, pudieron aparecer como un mecanismo de defensa en contra de los herbívoros (Slack, 1980; Karlsson *et al.*, 1987; Snyder, 1987; Juniper *et al.*, 1989).

Los mecanismos de captura en las plantas se han dividido en dos sistemas, en función de la presencia o ausencia de movimientos en la planta que se asocian con la captura de sus presas (Slack, 1980; Pietropaolo y James, 1986; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997):

1. Sistemas pasivos: se caracterizan porque en la captura no involucran ningún tipo de respuesta directa de la planta a la presencia de la presa. En esta categoría se incluyen aquellos con trampas adhesivas o con hojas altamente modificadas. En las trampas adhesivas, los insectos quedan atrapados por el mucílago pegajoso que se produce en los tricomas de las hojas. Las presas son degradadas por enzimas digestivas producidas por otro tipo de tricomas. Este tipo de trampas se presenta en *Drosophyllum*, *Pinguicula* y *Drosera* (Lloyd, 1976; Slack, 1980; Pietropaolo y James, 1986; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997).

Existen mecanismos de captura en algunas especies como *Sarracenia* y *Nepenthes*, que se reconocen específicamente como de “encierro pasivo”. En estas especies las hojas se han modificado al grado que han formado verdaderos recipientes en forma de jarrones, los cuales

están recubiertos en su interior con cera y tricomas escamosos, permitiendo la entrada pero no la salida de los insectos que son atraídos con néctar; una vez adentro son degradados por enzimas digestivas.

2. *Sistemas activos*: son aquellos que presentan una respuesta que incluye el movimiento de la trampa ante la presa y que provocan la activación de captura y son reconocidos como sistemas con encierro activo o trampas de succión (Lloyd, 1976; Slack, 1980; Pietropaolo y James, 1986; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997; Heslop, 2004):

En las trampas de encierro activo de los géneros *Dionaea* y *Aldrovanda*, el mecanismo de captura les permite cerrar rápidamente sus trampas al ser estimuladas por el contacto con las presas.

Las trampas de succión consisten en una pequeña cavidad llamada utrículo, y al momento en que la presa toca los pelos táctiles localizados en esta cavidad, ésta se cierra y no permite la salida de la presa. Este sistema funciona manteniendo una diferencia de presiones entre el interior y el exterior de las trampas. Este tipo de captura se presenta únicamente en las especies del género *Utricularia*. Las especies con trampas activas como *Dionaea muscipula* (Norteamericana), disponen de unos pelos táctiles en sus hojas que al entrar en contacto con la presa disparan un mecanismo de captura haciendo que la hoja se cierre a modo de bisagra, quedando atrapado el insecto en su interior.

La digestión de las presas en las plantas carnívoras puede realizarse mediante enzimas producidas por la propia planta (digestión activa) o mediante bacterias o microorganismos asociados que descomponen las presas (digestión pasiva). Las presas suelen ser insectos o microorganismos, aunque ocasionalmente se han encontrado pequeños moluscos, reptiles, partes de aves o incluso ratones en trampas de *Sarracenia* y *Nepenthes*, si bien suelen ser capturas accidentales (Slack, 1980; Pietropaolo y James, 1986; Juniper *et al.*, 1989; Alcalá y Domínguez, 1997).

Hibridación en plantas

La hibridación es un evento biológico que ocurre con frecuencia de forma natural entre las plantas; siendo uno de los mecanismos capaces de generar innovaciones evolutivas y también juega un papel importante en la producción de nuevas taxa. Durante este proceso dos especies genéticamente distintas se cruzan y producen descendencia cuya fertilidad puede variar desde completamente fértil hasta completamente estéril (Grant, 1981; Abbot, 1992; Hughes y Harris, 1994; Rieseberg, 1995, 1997), o incluso no llevar a cabo la reproducción sexual y sustituirla por reproducción vegetativa o agamospermia. La fertilidad en los híbridos dependerá de la distancia genética que exista entre los taxa parentales (Niklas, 1997; Rieseberg, 1997). La esterilidad en los híbridos también puede deberse al inadecuado desarrollo y funcionamiento de las estructuras reproductoras y/o anomalías en el apareamiento y segregación de los cromosomas durante la meiosis (Jones, 1988; Lester y Kang, 1998; Kameyama *et al.*, 2005).

Algunas veces la hibridación es un evento que puede llevar a la introgresión, es decir a la incorporación de alelos de una especie o taxón híbrido con uno o los dos taxa parentales. Además, muchos híbridos naturales pueden presentar mayor adecuación que la de sus padres (Arnold y Hodges, 1995; Rhymer, 1996). Estas características de productividad y vitalidad excepcionales, muy superiores a las de sus progenitores se denominan vigor híbrido o heterosis. Cuando los híbridos se cruzan entre sí, el vigor híbrido puede transmitirse a la siguiente generación con la misma intensidad o bien aparecen características indeseables en la segunda generación (F₂). Estas características recesivas pueden estar enmascaradas en el genotipo, pero luego de la segregación y de la distribución independiente pueden aparecer en generaciones subsecuentes (Arnold y Hodges, 1995; Kameyama *et al.*, 2005).

La hibridación puede presentarse entre variedades de una misma especie, entre especies de un género e incluso aunque con menor frecuencia entre especies de dos géneros (Rieseberg, 1995 y 1997). Para que se realice este proceso, se necesita la acción de varios factores como la polinización cruzada, la floración sincrónica entre los taxa

parentales, que la distribución de ambos taxa se sobrelape, que compartan polinizadores, permitiendo una polinización entre ellos y que exista compatibilidad entre sí, para que el polen pueda germinar y lograr la fecundación (Ellstrand, 1999; Kameyama *et al.*, 2005).

El evento de hibridación puede desarrollar nuevas combinaciones de genes, que pueden ser favorables en algunas características con respecto a las que se encuentran en uno u otro de los parentales. Cuando esto ocurre, la hibridación ofrece una alternativa viable a otros atributos, como la resistencia a las enfermedades o climas extremos, capacidad para colonizar nuevos hábitats y el surgimiento de nuevas especies. El éxito en la generación de nuevas especies depende de las condiciones ecológicas, de la distancia genética de los taxa involucrados y de la capacidad que tengan los diversos genotipos híbridos para adaptarse a diversos hábitats; dichos fenotipos que nunca antes habían sido probados por la selección natural pueden generar diversos picos adaptativos (Barton y Hewitt, 1981; Rieseberg, 1997; Barton, 2001).

Barreras reproductivas a la hibridación

No todas las plantas son capaces de hibridar, ya que existen barreras fisiológicas y reproductivas entre la mayoría de las especies que viven en el mismo hábitat y que pueden evitar la formación de organismos híbridos.

De acuerdo con Rieseberg (1997) y Barton (2001) existen dos tipos de barreras a la hibridación, las precigóticas (antes de la fecundación) y las postcigóticas (después de la fecundación).

Barreras precigóticas:

- ❖ **Ecológicas** (hábitat): distribución no adecuada para que se presente hibridación entre dos posibles parentales.
- ❖ **Temporal:** que los posibles parentales tengan diferentes tiempos de floración, aún cuando se encuentren en poblaciones simpátricas.
- ❖ **Polinizadores:** que los polinizadores sean diferentes para cada taxón parental.
- ❖ **Mecánico** (fisiológico): que los sistemas de incompatibilidad sean tan efectivos que provocan que el polen de un progenitor sea rechazado en el pistilo del otro progenitor.

Barreras postcigóticas:

Aunque se lleve acabo la fecundación entre dos diferentes taxa parentales, posteriormente ocurre algún tipo de aborto o malformación. Estas barreras postcigóticas involucran un posible aborto temprano del cigoto, del embrión o del endospermo; malformaciones en la semilla o inviabilidad de éstas; incapacidad de las plántulas para establecerse; anomalías al momento de la formación de gametos en los híbridos, lo que les impide cruzarse con otros individuos de la generación híbrida o con sus progenitores.

A estas barreras también se les conoce como viabilidad híbrida reducida (producto de material genético incompatible), fertilidad híbrida reducida (cuando los descendientes son estériles) y ruptura híbrida, ya que a pesar de que los híbridos sean reproductivamente viables cuando éstos se cruzan con otros híbridos, sus descendientes son estériles (Grant, 1981; Jones, 1988; Burke y Arnold, 2001).

III. ANTECEDENTES

Familia Lentibulariaceae

Esta familia pertenece al orden Lamiales, y está integrada por los géneros *Utricularia*, *Genlisea* y *Pinguicula*, que suman más de 300 especies, tiene una distribución casi cosmopolita.

Son pequeñas plantas carnívoras, herbáceas, anuales o perennes que se encuentran en hábitats acuáticos, subacuáticos o terrestres. Su importancia radica en las sorprendentes estructuras que poseen para atrapar y digerir pequeños invertebrados como insectos, ácaros y crustáceos (Juniper *et al.*, 1989; Zamudio, 2001; Heslop, 2004). Sus miembros crecen tanto en las regiones templadas y tropicales, como en el círculo polar ártico (Gibson, 1974; Taylor, 1977; Juniper *et al.*, 1989).

Con base en análisis moleculares recientes sobre evolución de la carnivoría se ha establecido que las Lentibulariaceae es un grupo monofilético, siendo *Pinguicula* el grupo hermano del clado formado por *Utricularia* y *Genlisea* (Jobson y Albert, 2002; Jobson *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2004).

Actualmente el género *Utricularia* cuenta con aproximadamente 214 especies distribuidas en los subgéneros *Polypompholyx* y *Utricularia*, aunque la distribución de este género es cosmopolita, la mayoría de las especies se distribuye en regiones tropicales y subtropicales (Slack, 1980; Taylor, 1989; Jobson y Albert, 2002; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

El género *Gensilea* es el más pequeño en cuanto al número de especies y el menos conocido, cuenta con 21 especies ubicadas en los subgéneros *Tayloria* y *Gensilea*, su distribución se limita a Centro y Sudamérica, Cuba, África tropical y Madagascar (Jobson y Albert, 2002; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

El género *Pinguicula* comprende aproximadamente 84 especies de plantas herbáceas, perennes o anuales, de hábito terrestre o epífito; sus hojas se concentran en una

roseta basal y están densamente cubiertas en el haz con tricomas glandulares que les permiten atrapar y digerir a sus presas (Schnell, 1976; Alcalá y Domínguez, 1997; Zamudio, 2001). Casper (1966), divide al género *Pinguicula* en tres subgéneros: *Isoloba*, *Temnoceras* y *Pinguicula*. La palabra *Pinguicula* viene del latín *pinguis*, que significa grasa y el sufijo *ula*, que significa pequeño.

Cabe mencionar que a pesar de la presencia de los trabajos monográficos sobre *Utricularia* (Taylor, 1989) y *Pinguicula* (Casper, 1966), el interés por esta familia es reciente. Por lo que la información es escasa en temas relacionados con la biología de la polinización, el desarrollo floral, la genética, la biología molecular y embriología (Zamudio, 2001, 2005; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

Casper (1966) reconoció trece especies de *Pinguicula* para México y Centroamérica, sin embargo durante los últimos años el número de especies ha aumentado hasta llegar a cuarenta y cuatro taxa. Nuestro país también alberga diecinueve especies de *Utricularia* y una sola especie de *Gensilea* (Zamudio, 2001; Olvera y Martínez, 2002; Espinosa, 2005).

El género *Pinguicula* en México

Existen dos áreas de mayor diversidad del género *Pinguicula* en el mundo; una de ellas se encuentra alrededor del Mediterráneo en Europa, el área de mayor diversidad incluye a México, Centroamérica y las Antillas Mayores en América. Con 44 especies conocidas, México es el país que contiene mayor diversidad y es considerado el principal centro moderno de diversificación del género *Pinguicula*, ya que concentra cerca de la mitad de los taxa existentes en el mundo, la mayoría endémicos al territorio de este país (Zamudio, 1993, 2000, 2001, 2005; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

Se debe hacer hincapié en que una parte importante de las especies mexicanas pertenecientes a este género, no sólo son endémicas del territorio de la República, sino que poseen áreas de distribución extraordinariamente pequeñas, por lo que pueden considerarse

microendémicas y sensibles a la perturbación (Zamora y Hódar, 1998; Zamudio, 1993, 2000, 2001).

Los estudios realizados en *Pinguicula* mexicanas han mostrado que el género es muy antiguo en las montañas mexicanas, en donde han experimentado una intensa actividad evolutiva. Varios taxa complejos parecen encontrarse en pleno proceso de diversificación, mientras que otros muestran evidencias de evolución reticulada como hibridación y poliploidía (Zamudio, 2001).

Las plantas del género *Pinguicula* tienen flores zigomórficas, excepto en el subgénero *Isoloba*, con una corola simpétala (los pétalos se encuentran fusionados en la base). La corola presenta un tubo cilíndrico o infundibuliforme que termina en un espolón de tamaño y curvatura variable de acuerdo con la especie. La corola es bilabiada, en algunas especies en la superficie interna del labio inferior de la corola se localiza una estructura denominada *paladar*, cubierta por numerosos tricomas. El estigma es bilabiado, el labio posterior o punta estigmatoide es de menor tamaño que el anterior, este último se localiza sobre las anteras de tal forma que las cubre (Godfrey y Stripling, 1961; Schnell, 1976; Zamudio, 1993, 2001, 2005).

Las especies involucradas en este trabajo se encuentran incluidas en el subgénero *Pinguicula*, que se caracteriza por tener flores con una corola claramente bilabiada, el labio superior más corto que el inferior, el margen de los lóbulos entero, y rara vez alguno de ellos es emarginado, de coloración purpúrea, morada, roja o blanca, el tubo de la corola es infundibuliforme de longitud variable, con o sin paladar, el espolón es igual o más largo que el tubo de la corola (Zamudio, 2000, 2001, 2005; Espinosa, 2005).

El subgénero *Pinguicula* está dividido en cinco secciones, de las cuales cuatro se encuentran en México: la sección *Orcheosanthus* con 13 especies (en la que destacan dos de las especies involucradas en este estudio, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*; la sección *Longitubus* con 5 especies; la sección *Pinguicula* con 2, una de ellas es la tercer especie involucrada en este

estudio, *P. debbertiana*; por último la sección *Homophyllum* con una especie (Zamudio, 2000, 2001, 2005; Espinosa, 2005).

Con base en los análisis filogenéticos recientes sobre el género *Pinguicula*, realizados por Cieslak *et al.* (2005), se ha establecido la presencia de *P. esseriana* y *P. ehlersiae* en la sección *Crassifolia*, reforzando las observaciones de Speta y Fuchs (1982), quienes crearon esta sección basándose en el número cromosómico somático de ambas especies ($2n= 32$) y en algunas diferencias en la forma y tamaño de las hojas.

Polinización en el género *Pinguicula*

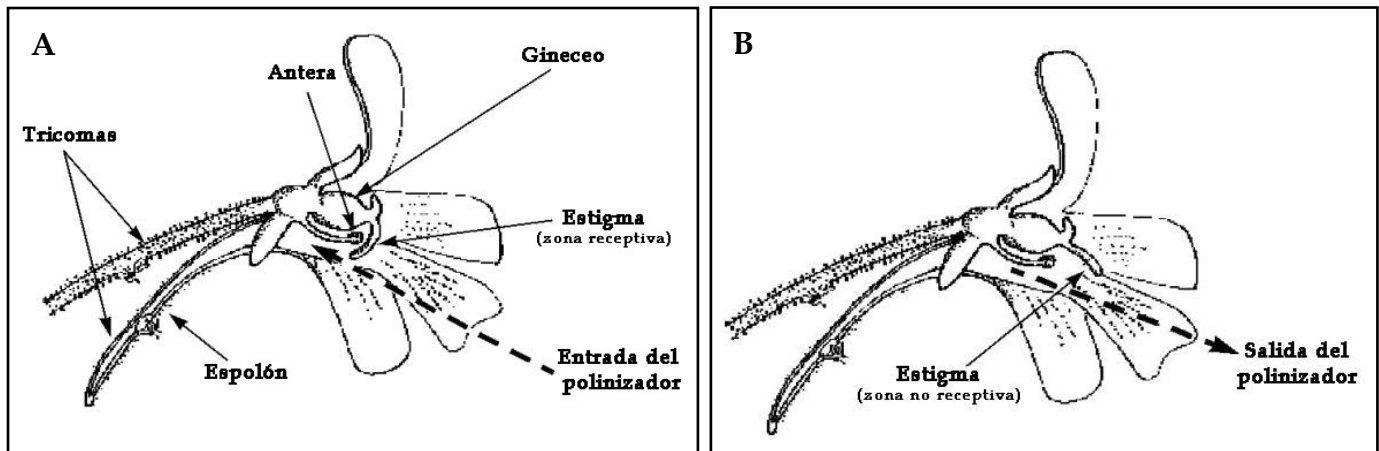
Las interacciones planta-animal que se presentan durante la polinización, son generalmente comunes en muchos otros grupos de plantas, sin embargo en una insectívora no lo es, debido a que ésta se comporta como un depredador, atrapando y digiriendo a los insectos de tamaño pequeño que se posan en sus hojas, pero al igual que muchas plantas éstas necesitan de polinizadores para la reproducción (Karlsson *et al.*, 1987; Zamora, 2002).

Se ha demostrado que en muchas plantas carnívoras la composición del gremio de polinizadores es diferente del gremio de las presas. En la mayoría de los casos, la diferencia es cuestión del tamaño relativo de los polinizadores y las presas (Alcalá y Domínguez, 1997; Zamora y Hódar, 1998; Heslop, 2004). Por ejemplo, el tamaño promedio de las presas de *Pinguicula nevadense* es tan sólo de algunos milímetros. Debido a que las trampas no pueden retener animales que excedan cierto tamaño, por lo tanto, los polinizadores tienen una probabilidad muy baja de ser atrapados (Zamora y Hódar, 1998; Zamora, 2002).

De acuerdo a las observaciones realizadas por Casper (1966) y a las de Zamudio *com. pers.*, el tamaño del tubo de la corola de las flores de *Pinguicula* puede indicar el tipo de polinizador; si el tubo es estrecho la polinización posiblemente es realizada por mariposas, como en *P. villosa*. A diferencia de ésta, las flores con tubos anchos son polinizadas por abejas,

moscas o algunos escarabajos, como en el caso de *P. alpina*, *P. vulgaris* y *P. grandiflora* (Casper, 1966; Heslop, 2004).

Para facilitar la polinización cruzada, se presenta hercogamia (separación espacial del estigma y anteras): el insecto polinizador al ser atraído por el nectario localizado en el espolón de la flor, penetra en ésta rozando la zona receptiva del estigma, dejando los granos de polen de otra flor que trae adheridos a su cuerpo. Al salir los granos de polen de las anteras se adhieren a su cuerpo y aunque toca el estigma a su regreso lo hace únicamente en la parte adaxial que cubre a las anteras del estigma sin rozar la parte receptiva, de esta manera transporta los granos de polen a otra planta en su próxima visita (Schnell, 1976; Figs. A y B).



Figuras A y B. Polinización. A. Ruta de entrada de polinizador, el cual deposita los granos de polen en la zona receptiva del estigma. B. Cuando el polinizador se retira, dobla el labio mayor del estigma evitando una posible autopolinización. <http://www.omnisterra.com/botany/cp/slides/pings/pings.htm>

Cuando los granos de polen llegan al estigma germinan en la superficie de intersección de los dos labios. Cuando ya se llevó a cabo la polinización y las anteras están maduras, el labio anterior del estigma deja al descubierto las anteras (Godfrey y Stripling, 1961; Schnell, 1976; Zamudio, 1993, 2001, 2005).

Hibridación en el género *Pinguicula*

El interés de los horticultores por las *Pinguiculas* ha aumentado gracias a la adaptación de estas plantas para crecer en la sombra, a la facilidad para su cultivo, así como al hecho de pertenecer al grupo de plantas carnívoras. Esto ha permitido en los últimos años la formación de híbridos artificiales entre algunas especies de *Pinguicula* cultivadas principalmente en Europa (Zamudio, 2001; Tabla 1).

Tabla 1. Lista de algunos híbridos artificiales registrados, tomados de http://www.omnisterra.com/bot/cp_home.cgi?name=pinguicula&submit=Submit+Quero&search=cultivar, ver **Anexo 1**.

Nombre común	Cruza
Aphrodite	<i>P. agnata</i> x <i>P. moctezumae</i>
Enigma *	<i>P. cyclosecta</i> x <i>P. esseriana</i>
Florian	<i>P. debbertiana</i> x <i>P. jaumavensis</i>
George Sargent	<i>P. moranensis</i> x <i>P. gypsicola</i>
Gina	<i>P. zecheri</i> x <i>P. agnata</i>
Hameln	<i>P. gypsicola</i> x <i>P. moranensis</i>
Hanka	<i>P. zecheri</i> x <i>P. rotundiflora</i>
L'Hautil	<i>P. ehlersiae</i> x <i>P. moranensis</i>
Pirouette	<i>P. agnata</i> x <i>P. moranensis</i> x <i>P. ehlersiae</i>
Sethos	<i>P. ehlersiae</i> x <i>P. moranensis</i>
Tina	<i>P. agnata</i> x <i>P. zecheri</i>
Titan	<i>P. agnata</i> x <i>P. macrophylla</i>
Weser	<i>P. moranensis</i> x <i>P. ehlersiae</i>

* Posible híbrido natural.

Un ejemplo de hibridación dentro subgénero *Pinguicula* ha sido propuesto por Zamudio (2001). Este autor considera que tanto *P. esseriana*, que habita en las cercanías de El Huizache, San Luis Potosí (Kirchner, 1981) así como *P. jaumavensis* (Debbert, 1991) de Jaumave, Tamaulipas muestran una fuerte semejanza morfológica, por lo que parecen ser

variantes de un mismo taxón. Zamudio (2001) las considera como coespecíficas y propone que este híbrido natural puede haberse originado repetidas veces como producto de la cruce entre *P. ehlersiae* (publicada por Speta y Fuchs, 1982) y *P. debbertiana* (Speta y Fuchs, 1992).

La presencia de paladar y una mancha amarilla en la corola de *P. esseriana* y *P. jaumavensis* (posibles híbridos), es difícil de explicar, ya que estas características no se conocen en ningún otro miembro de la sección *Orcheosantus* del subgénero *Pinguicula*, a la que pertenecen. Sin embargo, *P. debbertiana* (sección *Pinguicula*), presenta un notorio paladar amarillo. Este carácter ayudó a Zamudio (2001) a proponer a esta especie como uno de los parentales putativos, pero la presencia de una garganta muy amplia y el espolón corto son características que la diferencian claramente de las especies de la sección *Orcheosanthus* y la ubican mejor en la sección *Pinguicula*.

Además de las características que *P. esseriana* y *P. jaumavensis* comparten, existen otros atributos que sustentan su posible origen híbrido, las cuales son las siguientes: **a)** un marcado polimorfismo en la forma y tamaño de los lóbulos de la corola; **b)** presencia de un paladar en la corola, representado por dos pequeñas protuberancias cubiertas por una mancha amarilla; **c)** gran porción de polen anormal o aberrante; **d)** ausencia o escasa producción de frutos y semillas y **e)** la gran capacidad de propagación vegetativa que ocurre a partir de las hojas de las rosetas de invierno (Zamudio, 2001, 2005).

Estudios embriológicos en la familia Lentibulariaceae

A nivel mundial, el conocimiento de los caracteres embriológicos de esta familia se limitan a trabajos realizados en algunas especies del género *Utricularia* (aproximadamente 10% de las especies). En cambio, los géneros *Gensilea* y *Pinguicula* han sido poco estudiados (Espinosa, 2005).

El primer trabajo en este campo de la investigación fue el realizado por Kamienski en 1877 (citado por Kausik, 1938), quien reportó las primeras divisiones celulares del embrión en *Utricularia vulgaris*. Posteriormente se realizó un estudio comparativo sobre el desarrollo del saco embrionario y el embrión en diferentes especies de *Utricularia* y en *Pinguicula vulgaris*, poniendo especial atención en la naturaleza del haustorio en relación con el tejido nutritivo (Merz, 1897 citado en Kausik, 1938).

Estudios embriológicos en el género *Pinguicula*

Casper (1966) en la monografía del género *Pinguicula*, recopiló información de tipo embriológico, así como de sus propias observaciones en *Pinguicula vulgaris*, *P. alpina*, *P. leptoceras*, *P. crenatiloba*, *P. moranensis* y *P. gypsicola*.

Los estudios de la morfología de las estructuras reproductoras masculinas del género *Pinguicula*, son poco conocidos. En las flores maduras se ha reportado que el gametofito masculino (grano de polen) es suboblado a subprolado, oblado esferoidal a suboblado, prolado esferoidal o esferoidal, muestran de 3 a 8 aberturas y pueden ser colporados o colporoidados de ectoaberturas largas con membranas lisas y endoaberturas variables. La exina es tectada perforada, tectada verrugada, semitectada, reticulada, ligeramente reticulada o rara vez puntitegilada (Ludlow- Wiechers y Zamudio, 1993; Zamudio, 2001, 2005).

Las investigaciones de las estructuras reproductoras femeninas para este género son escasas y la mayoría se han realizado principalmente en especies europeas como *Pinguicula vulgaris*, *P. alpina* y *P. leptoceras* (Stolt, 1936; Kopczyńska, 1964; Johri *et al.*, 1992).

Kopczyńska (1964) y Casper (1966) describen en *P. vulgaris* la presencia de un ovario súpero, globoso, bicarpelar y unilocular con un corto estilo y estigma bilabiado. Observaron óvulos anátropos, unitégmicos y teninucelados.

Se describe la presencia de un endospermo de tipo celular con haustorios en la calaza y/o micrópilo, en *P. vulgaris* (Kopczyńska, 1964; Casper, 1966), *P. crenatiloba* (Casper, 1966; Espinosa, 2005), *P. alpina*, *P. leptoceras*, *P. moranensis* y *P. gypsicola* (Casper, 1966).

En estudios realizados por Casper (1966) y Zamudio (2001), se describen a las semillas como pequeñas y de forma cilíndrica con una testa generalmente reticulada. Otros estudios anatómicos mostraron la presencia de semillas con testas uniestratificadas que albergan embriones con uno o dos cotiledones (Stolt, 1936; Kopczyńska, 1964; Espinosa, 2005).

Cabe mencionar que la investigación embriológica más completa sobre algunas especies de *Pinguicula* es la realizada por Espinosa (2005a) y Espinosa *et al.* (2005b), en la que se describe detalladamente el desarrollo embrionario de *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba*, utilizando cada una de estas especies como representantes de los tres subgéneros del género *Pinguicula*. En esos estudios se resalta los siguientes resultados. Presencia de dos estambres anteriores con anteras secundariamente uniloculares, por la degradación del tejido conectivo y el septo; el desarrollo de la pared de la antera de tipo dicotiledóneo para las tres especies, sólo *P. crenatiloba* presentó un endotecio parcialmente biestratificado y una capa media con dos a cuatro estratos, carácter no reportado en ninguna otra especie. La microsporogénesis es de tipo sucesivo, las tétradas de microsporas tetraédricas. Los granos de polen bicelulares. Los óvulos son anátropos y teninucelados, unitégmicos y con tapete tegumentario, tétradas lineales de megasporas, saco embrionario de tipo *Polygonum*, con fecundación porógama. El desarrollo del endospermo de tipo celular, durante el desarrollo de la semilla se diferencia un haustorio micropilar y uno calazal. El cigoto es alargado y la primera división es transversal u oblicua y desarrolla un suspensor. Las semillas endospermicas muestran un embrión con uno o dos cotiledones. La cubierta seminal se diferencia a partir de la epidermis externa del tegumento, el resto de los estratos desaparecen.

El presente proyecto pretende demostrar si realmente *P. esseriana* presenta características micromorfológicas florales, así como embriológicas que ayuden a caracterizarlo reproductivamente como un posible híbrido natural, resultado de la cruce entre *P. ehlersiae* y *P. debbertiana* como lo propuso Zamudio (2001), o bien que esta entidad es morfológicamente parecida a estas especies, pero debe ser considerada como una especie diferente e independiente como lo manifiestan Van Marm y Lampard (1992).

Los resultados embriológicos y micromorfológicos que pudieran obtenerse durante la realización de este estudio serán de suma importancia, ya que por medio de éstos se podrá conocer la fertilidad del posible híbrido natural *P. esseriana* y la posibilidad de éste para cruzarse con otros individuos de la misma generación o con sus progenitores y así mismo entender la poca viabilidad de los granos de polen, así como la baja producción de semillas en este taxón.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el posible origen híbrido de *Pinguicula esseriana* mediante la comparación de los caracteres o estados de carácter de la micromorfología floral y el desarrollo de los gametos masculinos y femeninos de los posibles progenitores, *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana* con las del híbrido natural.

Objetivos particulares

- ❖ Comparar la micromorfología floral de los progenitores propuestos, *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana*, con el supuesto híbrido natural (*Pinguicula esseriana*) de una población de Querétaro.
 - ❖ Caracterizar la fertilidad del supuesto híbrido natural con los progenitores propuestos, en términos del desarrollo embriológico y viabilidad gamética, óvulos y semillas.
 - ❖ Determinar mediante polinizaciones manuales artificiales si existe fecundación entre *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, así como entre individuos del posible híbrido natural (*P. esseriana*).
-

V. HIPOTESIS

Si la población del posible híbrido (*Pinguicula esseriana*) en Querétaro presenta características micromorfológicas florales intermedias, así como alteraciones en el patrón de desarrollo de los gametos y semillas, serían evidencias útiles para caracterizarlo como posible híbrido natural, resultado de la cruce entre *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*.

Por el contrario, si el posible híbrido natural no presenta características morfológicas florales intermedias, ni alteraciones en el patrón de desarrollo de los gametos y semillas, y tiene un éxito reproductivo sexual podría ser considerada una entidad morfológicamente diferente.

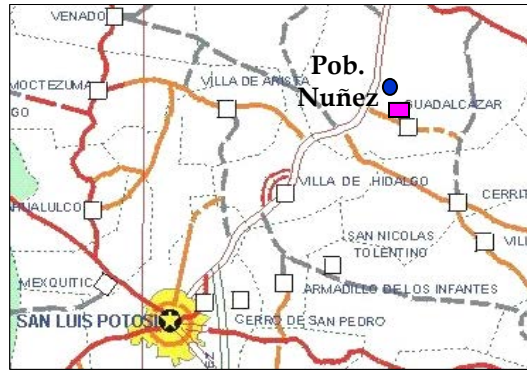
VI. MATERIAL Y METODOS

Especies estudiadas y sitios de colecta

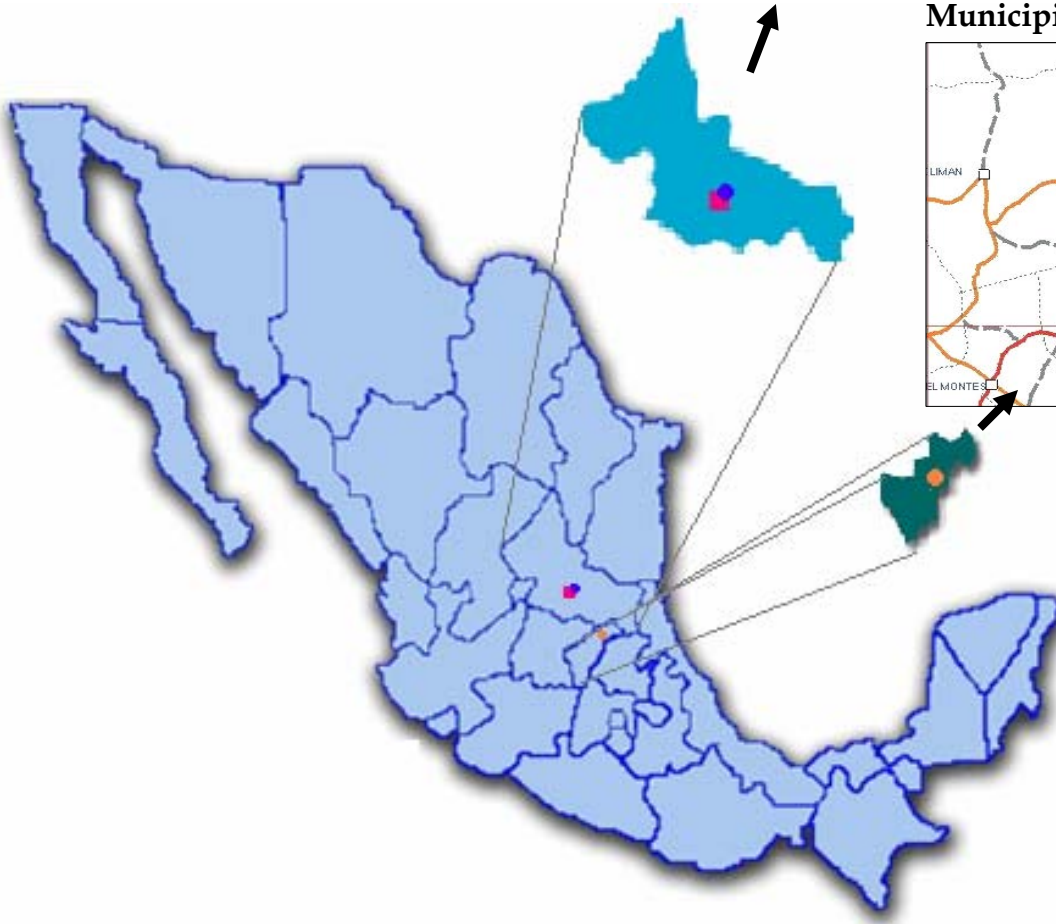
A. *Pinguicula debbertiana* (Speta y Fuchs, 1992), sección *Pinguicula*. Especie perenne. Crece en laderas de roca caliza con afloramientos de yesos, en las grietas de las rocas. El tipo de vegetación es matorral submontano con rosetófilos, en donde predominan las especies de *Hechtia glomerata*, *Agave striata* y *A. lechugilla*. Alt. 1820 msnm. Las poblaciones colectadas se localizan en la ladera noroeste en un cerro cercano al Parador Nuñez en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí; localizado a 3 km de la desviación a Matehuala-Guadalcázar, siguiendo la carretera Matehuala-Saltillo. La localidad se ubica a 22° 12' 46" N y 100° 16' 24" W. La época de floración es de febrero a abril, mientras se mantiene la roseta de invierno (Fig. 1).

B. *Pinguicula ehlersiae* (Speta y Fuchs, 1982), sección *Orcheosantus*. Planta herbácea perenne. Crece en laderas de rocas calizas y metamórficas en las grietas de las rocas. Habita en bosques de encinos. Su distribución es en la Sierra Madre Oriental, cubriendo los estados de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí. Alt. 1800 a 1950 msnm. El material utilizado fue colectado en la cueva del Gato en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí. La localidad se ubica a 22° 38' 39" N y 100° 25' 36" W. La floración se presenta de enero a abril, mientras se mantiene la roseta de invierno. (Fig. 1)

Municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí.



Municipio de Cadereyta, Querétaro.



- *Pinguicula debbertiana* ■ *Pinguicula elhersiae* ● *Pinguicula esseriana*

Figura 1. Mapa de los sitios de colecta de *Pinguicula debbertiana* y *P. elhersiae* (Municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí), y *P. esseriana* (Municipio de Cadereyta, Querétaro).

c. *Pinguicula esseriana* (Kirchner, 1981), sección *Orcheosantus*. Planta herbácea perenne. Crece en las laderas de rocas calizas, sobre suelo somero, en las grietas de las rocas. Habita en bosque de pino piñonero con *Pinus cenmbroides*, *Juniperos deppeana*, *P. pinceana*, *Juniperus deppeana* y *J. flaccida*, en bosque de encino, y en matorrales xerófilos del centro de Querétaro. Distribución: Tamaulipas, Querétaro e Hidalgo, en la Sierra Madre Oriental o en sus estribaciones. Alt. 1600- 2350 msnm. La poblaciones colectadas se localizan en el Paradero Tepozán (20° 54' 27" N y 99° 58' 57" W), en el municipio de Cadereyta, Querétaro. Esta localidad se encuentra a 17 km al W de San Joaquín (20° 55' 40" N, 99° 34' 35" W), sobre la carretera Vizarrón- San Joaquín, municipio de Cadereyta. La floración se presenta de enero a abril, mientras las plantas mantienen la roseta de invierno. (Fig.1). Aunque esta especie se considera abundante localmente, es vulnerable a la extinción (Zamudio, 2001, 2005).

Cabe señalar que en el municipio de Guadalcázar, San Luís Potosí, se han encontrado juntas a *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, aproximadamente a 30 km en línea recta, de la localidad tipo de *P. ehlersiae*, lo que hace posible que éstas puedan hibridizar o que hayan hibridizado con anterioridad, aunque en la actualidad las poblaciones conocidas de *P. esseriana* de los estados de Hidalgo y Querétaro están aisladas de los supuestos parentales; pero en las cercanías del Huizache, San Luis Potosí, en los cerros aledaños al Parador Nuñez, donde habita *P. debbertiana*, el otro posible parental, se encontraron algunos individuos de *P. esseriana* (Zamudio, 2001).

Colecta del material

El material biológico colectado de los tres taxa, consistió de:

- ❖ Individuos vivos, los cuales fueron colectados junto con el sustrato donde crecían, exceptuando *Pinguicula ehlersiae*. Estos fueron mantenidos en las Cámaras de ambientes controlados de la Facultad de Ciencias de la UNAM.
- ❖ Se colectaron botones florales en diferentes estadios de desarrollo, así como flores en anthesis y frutos en diferentes etapas de desarrollo. Asimismo, se colectaron las flores que fueron surgiendo de las plantas mantenidas en las cámaras de ambientes controlados. En ambos casos, fueron fijados en FAA (10% de formaldehído: 5% ácido acético: 50% alcohol etílico al 96%: 35% de agua) (López-Curto *et al.*, 1998).

Con la finalidad de dar un mejor seguimiento a las técnicas utilizadas durante esta investigación, este apartado fue dividido conforme a los objetivos particulares antes planteados:

Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

El material previamente fijado en FAA y Farmer fue deshidratado en una serie gradual de alcohol etílico (50%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100% y 100%) y en concentraciones de etanol-acetona 1:1, 1:2 y acetona pura durante 15 minutos cada uno. Posteriormente se secaron a punto crítico con CO₂, en una desecadora CPD-030 Balttec. Se montaron en porta muestras metálicos de aluminio sobre cinta conductiva de carbón y se cubrieron con una capa delgada de oro, utilizando una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y toma de fotografías se hicieron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM- 5310LV (Bozzola y Russell, 1999).

Técnicas Histológicas

En el laboratorio se establecieron diferentes etapas de desarrollo de las especies en estudio, tomando como criterio de selección el tamaño del material biológico. Las flores en anthesis fueron disectadas retirando la corola, dejando al androceo y gineceo unidos al receptáculo y al cáliz esto para permitir una mejor infiltración de los reactivos que se utilizaron posteriormente.

A. Lavado y deshidratado

Para eliminar el exceso de fijador de las muestras, éstas se lavaron con agua corriente. Posteriormente se deshidrataron en una serie de etanoles graduales (50%, 70%, 85%, 96% y 100%), durante dos horas en cada uno. Una parte del material se incluyó en Paraplast y otra en resina plástica LR- White.

B. Inclusión en Paraplast

El material previamente deshidratado se infiltró en xilol puro por tres horas y posteriormente en mezclas de xilol - paraplast en proporciones 1:1 y 1:2, durante 12 h, en cada uno y en Paraplast puro durante 24 h a 56°C dentro de una estufa. Posteriormente se incluyeron en moldes metálicos donde fueron orientados para obtener cortes longitudinales o transversales. Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación American Optical, de 8-10 μm de grosor. Las laminillas seleccionadas fueron desparafinadas durante 25 minutos en una estufa a 56°C y se procesaron para ser teñidas con safranina-verde rápido en metilcelosolve (Johansen, 1940; López- Curto *et al.*, 1998). Posteriormente fueron montadas con resina sintética y se fotografiaron en un microscopio óptico Olympus Provis AX70.

C. Inclusión en LR- White

Posterior a la deshidratación del material biológico, la inclusión en la resina LR- White tuvo como paso previo la infiltración del material en una mezcla LR -White - etanol 100% 1:1 y 2:1, durante dos horas en cada uno. Para seguir con la infiltración en LR- White puro durante 24 horas. La inclusión se llevó a cabo en cápsulas Been o de gelatina en una estufa a 56 °C en ausencia de oxígeno (Ruzin, 1999). Se realizaron cortes de 1 µm de grosor con cuchillas de vidrio en un ultramicrotomo (RMC-MT990), los cortes fueron teñidos con azul de toluidina acuosa al 0.5%. El análisis y toma de fotografías de las laminillas se realizó en un microscopio óptico Olympus Provis AX70.

Otras técnicas

A. Tinción de Alexander (viabilidad de los granos de polen)

Este tipo de tinción se utilizó para determinar la viabilidad de los granos de polen utilizando material fresco, de *Pinguicula esseriana*. Se utilizaron 14 flores, cada una de una planta diferente. Las cuales se obtuvieron de diversos manchones para evitar lo más posible que se tratara del mismo individuo debido a la reproducción vegetativa.

Se tomó con un pincel una muestra de polen extraído de flores frescas, se colocó sobre un portaobjetos y se le agregó la solución de Alexander, se mezcló con un palillo de madera y se observaron inmediatamente al microscopio óptico para realizar el conteo de granos de polen viables (con citoplasma teñido de rosa y pared del polen de color verde) y granos de polen abortivos (en los que el citoplasma carece de coloración y presenta una cubierta teñida de verde).

B. Polinizaciones manuales y observación de tubos polínicos

a. En *Pinguicula esseriana*

Las polinizaciones manuales se realizaron principalmente en flores de *P. esseriana*. Cabe señalar que son pocas las flores que en un día pueden obtenerse y más difícil aún tener

a las tres especies al mismo tiempo, ya que las rosetas producen generalmente una flor a la vez en condiciones controladas.

Para corroborar que los granos de polen germinaban y que los tubos polínicos podían alcanzar el óvulo para fecundar a la ovocélula, se realizaron polinizaciones manuales en 29 flores frescas de *P. esseriana*, provenientes de individuos de manchones diferentes. Después de realizar la polinización, algunas flores fueron colectadas y fijadas en Farmer (alcohol 100% - ácido acético, 3:1), a diferentes horas (2, 3, 5:30, 6, 12, 48 y 72 h).

Con la finalidad de observar la germinación de los granos de polen, así como conocer su recorrido a lo largo del gineceo, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

- ❖ **Muestras a dos y tres horas postpolinización:** En ambos casos las muestras se fijaron en Farmer por 24 h, posteriormente se ablandó el tejido con KOH 1M durante 3 h y se introdujeron en azul de anilina durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron sobre un portaobjetos, y se realizó un “squash”.
- ❖ **Muestras a las 5:30, 6, 12, 48 y 72 h postpolinización:** Fueron incluidas en paraplast. Los bloques se cortaron a 15-20 μm y los cortes se desparafinaron. Las laminillas obtenidas se tiñeron con azul de anilina, este fluorocromo se adhiere a la calosa de la pared de los tubos polínicos y al ser excitado con luz ultravioleta fluoresce en color verde brillante.
- ❖ El material ya procesado (a 2, 3, 5:30, 6, 12, 48 y 72 h), fue observado por medio de microscopía de fluorescencia y se tomaron las fotomicrografías.

Para poder detectar posibles autopolinizaciones (cleistogamia) en *P. esseriana*, se tomaron botones florales a diferentes etapas de desarrollo. Estos fueron disectados separando las anteras del gineceo, mismas que se incluyeron en una solución de 1M de KOH durante 6 h y siguiendo la metodología de las muestras a dos-tres horas

postpolinización. El material se observó por medio de microscopía de fluorescencia y se tomaron las fotomicrografías.

b. Entre *Pinguicula debbertiana* y *P. ehlersiae*

Las polinizaciones entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*, fueron pocas debido a la falta de flores en anthesis producidas el mismo día, únicamente se pudo realizar la polinización manual de una flor de *P. ehlersiae* utilizando polen de *P. debbertiana*. La flor de *P. ehlersiae* fue fijada en Farmer una hora después de la polinización manual. Fue disectada y procesada separando las anteras del gineceo, los cuales se incluyeron en una solución de 1M de KOH durante 6 h. Posteriormente se introdujeron en azul de anilina durante 12 h, una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron colocadas sobre un portaobjetos, y se realizó un "squash". El material ya procesado fue observado por medio de microscopía de fluorescencia y se tomaron las fotomicrografías.

VII. RESULTADOS

Debido a la similitud en los caracteres morfológicos y embriológicos observados durante esta investigación para *Pinguicula esseriana*, *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, éstos se describen en general para las tres especies, y se hace alguna mención especial particularmente cuando una especie presenta alguna diferencia.

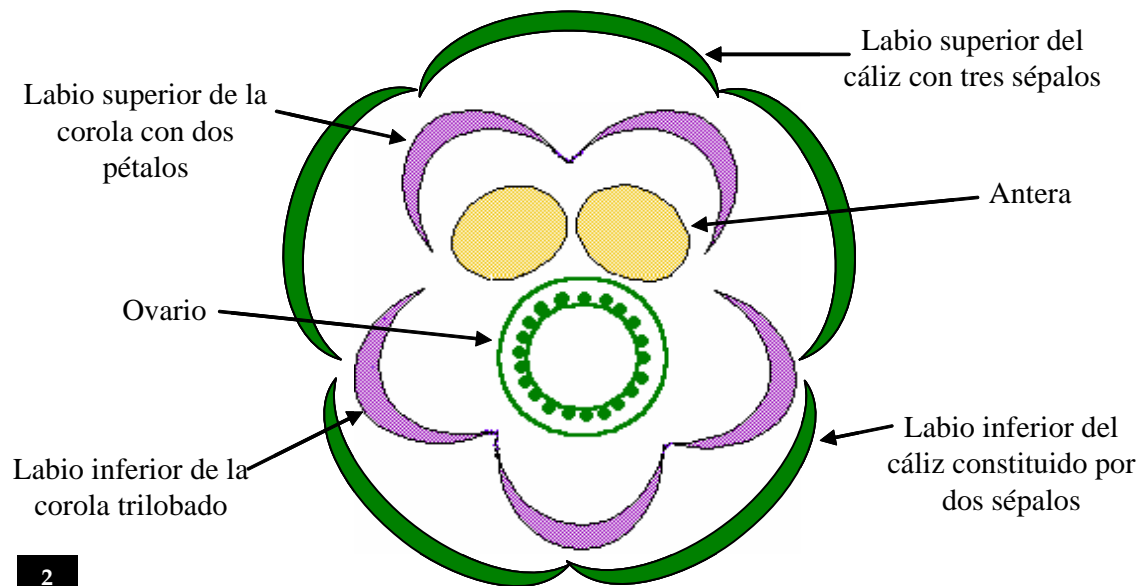
Morfología floral

La flor proviene de un meristemo apical, en el que se diferencian un conjunto de hojas modificadas y adaptadas para la reproducción, estas estructuras generalmente se diferencian en orden, quedando externos en la flor, primero los sépalos y pétalos, al centro androceo y gineceo (Fig. 3).

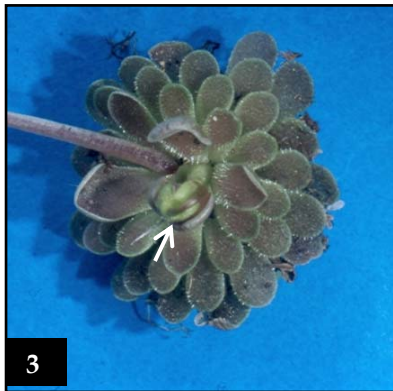
Durante la temporada de floración, cada roseta produce entre uno y tres botones; éstos se originan en las axilas de las hojas jóvenes centrales de la roseta de invierno (Fig. 3). La flor se encuentra sostenida por un pedúnculo alargado (Fig. 4). Las flores en anthesis son fuertemente bilabiadas (Fig. 5).

Perianto

El *cáliz* es el primer verticilo floral que se diferencia, es bilabiado con sépalos obovados de color verde, pubescentes en ambas superficies. El labio superior se encuentra dividido casi desde su base en tres lóbulos, mientras que el labio inferior es bilobulado. Esta estructura persiste en la etapa de fructificación (Figs. 6 y 7).



2



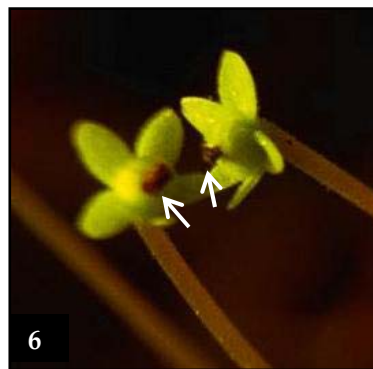
3



4



5



6



7

Figuras 2- 7. Diagrama floral y etapas florales. 2. Verticilos florales (orden de descripción centrípeto): cáliz bilabiado, tres sépalos se encuentran en el labio superior y dos en el inferior; corola bilabiada, con dos lóbulos (pétalos) que conforman el labio superior y tres el labio inferior; androceo con dos anteras ovaladas; gineceo conformado por un ovario súpero globular y placentación libre central. 3. Botón floral pequeño, se origina en las axilas de las hojas jóvenes centrales de la roseta de invierno (flecha). 4. Botón floral con pedúnculo alargado (flecha). 5. Tres flores en antesis fuertemente bilabiadas, que surgen de una sola roseta. 6. Frutos inmaduros con estigmas persistentes (flechas). 7. Fruto maduro con estigma persistente (flecha).

Algunas de las características de la *corola* son importantes en la diferenciación de los taxa de este estudio como el tamaño del espolón², la forma y color de los lóbulos, así como la presencia de paladar¹.

Pinguicula debbertiana

La flor mide entre 25mm y 40mm (incluyendo el espolón). La corola está conformada por cinco lóbulos (pétalos) con venación muy marcada, dos en el labio superior y tres en el labio inferior. Son obovados, de color violáceo-purpúreo; el paladar consiste en dos protuberancias evidentes de forma ovalada y de color amarillo (Fig. 8). La garganta es amarilla blanquecina, pilosa. El espolón de igual longitud o ligeramente más grande que el tubo de la corola, es de color verde y presenta una nervadura morada (Fig. 9). El ángulo aproximado de divergencia de los labios de la corola es de 90° (Fig. 10).

Pinguicula ehlersiae

Flor bilabiada, de 30 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón), compuesta de cinco lóbulos obovados de color morado-purpúreo; carece de paladar (Fig. 11). La garganta es de color verde y presenta escasos tricomas. Presenta un espolón más largo que el tubo de la corola y curvo o ligeramente recto de color verdoso con una nervadura púrpura (Fig. 12). Los labios de la corola divergen en un ángulo aproximado de 180° (Fig. 13).

Se describe de acuerdo a la terminología utilizada por Zamudio (2001):

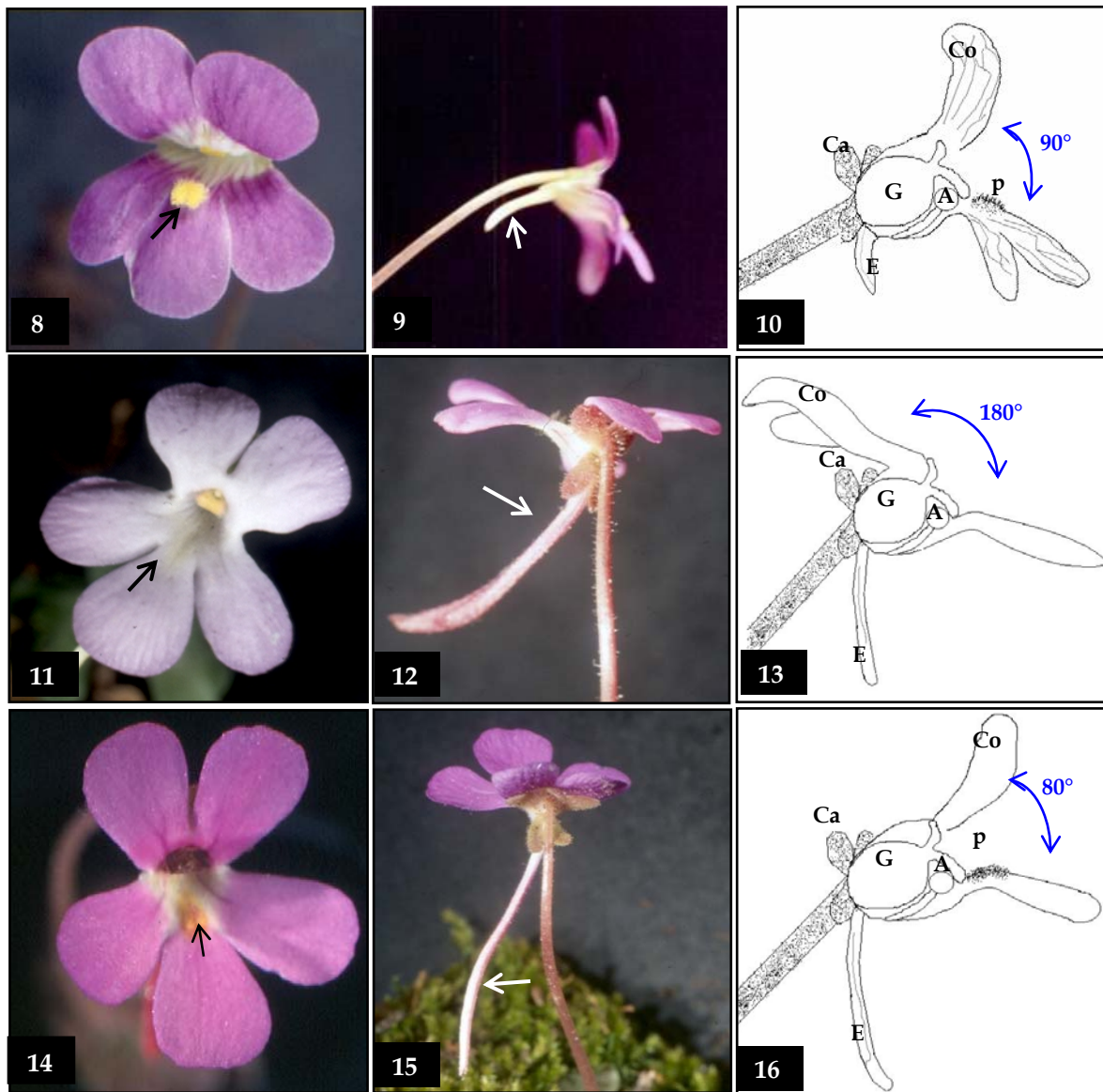
¹ Paladar: Estructura ubicada en la base del lóbulo medio del labio inferior, el cual en algunas especies presenta un indumento formado por tricomas glandulares multicelulares.

² Espolón: Prolongación del tubo de la corola que durante las primeras etapas del desarrollo rodea al botón floral y conforme la flor crece, se separa gradualmente y mantiene una forma curva.

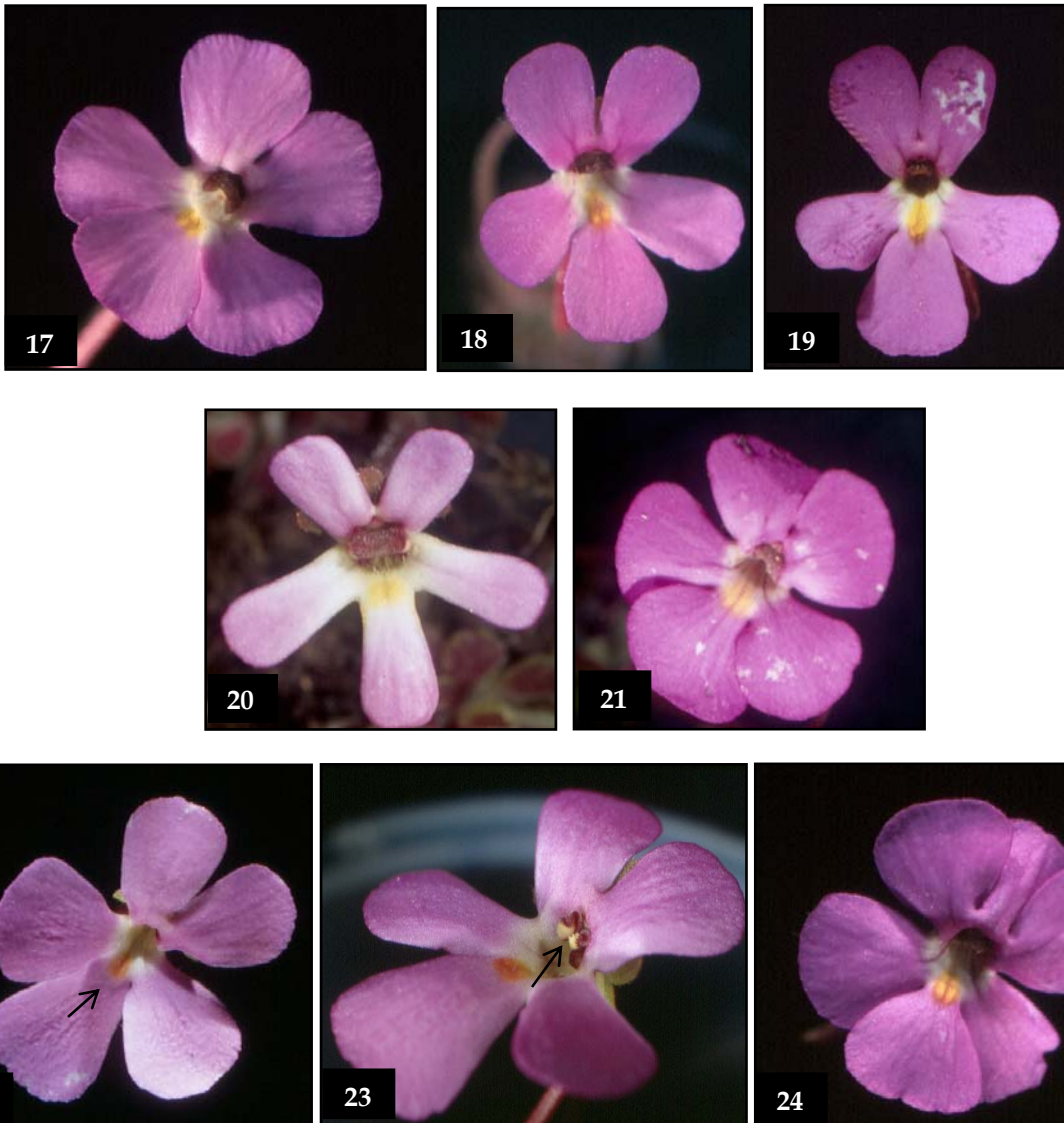
Pinguicula esseriana

Flores entre los 23 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón); la corola es bilabiada de color rosa a violáceo- purpúrea. Los lóbulos son obovados - cuneados, hasta obovados a oblatos, carácter poco frecuentemente en *P. esseriana*. La garganta es blanca y densamente pilosa, paladar amarillo-verdoso o café con dos pequeñas protuberancias cubiertas densamente con tricomas (Fig. 14). El espolón es más largo que el tubo de la corola, poco incurvado, de color blanco-verdoso o ligeramente morado con venas morado-violáceas (Fig. 15). La divergencia de los labios de la corola forma un ángulo aproximado de 80° (Fig. 16).

Pinguicula esseriana es una de las especies que presenta mayor variación en la longitud de las flores y en la forma de los lóbulos de la corola ya que en esta investigación se observaron tres variantes de lóbulos obovados (Figs. 17-19), una variante oblonga (Fig. 20) y una oblata (Fig. 21). También se pudieron identificar anomalías en el desarrollo de la flor como la presencia de un paladar de color café (Fig. 22), un estigma bifurcado (Fig. 23) y una flor compuesta de seis pétalos en vez de cinco (Fig. 24).



Figuras 8-16. Características florales de las especies estudiadas. La primera columna muestra la vista frontal de las flores, la segunda la vista lateral y la tercera son diagramas que muestran el grado de divergencia de los lóbulos de la corola. **8.** *Pinguicula debbertiana*. Corola bilabiada con cinco lóbulos con una venación marcada, obovados, de color violáceo - púrpura y un paladar de color amarillo con dos protuberancias (flecha). **9.** *Pinguicula debbertiana*. Espolón de igual longitud o ligeramente más grande que el tubo de la corola, de color verde y con una nervadura morada (flecha). **10.** *Pinguicula debbertiana*. Los labios de la corola divergen en un ángulo aproximado de 90°. **11.** *P. ehlersiae*. Flor bilabiada con cinco lóbulos obovados de color morado-púrpura y carece de paladar (flecha). **12.** *P. ehlersiae*. Espolón más largo que el tubo de la corola y curvo, de color verdoso con una nervadura púrpura (flecha) **13.** *P. ehlersiae*. Los labios de la corola divergen en un ángulo aproximado de 180°. **14.** *P. esseriana* (posible híbrido natural). Corola bilabiada, compuesta de cinco lóbulos obovados y paladar de color amarillo-verdoso, ocasionalmente café, con dos pequeñas protuberancias similares a las de *P. debbertiana* (flecha). **15.** *P. esseriana*. Espolón más largo que el tubo de la corola, poco incurvado, de color blanco-verdoso o ligeramente morado (flecha). **16.** *P. esseriana*. El ángulo de divergencia aproximadamente de 80°. A, antera; Ca, cáliz; Co, corola; E, espolón; G, gineceo; P, paladar.



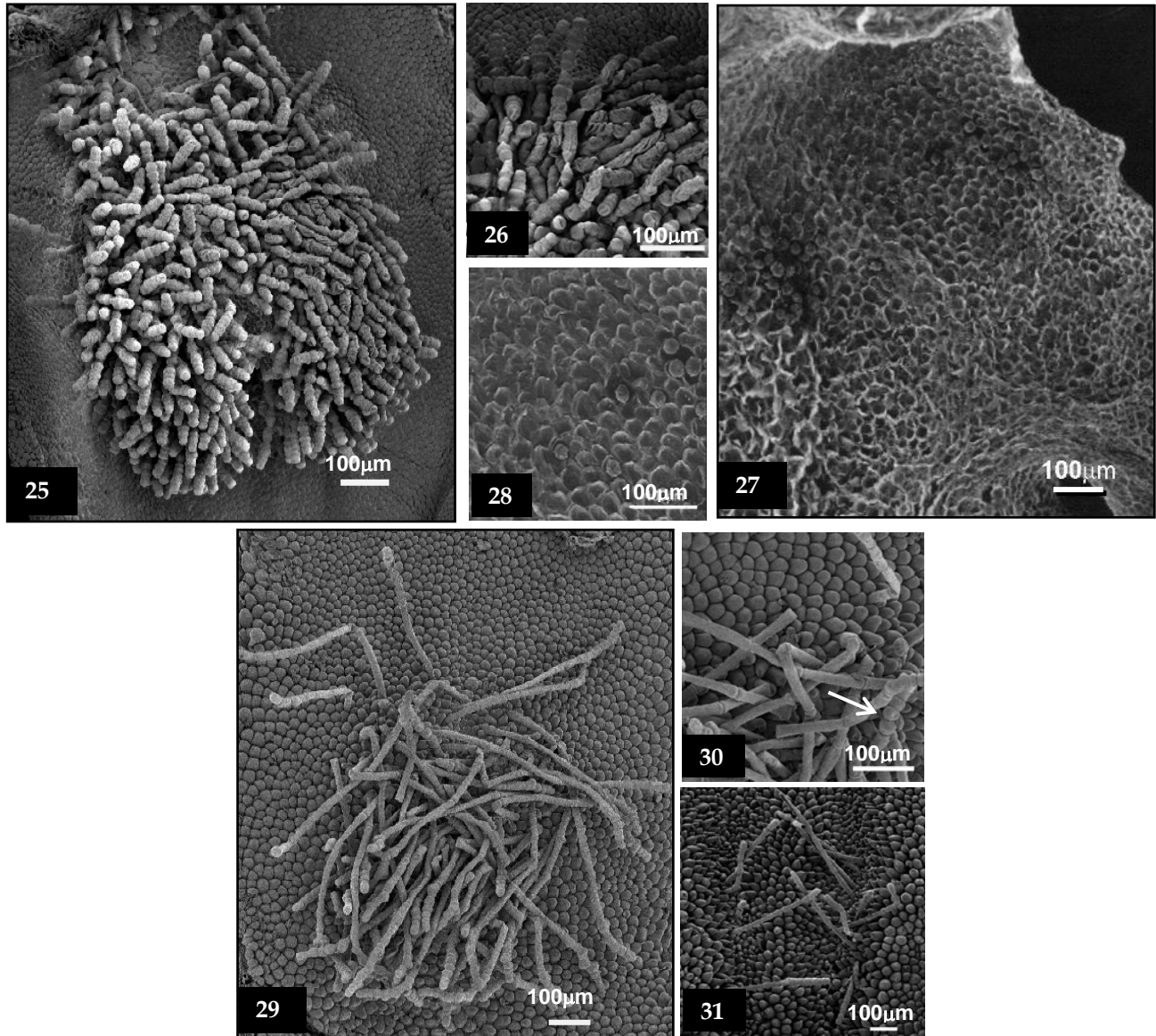
Figuras 17- 24. Variación floral de *Pinguicula esseriana* (posible híbrido natural). 17- 19. Tres variantes de lóbulos obovados. 20. Lóbulos oblongos. 21. Lóbulos oblatos. 22. Flor que presenta un paladar de color café con dos pequeñas protuberancias poco marcadas (flecha). 23. Flor con un estigma anormal bifurcado, lo que provoca que las anteras estén descubiertas (flecha). 24. Flor compuesta de seis lóbulos, un carácter raro en el género.

Paladar

En *Pinguicula debbertiana* el paladar es de color amarillo y consiste de dos protuberancias evidentes de forma ovalada (Fig. 25), cubiertas por tricomas multicelulares uniseriados de forma globosa (Fig. 26). Los cuales se encuentran ampliamente distribuidos.

Como anteriormente se había mencionado, *P. ehlersiae* carece de paladar y de tricomas en esta zona (Figs. 27, 28).

El paladar de *P. esseriana*, los tricomas que conforman el paladar se distribuyen en dos protuberancias poco marcadas (en algunas flores sólo se aprecia una protuberancia), de color amarillo-verdoso o café-verdoso; los tricomas son multicelulares y uniseriados, de dos formas: cilíndricos, excepto la parte apical que son multicelulares uniseriados de forma globosa (como los encontrados en *P. debbertiana*), estos últimos en menor proporción (Fig. 29). La distribución y densidad de ambos tipos de tricomas multicelulares varía de forma significativa en esta especie y con respecto a lo observado en *P. debbertiana*. En flores atípicas del híbrido, se observan tricomas multicelulares uniseriados de forma cilíndrica dispuestos en menor proporción (Fig. 30).



Figuras 25- 31. Área del paladar de los tres taxa visto al MEB. 25. *Pinguicula debbertiana*, se muestra el paladar con dos protuberancias evidentes y de forma ovalada, cubiertas por tricomas multicelulares ampliamente distribuidos. 26. *P. debbertiana*, acercamiento a los tricomas multicelulares uniseriados de forma globosa. 27. *P. ehlersiae*. Se muestra el área del paladar sin tricomas ni protuberancias. 28. *P. ehlersiae*, acercamiento a la zona del paladar carente de tricomas. 29. *P. esseriana*, se observa una protuberancia poco marcada, cubierta con tricomas multicelulares largos. 30. *P. esseriana*, acercamiento a los tricomas multicelulares uniseriados de forma cilíndrica en la base y globosa en la zona apical (como los vistos en *P. debbertiana*, flecha). 31. *P. esseriana*. Paladar de una flor atípica con escasos tricomas multicelulares.

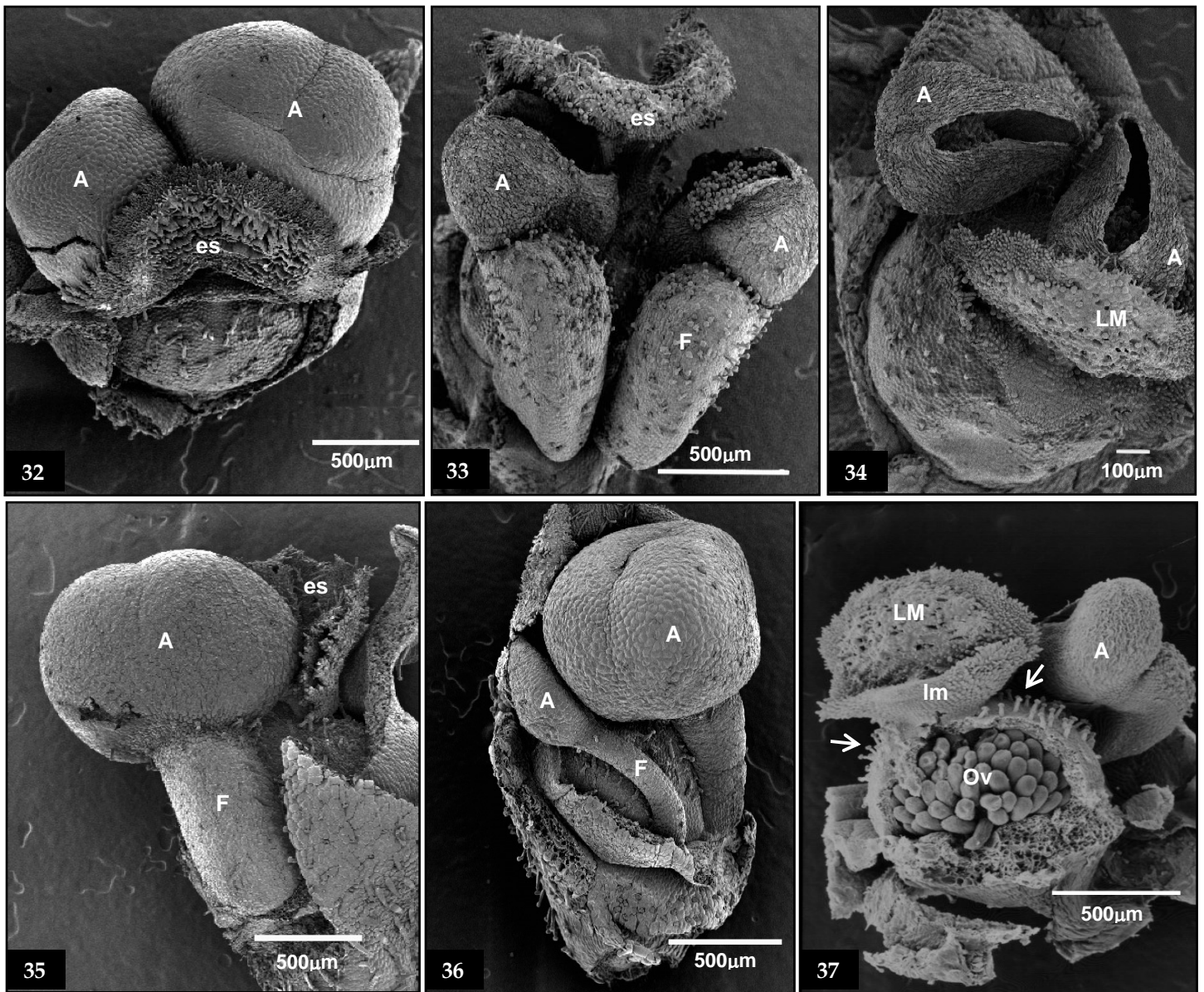
Androceo

El verticilo sexual masculino (androceo), está constituido por dos estambres que se insertan en el receptáculo cerca de la base del ovario, y las anteras se ubican justo abajo del labio estigmático mayor (Fig. 32).

Los estambres son epipétalos diferenciados y generalmente homodínamos. Cada uno consiste de un filamento cilíndrico y poco encorvado, pubescente (Fig. 33). Ambas anteras son ovaladas y se localizan en la zona anterior o inferior de la flor y se encuentran fusionados a la base del gineceo (Fig. 33). En *Pinguicula ehlersiae* las líneas de dehiscencia de las anteras maduras se observaron debajo del labio estigmático mayor (Fig. 33), carácter atípico en flores normales, debido a que antes de que las anteras maduren, las líneas de dehiscencia de éstas, están dirigidas hacia la zona abaxial del labio mayor del estigma. Una vez que maduran los estambres, la base de los filamentos gira y el ovario en desarrollo empuja gradualmente a las anteras, de tal forma que durante la antesis las anteras dehiscentes quedan dirigidas hacia el tubo de la corola (Fig. 34). Esta nueva posición de las anteras podría servir para evitar la autopolinización, debido a que los granos de polen pueden caer directamente al tubo de la corola o se adhieren a la zona no receptiva del estigma.

Las especies progenitoras (*Pinguicula debbertiana* y *P. ehlersiae*), no presentaron anomalías en la morfología del androceo. Sin embargo, en el posible híbrido natural (*P. esseriana*) se encontraron algunas flores con una sola antera (Fig. 35), o bien dos anteras, pero una de menor tamaño con malformación (Fig. 36).

Las anteras jóvenes son bilobuladas y tetrasporangiadas, sin embargo, conforme las anteras alcanzan la madurez, el tejido que separa a los esporangios se degrada (conectivo), por lo que en la antesis, la antera se vuelve secundariamente monoesporangiada.



Figuras 32 - 37. Flores en antesis con el perianto removido. 32. *Pinguicula esseriana*, se observa el labio mayor del estigma cubriendo a las anteras. 33. *P. ehlersiae*, se aprecian dos estambres homodínamos, el filamento cilíndrico poco encorvado y pubescente. Las anteras con dehiscencia introrsa. Por abajo del o mayor del estigma. 34. *P. debbertiana*, labio mayor del estigma cubriendo a las anteras dehiscentes ligeramente torcidas y dirigidas al tubo de la corola. Ovario esférico y pubescente. 35. *P. esseriana*, flor atípica con una sola antera de gran tamaño. 36. *P. esseriana*, flor atípica con anteras de diferente tamaño. 37. *P. debbertiana*, se observa el estigma bilabiado, el labio posterior es pequeño, mientras que el labio anterior está bien desarrollado y tiene forma discoidal, ambos se encuentran unidos en su base y descansan sobre un estilo corto. Ovario cubierto por tricomas (flechas), con numerosos óvulos. El estilo es corto. A, antera; es, estigma; F, filamento; LM, labio mayor; Im, labio menor; O, ovario; Ov, óvulos.

❖ Estigma

El estigma es bilabiado con labios desiguales. El labio menor presenta papilas no secretoras y es pequeño, por su parte, el labio estigmático mayor está bien desarrollado, ambos se encuentran unidos en su base y descansan sobre el estilo corto (Fig. 37). El labio mayor del estigma cubre a las anteras en las tres especies. Únicamente en *P. esseriana*, se observó una flor con un estigma bifurcado en su base y el labio anterior no alcanza a cubrir a las anteras (Fig. 38).

El labio mayor tiene forma discoidal, mientras que el labio menor forma triangular (Fig. 39). La parte adaxial del labio mayor se caracteriza por tener numerosas células secretoras o papilas estigmáticas de forma alargada en *Pinguicula esseriana* o triangulares en *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, y que conforman la zona receptiva (Fig. 40). Las papilas son unicelulares con un núcleo evidente y citoplasma denso, la cutícula es delgada y lisa (Fig. 41). La zona abaxial cubre las anteras, y presenta tricomas largos multicelulares de cutículas rugosas cuya función es atrapar a los granos de polen de la misma flor.

❖ Estilo

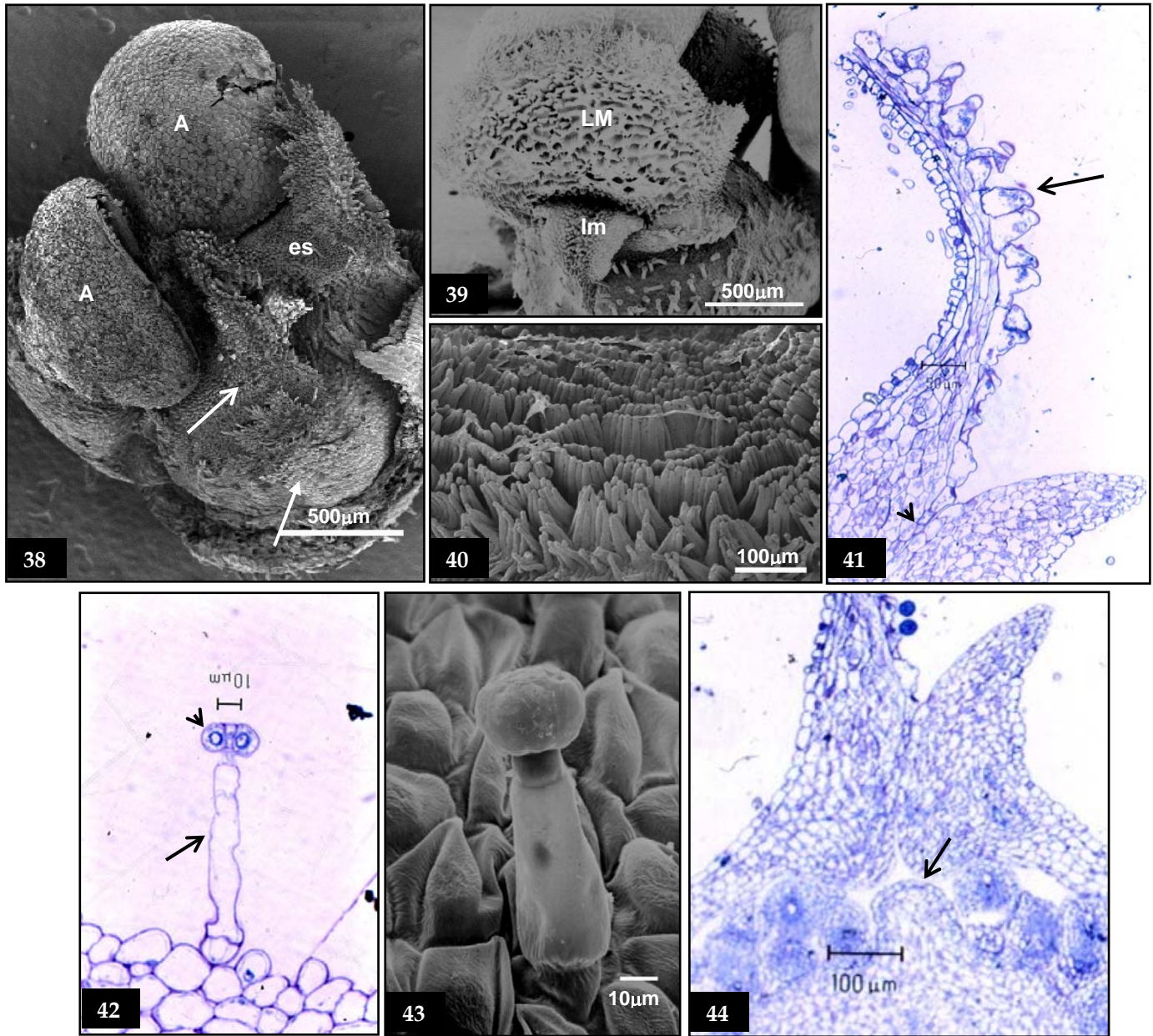
El estilo corto se origina a partir del ensanchamiento del ovario. El canal estilar está delimitado por células con citoplasma denso y núcleos evidentes (Fig. 41).

❖ Ovario

El ovario es súpero de forma globular y de color verde, con tricomas glandulares en su superficie, que se desarrollan de las células de la epidermis externa. Los tricomas son multicelulares de tipo secretor con una célula basal cilíndrica y células secretoras que forman la cabeza (Figs. 42, 43). El ovario consta de dos carpelos fusionados que forman un solo lóculo, la placentación es libre central y sostiene a numerosos óvulos anátropos y unitégmicos. La placenta es masiva de forma esférica, excepto en la zona en donde se une

a la columna, un tejido de contacto con el estilo y que facilita la entrada de los tubos polínicos al ovario, carácter presente en los tres taxa y nunca antes reportado (Fig. 44).

La pared del ovario joven presenta de 6 a 7 estratos celulares de naturaleza parenquimática, delimitados por una epidermis externa uniestratificada. Cerca de la antesis y durante la antesis algunos de los estratos celulares del ovario maduro presentan almidón y sus paredes se engrosan.



Figuras 38- 44. Flores en antesis con perianto removido y detalles de gineceo. 38. *Pinguicula esseriana*, flor atípica con estigma bifurcado desde su base (flecha). 39. *P. debbertiana*, estigma mostrando el labio mayor de forma discoidal con papilas estigmáticas, mientras que el labio menor semeja una punta. 40. *P. debbertiana*, se observan las papilas estigmáticas del labio mayor. 41. *P. debbertiana*, estigma joven con papilas (flecha). El canal estilar está delimitado por células con citoplasma denso (cabeza de flecha). 42. *P. ehlersiae*. Tricoma multicelular secretor del ovario, con una célula media cilíndrica (flecha) y células secretoras (cabeza de flecha). 43. *P. ehlersiae*. Tricoma multicelular del ovario, visto al MEB. 44. *P. debbertiana*. Ovario con placenta masiva, se observa la columna conectada al estilo (flecha). **A**, antera; **es**, estigma; **F**, filamento; **LM**, labio mayor; **Im**, labio menor; **O**, ovario.

Desarrollo de la antera, microsporogénesis y microgametogénesis

El primordio de la antera es uno de los primeros verticilos sexuales en diferenciarse, el cual, al principio es una masa de tejido indiferenciado rodeado por una protodermis uniestratificada. Las células subprotodérmicas que corresponden al tejido arquesporial son células de mayor tamaño y presentan núcleos evidentes. Una vez diferenciada la epidermis, las células arquesporiales se dividen periclinalmente para dar origen a dos capas celulares, la externa que corresponde a la capa parietal, y la interna al tejido esporógeno.

La capa parietal primaria se divide periclinalmente, lo que origina las capas parietales secundarias externa e interna. La interna se diferencia en células del tapete, mientras que la externa se divide nuevamente periclinalmente dando lugar a la capa media y al endotecio.

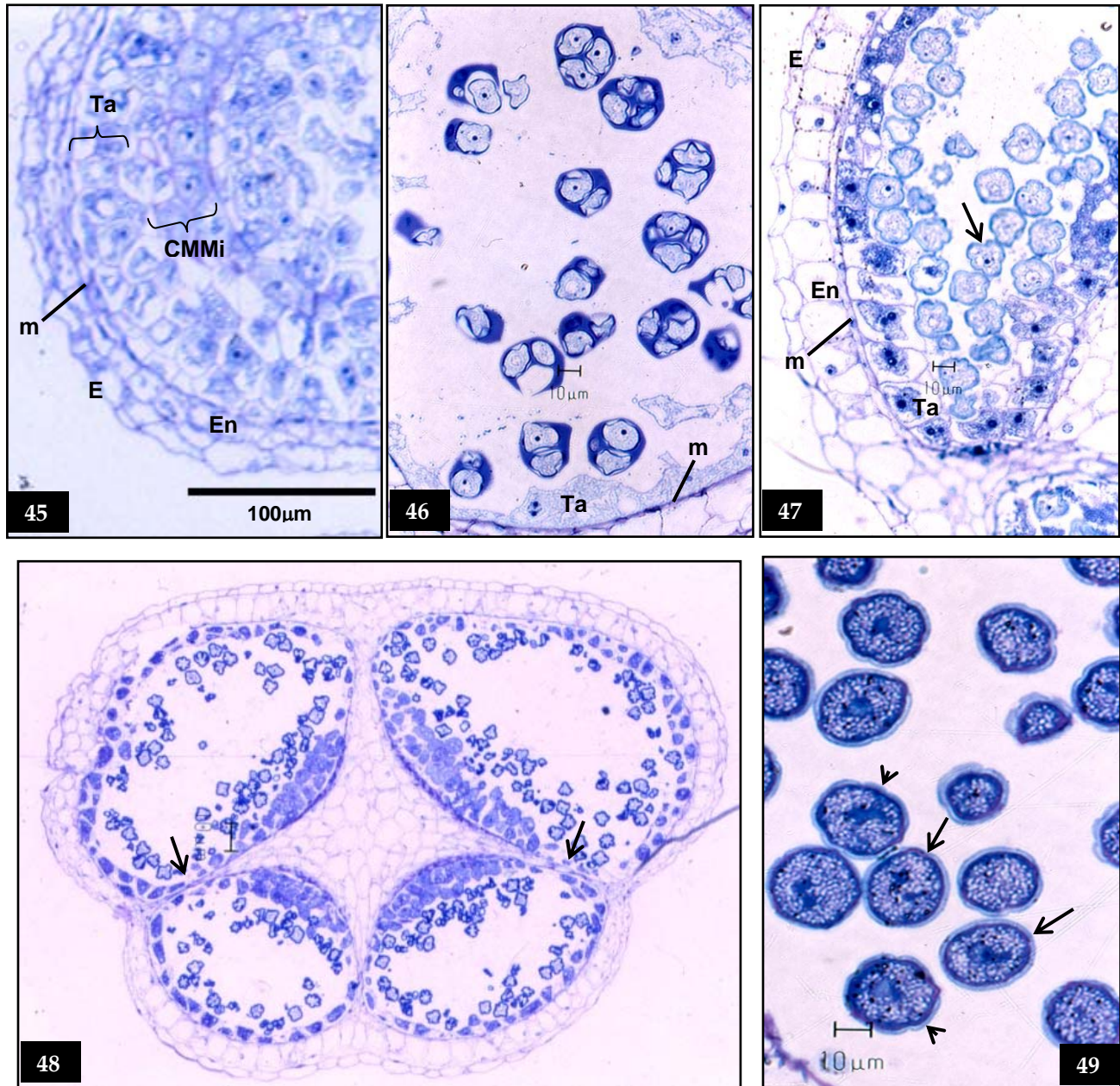
Por lo tanto la pared de la antera joven consiste de cuatro capas uniestratificadas y su desarrollo corresponde al tipo dicotiledóneo. Las capas que la conforman son: la epidermis, el endotecio, la capa media y el tapete de tipo secretor binucleado; simultáneamente con el desarrollo de la pared de la antera, el tejido esporógeno se diferencia en las células madres de las microsporas, rodeadas por las células del tapete (Fig. 45). Uno o más estratos celulares del tejido conectivo de la antera cercanos a cada microsporangio, toman las características morfológicas y funcionales de tejido tapetal incrementando su contenido citoplásmico. De tal manera que el tapete tiene dos orígenes, uno de ellos es de la capa parietal secundaria interna y el otro del tejido conectivo.

Las células madres de las microsporas se preparan para la meiosis depositando una gruesa capa de calosa a su alrededor. Como resultado de la meiosis se producen tétradas de microsporas de tipo tetraédrico rodeadas aún por calosa, también se observa el tapete que es binucleado y una capa media uniestratificada (Fig. 46). Cuando esta pared se degrada, se observan a las microsporas uninucleadas libres, y en este momento, las células del tapete alcanzan su máximo tamaño, los núcleos se hacen evidentes y el citoplasma es

más denso, lo que sugiere una intensa actividad metabólica. (Fig. 47). Las células del tapete tanto de origen parietal como del conectivo entran se desintegran, el contenido citoplásmico disminuye y las paredes celulares se hacen visiblemente más delgadas, las células de la capa media comienzan a colapsarse y quedan adosadas a los restos de las células tapetales; los granos de polen joven o microsporas, presentan ornamentaciones en sus paredes y un núcleo se hace evidente (Fig. 48). Parte del contenido citoplásmico del tapete se vierte al interior del esporangio y sus paredes celulares se adosan al endotecio, junto con la capa media.

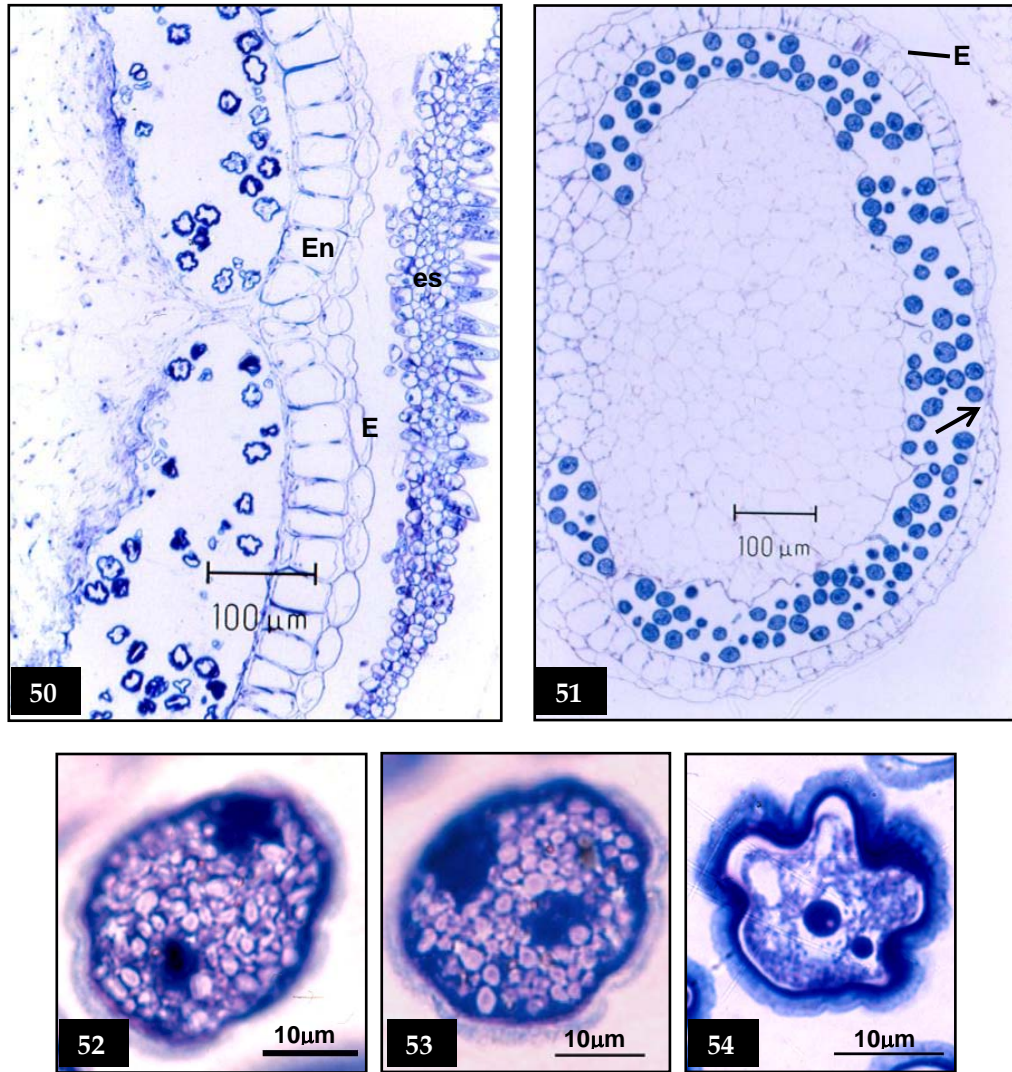
Posteriormente el grano de polen unicelular experimenta una división mitótica para dar origen a un grano de polen binucleado, conformado por una célula vegetativa y una célula generatriz (Fig. 49). Para este momento la pared de la antera consiste de una epidermis uniestratificada y el endotecio. Las células de este último tejido alcanzan su máximo desarrollo, se alargan radialmente y producen engrosamientos en forma de barra en la pared anticlinal y tangencial interna (Fig. 50). Los granos de polen maduros se dispersan y son bicelulares, salen por la línea de dehiscencia o estomio (Fig. 51).

El grano de polen binucleado, tiene un citoplasma denso con granos de almidón como en *Pinguicula debbertiana* (Fig. 52) y *P. ehlersiae* (Fig. 53), aunque en algunos casos el citoplasma es escaso o nulo como en *P. esseriana* (Fig. 54).



Figuras 45- 49. Desarrollo de la pared de la antera, microsporogénesis y microgametogénesis.

45. *Pinguicula esseriana*. Pared de la antera joven con: epidermis, endotecio, capa media y tapete, al centro las células madres de las microsporas. **46.** *P. esseriana*, Tétradras tetraédricas de microsporas cubiertas por calosa (flecha), con tapete binucleado y capa media uniestratificada. **47.** *P. esseriana*, lóculo de la antera con microsporas jóvenes (flecha), epidermis, endotecio y capa media uniestratificados, y tapete binucleado secretor. **48.** *P. esseriana*. Antera bilobulada tetrasporangiada, capa media en degeneración; los granos de polen jóvenes y unicelulares. El tejido del septo comienza a degradarse (flechas). **49.** *P. ehlersiae*. Granos de polen binucleados (flechas) y en división (cabeza de flecha). **CMMi**, célula madre de la microspora; **E**, epidermis; **En**, endotecio; **m**, capa media; **Ta**, tapete.



Figuras 50- 54. Pared de la antera madura y granos de polen binucleados. 50. *Pinguicula esseriana*, mostrando la pared de la antera casi madura con epidermis endotecio uniestratificados. Este último con engrosamientos en la pared anticlinal y tangencial interna. **51.** *P. debbertiana*. Lóbulo de una antera madura, se observan los granos de polen maduros y binucleados. Se señala la zona del estomio (flecha). **52.** *P. debbertiana*. Grano de polen maduro, se observan granos de almidón y los dos núcleos. **53.** *P. ehlersiae*, grano de polen maduro binucleado mostrando un citoplasma denso con granos de almidón **54.** *P. esseriana*. Grano de polen binucleado, se aprecia un citoplasma con almidón. E, epidermis; En, endotecio; es, estigma; Ta, tapete.

Morfología de los granos de polen

Para observar la morfología de los granos de polen de cada uno de los taxa se utilizó la microscopía electrónica de barrido (MEB), obteniendo los siguientes resultados:

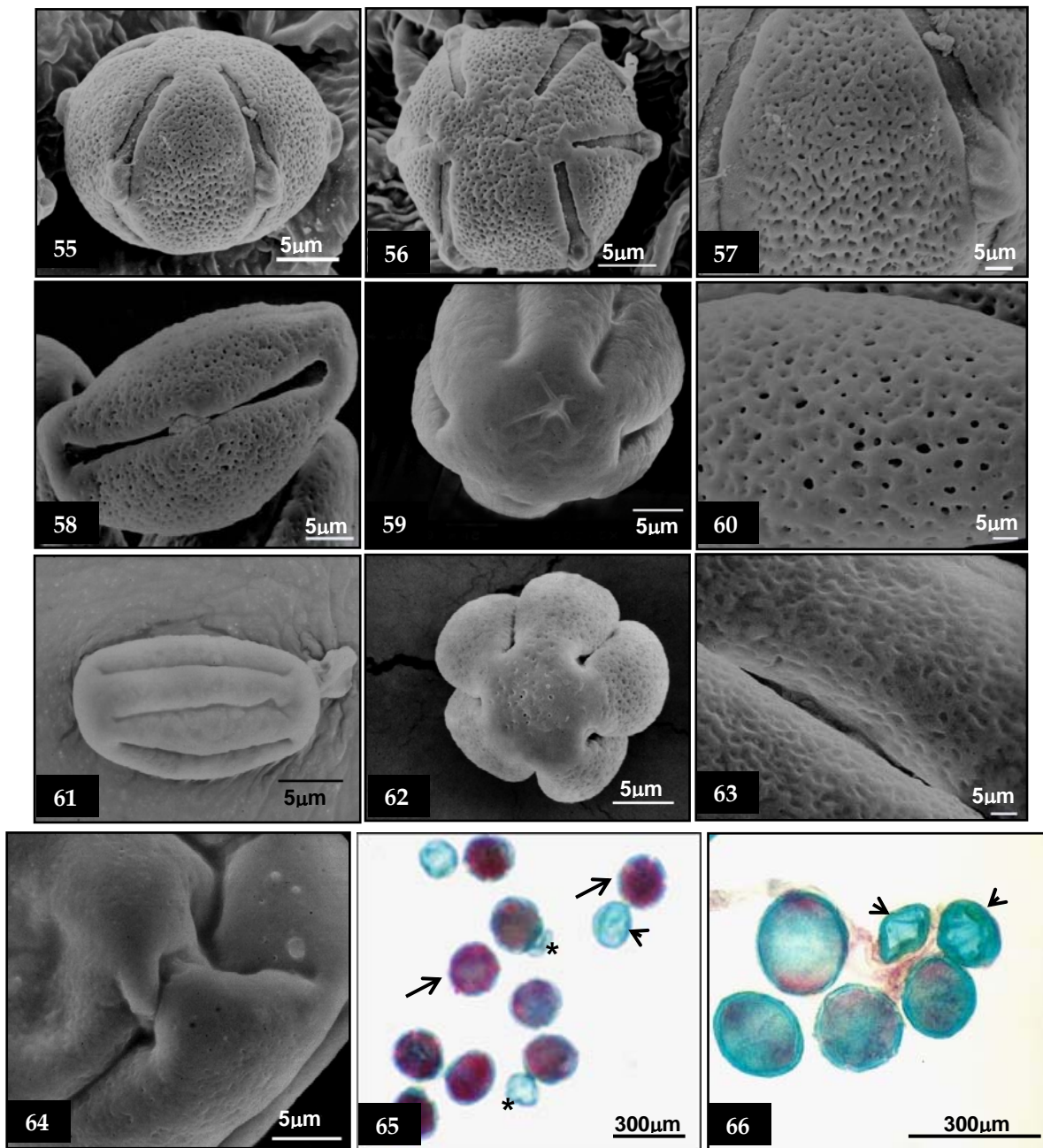
En *Pinguicula debbertiana* los granos de polen son oblatos a esféricos (Fig. 55), hexa-colporados con una vista polar hexagonal (Fig. 56). La ornamentación de la exina es tectada perforada (Fig. 57).

Pinguicula ehlersiae tiene granos de polen prolados y de forma suboblata (Fig. 58), con una vista polar hexagonal y penta a hexa-colporados (Fig. 59). La exina en el mismo grano de polen varía de tectada perforada en la zona ecuatorial a escasamente tectada perforada en la zona polar (Figs. 60).

En *P. esseriana* los granos de polen son prolados y de forma suboblata (Fig. 61), con una vista polar pentagonal y pueden ser penta a hexa-colporados (Fig. 62). La exina es tectada perforada (Fig. 63). Se observaron granos de polen amorfos, los cuales comprenden casi 40% de las muestras observadas mediante MEB (Fig. 64).

Viabilidad de los granos de polen

Al teñir varias muestras de polen fresco de catorce individuos de *Pinguicula esseriana* con tinción Alexander, se observó que los granos de polen anormales no absorbían el colorante y se veían vacíos, lo que prueba que el polen anormal carece de citoplasma o tiene solo una mínima cantidad, y aún entre los granos de polen de apariencia normal no en todos se observa el citoplasma (Figs. 65 y 66). Se contabilizaron 1524 granos de polen, de los cuales 903 son viables (59.25%) y 621 (40.74%) fueron no viables. Por lo que el porcentaje de granos de polen abortivos en *P. esseriana* (posible híbrido) es de 40.74%.



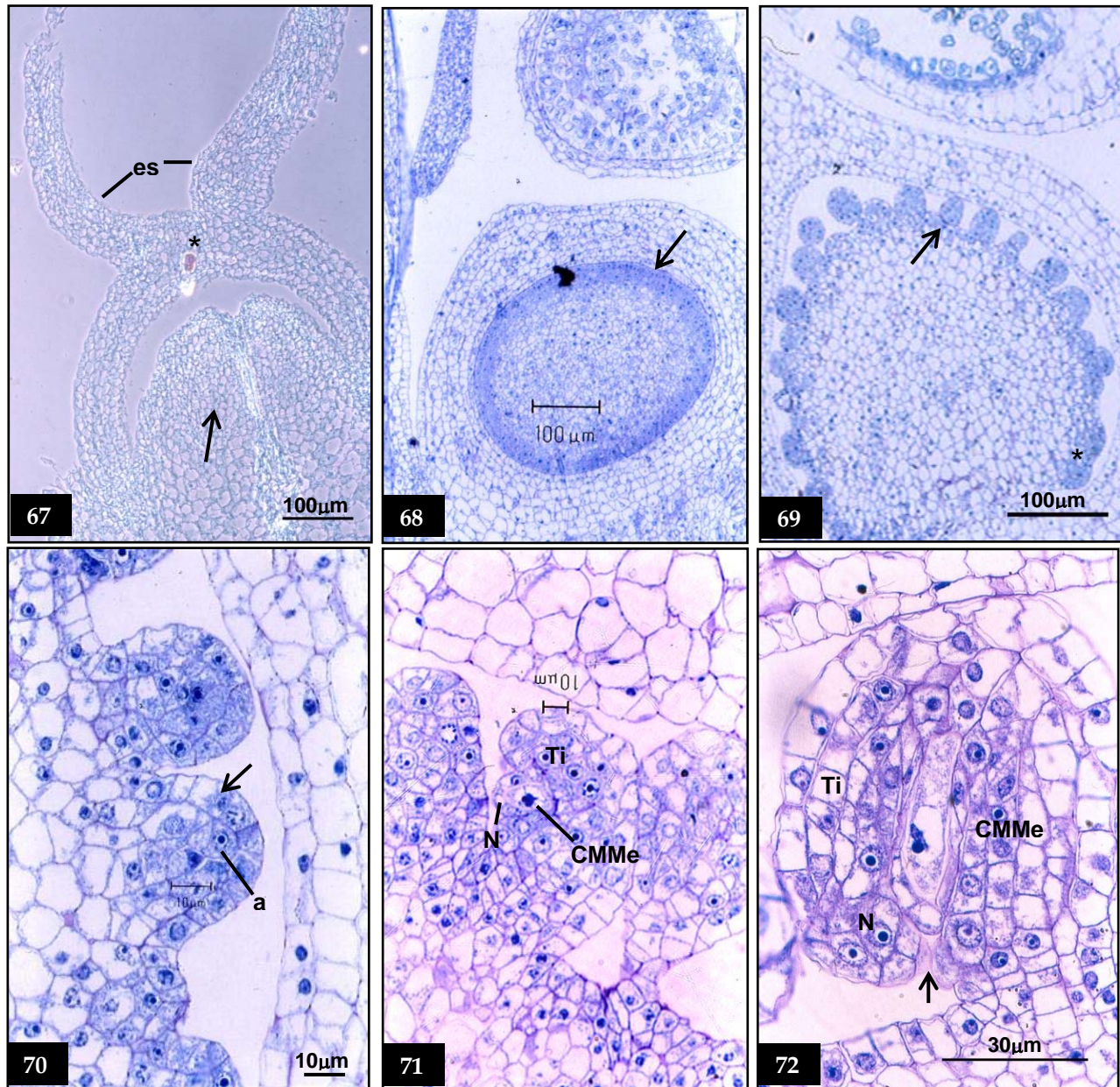
Figuras 55- 64. Micromorfología del grano de polen obtenida por MEB de los tres taxa y viabilidad de los granos de polen de *Pinguicula esseriana* con tinción de Alexander. 55. *P. debbertiana*. Vista ecuatorial del grano de polen oblado a esférico. 56. *P. debbertiana*. Vista polar del grano de polen hexa-colporado. 57. *P. debbertiana*. Acercamiento a la exina tectada perforada. 58. *P. ehlersiae*. Vista ecuatorial del grano de polen prolado y suboblato. 59. *P. ehlersiae*. Vista polar del grano de polen hexa-colporado. 60. *P. ehlersiae*. Acercamiento a la exina tectada perforada. 61. *P. esseriana*. Vista ecuatorial del grano de polen prolado y suboblato. 62. *P. esseriana*. Vista polar del grano de polen penta-colporado. 63. *P. esseriana*. Acercamiento a la exina tectada perforada. 64. *P. esseriana*. Acercamiento de un grano de polen abortivo y amorfo. 65 y 66. Viabilidad de polen de *P. esseriana* (posible híbrido natural). Granos de polen viables con el citoplasma teñido de rosa (flechas) y granos de polen carentes de citoplasma del mismo tamaño que los viables (cabeza de flecha) o de menor tamaño (*).

Desarrollo del gineceo

En botones florales jóvenes de las tres especies estudiadas, el gineceo presenta un estigma bilabiado que descansa sobre un estilo poco diferenciado, mientras que la placenta está embebida en un ovario con pared multiestratificada (Fig. 67). Las células externas de la placenta comienzan a diferenciarse mostrando un citoplasma denso, tejido precursor de los primordios ovulares (Fig. 68). Los primordios de óvulo ubicados en la zona apical de la placenta se encuentran en etapas más avanzadas del desarrollo, con respecto a los situados en la región basal, por lo que la maduración de los óvulos es asincrónica (Fig. 69).

La placenta inicia el desarrollo de pequeños primordios de óvulo, constituidos por tejido nucelar, el cual abarca de 2 a 3 estratos delimitados por una protodermis nucelar monoestratificada (Fig. 70). Es entonces cuando se diferencia la célula arquesporrial en posición hipodérmica que se caracteriza por ser de mayor tamaño con un núcleo evidente (Fig. 70).

A la par del crecimiento de los primordios de óvulo, estos comienzan a curvarse dirigiéndose hacia la placenta. Simultáneamente, surge el primordio del único tegumento a partir de las divisiones mitóticas de la epidermis nucelar del primordio ovular de la zona de la calaza. Este tegumento rodea a la nucela. La célula arquesporrial se diferencia directamente en la célula madre de la megaspora y se distingue por ser de mayor tamaño que el resto de las células (Fig. 71). El óvulo crece sobre un corto funículo y continúa curvándose, al mismo tiempo el tegumento ya diferenciado y constituido de 4-5 estratos celulares, rodea casi en su totalidad a la nucela uniestratificada, dejando un canal estrecho y corto que corresponde al micrópilo (Fig. 72).



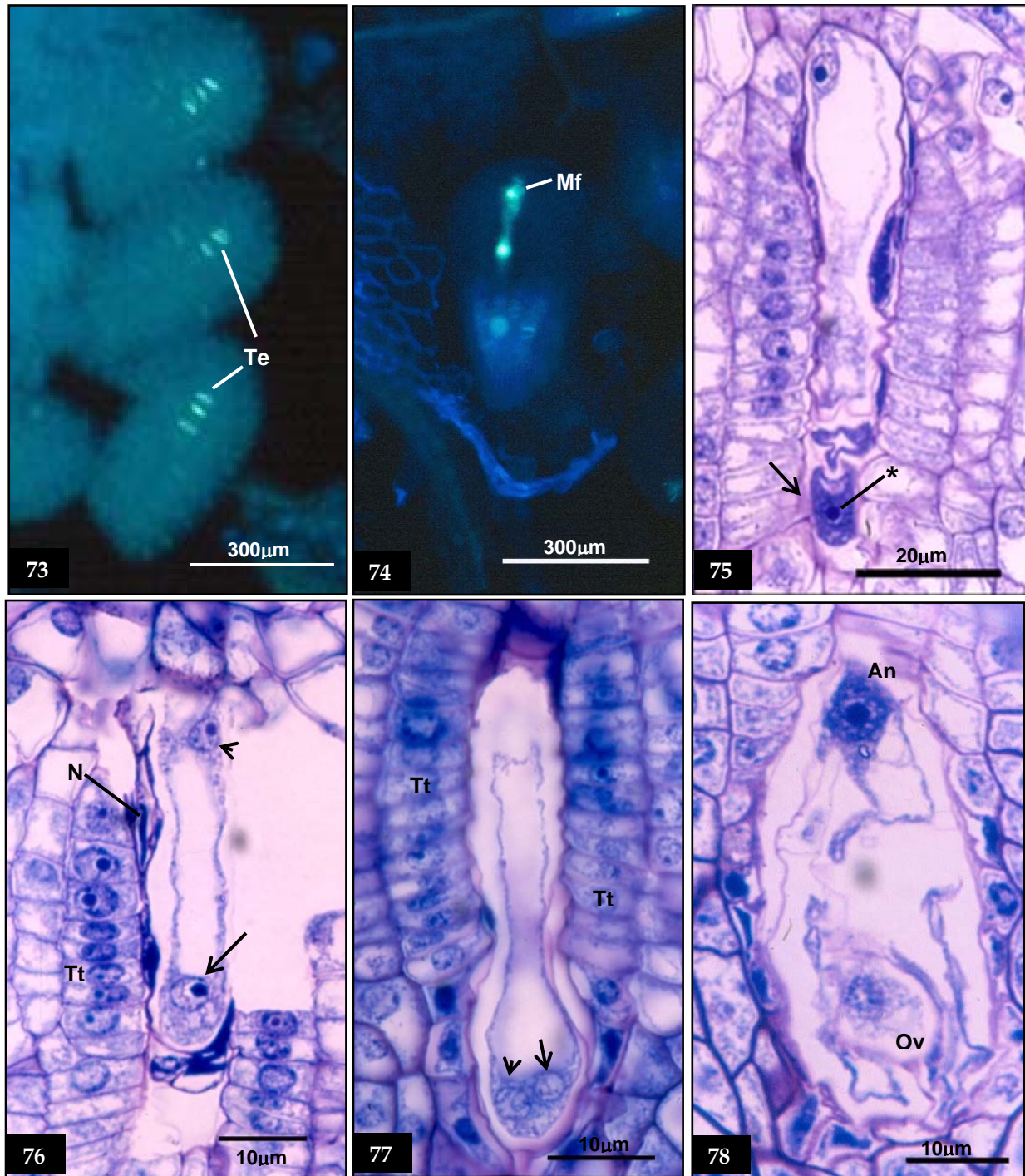
Figuras 67- 72. Desarrollo del óvulo y megasporogénesis. 67. *Pinguicula esseriana*. Ovario joven mostrando la pared multiestratificada, el estigma bilabiado sobre un estilo poco diferenciado (*) y la placenta (flecha). 68. *P. esseriana*. Placenta de ovario joven, se observa una diferenciación celular provocada por el tejido precursor de los primordios ovulares (flecha). 69. *P. debbertiana*. Ovario con primordios ovulares en diversas etapas de desarrollo, la flecha señala los óvulos más avanzados y el asterisco (*) los menos avanzados en su diferenciación. 70. *P. ehlersiae*. Primordios ovulares con protodermis uniestratificada (flecha) y célula arquesporial subprotodérmica. 71. *P. esseriana*. Se observa el primordio del único tegumento biestratificado, que cubre a la célula madre de la megaspóra. 72. *P. esseriana*. Ovulo anátropo y unitégmico en etapa de célula madre de la megaspóra. Se muestra una nucela uniestratificada, el tegumento con cuatro o cinco estratos celulares y el micrópilo (flecha). a, célula arquerporial; CMMe, célula madre de la megaspóra; es, estigma; N, nucela; T, tegumento

Megasporogénesis

En esta etapa ocurre la meiosis de la célula madre de la megaspora (CMMMe), la cual forma una pared entre cada una de las megasporas, y se origina a una tétrada linear de megasporas (Fig. 73).

De la tétrada linear, las tres megasporas localizadas hacia la región micropilar degeneran, mientras que la ubicada hacia la zona calazal es la que actúa como la megaspora funcional (Fig. 74), que dará origen al saco embrionario monospórico de tipo *Polygonum*. A la par del desarrollo del saco embrionario hay una diferenciación gradual de las células de la epidermis interna del tegumento alrededor del saco embrionario. Ésta da lugar a un tapete tegumentario que consiste de células rectangulares arregladas perpendicularmente al eje micropilo - cálaza. El tejido nucelar se consume durante el desarrollo del saco embrionario y los restos de este tejido quedan adosados al tapete tegumentario (Fig. 75), cuando el saco embrionario madura, el tapete tegumentario se degrada iniciando dicho proceso en la zona micropilar.

La megaspora funcional experimenta la primera división mitótica, dando origen a dos núcleos, cada uno migrará hacia un polo (calazal y micropilar); aquí la nucela es escasa y se hace más evidente la formación del tapete tegumentario (Fig. 76). Seguidamente, empieza la segunda división mitótica y la degeneración del tapete tegumentario hacia la zona micropilar (Fig. 77), y finalmente ocurre la tercera y última división mitótica. El resultado final es un saco embrionario maduro que consiste en tres células antípodas localizadas en la zona calazal, una célula central binucleada y hacia la zona micropilar el aparato de huevo conformado por dos sinérgidas y el gameto femenino u ovocélula (Fig. 78). El óvulo es anátropo, unitégmico, teninucelado con un funículo corto.



Figuras 73- 78. Megasporogénesis. 73. *Pinguicula enseriana*, se muestran las paredes de calosa fluoresciendo, estas separan a las megasporas de la tétrada. 74. *P. enseriana*. Se observa la megaspóra funcional fluoresciendo hacia la zona calazal y la degeneración del resto de las megasporas. 75. *P. enseriana*, se observan restos de las tres megasporas micropilares (*), la nucela en degeneración (flecha), y la diferenciación del tapete tegumentario. 76. *P. debbertiana*. Primera división mitótica de la megaspóra funcional con un núcleo en el extremo micropilar (flecha) y otro en el calazal (Cabeza de flecha), y se muestran los restos de la nucela rodeada por el tapete tegumentario. 77. *P. debbertiana*. Se observan hacia el extremo micropilar sólo dos núcleos (cabezas

de flechas), las flechas señalan el tapete tegumentario en degeneración. 78. *P. debbertiana*. Se muestra un saco embrionario con la ovocélula hacia la región micropilar y las antípodas hacia la cálaza. **An**, antípoda; **Mf**, megaspora funcional; **N**, nucela; **Ov**, ovocélula; **Te**, tétrada de megasporas; **Tt**, tapete tegumentario.

Germinación de granos de polen dentro de las anteras

Durante el conteo de los granos de polen y de las pruebas realizadas con fluorescencia en las especies *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana* (posible híbrido natural), así como del material procesado para ser observado en MEB se detectó la ocurrencia de germinación natural de granos de polen dentro de la antera (Figs. 79 a 85). Lo cual se convierte en una evidencia de posibles eventos de autopolinización en estas taxa.

Polinizaciones manuales

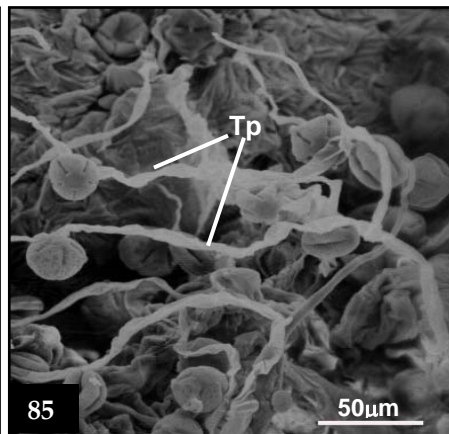
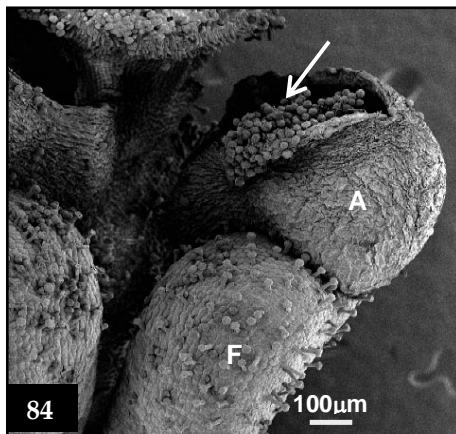
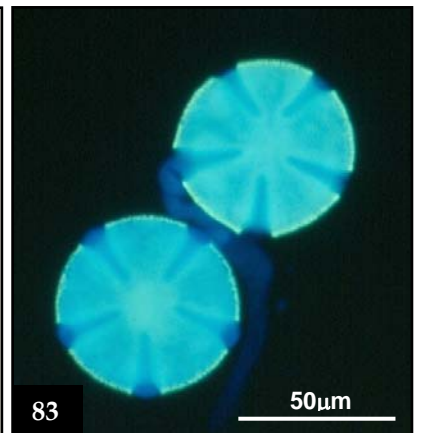
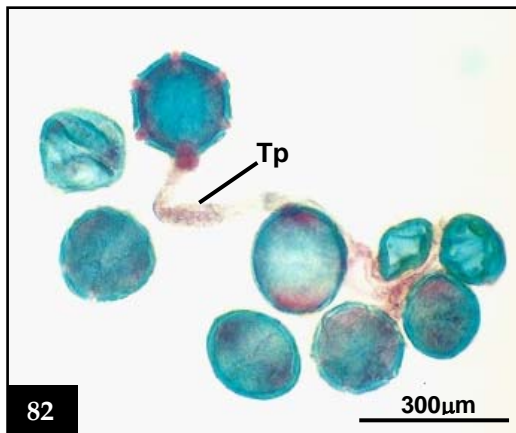
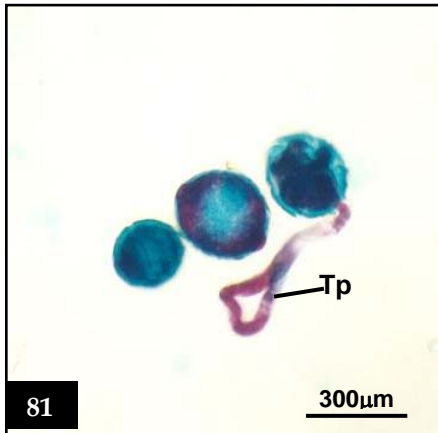
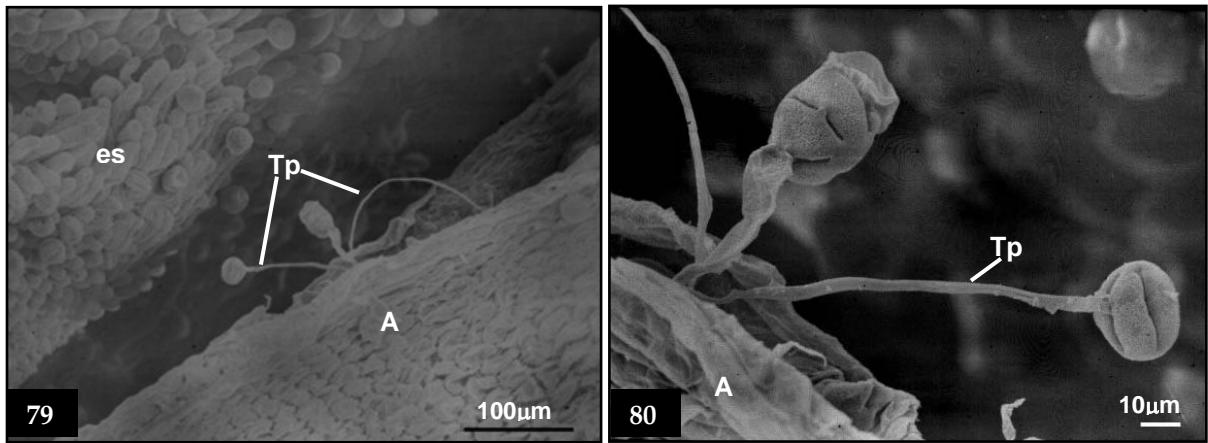
Los resultados de las polinizaciones manuales entre *Pinguicula debbertiana* y *P. ehlersiae*, y entre individuos de la especie híbrida (*P. esseriana*), se analizaron desde la germinación de los granos de polen sobre el estigma (zona 1, Fig. 86), el recorrido de los tubos polínicos a lo largo del estilo (zona 2, Fig. 86), hasta su llegada a la placenta (zona 3, Fig. 86).

Pinguicula esseriana

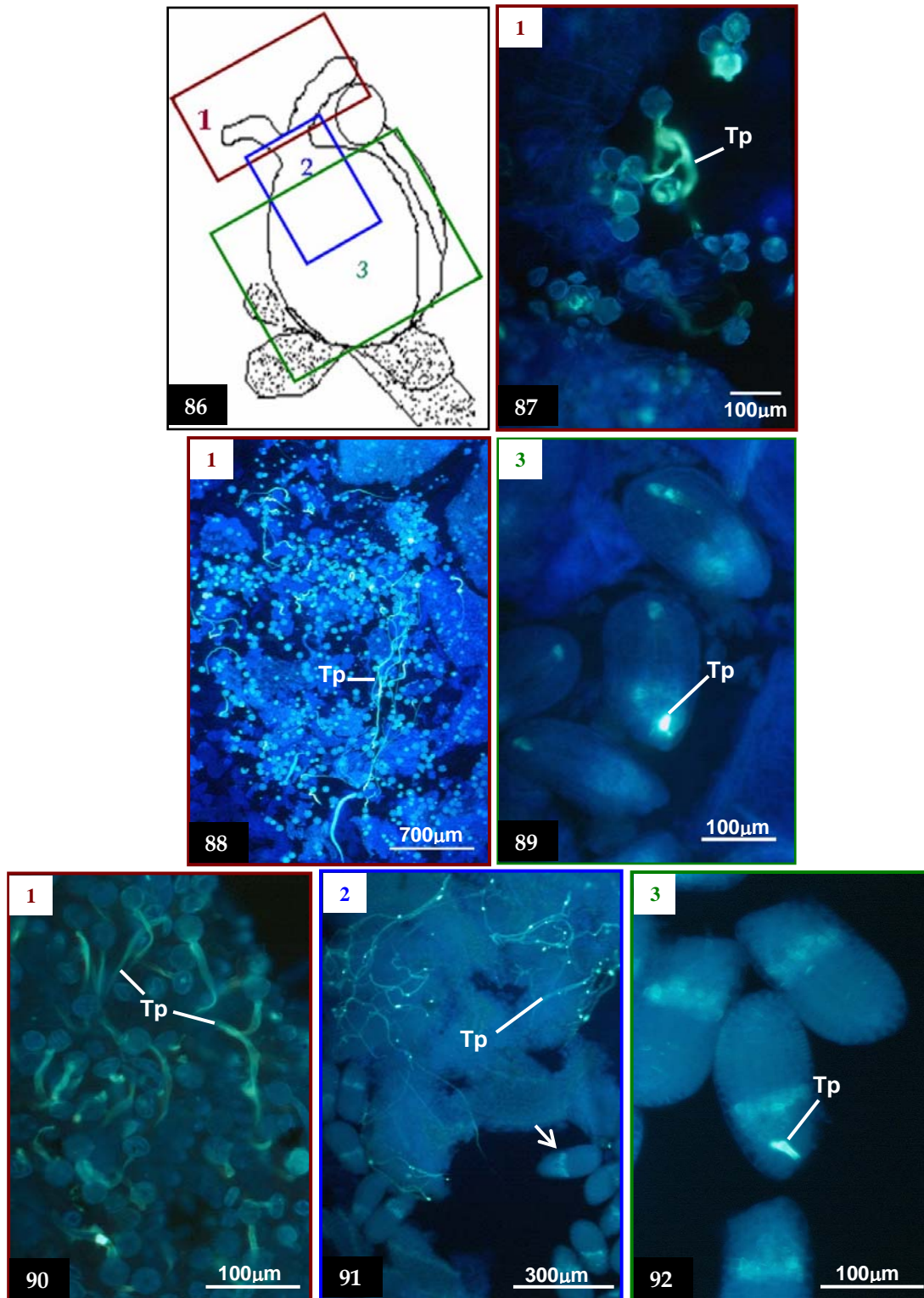
Se observó que a dos horas post-polinización los tubos polínicos son cortos y todavía se localiza en el tejido del estigma (Fig. 87). A tres horas de la polinización se observó una mayor longitud de los tubos polínicos, tiempo requerido para alcanzar la placenta (Fig. 88), e incluso llegar hasta los óvulos, entrar por el micrópilo y llevar a cabo la fecundación (Fig. 89).

Pinguicula debbertiana y *P. ehlersiae*

En el caso de la polinización cruzada a entre *P. debbertiana* x *P. ehlersiae* a tres horas de haber realizado la polinización, se observaron tubos polínicos de gran longitud dentro del tejido estigmático (Fig. 90), en el tejido estilar y la placenta (Fig. 91), así como al interior del óvulo (Fig. 92), lo cual afirmaría la posibilidad de que la hibridación entre estas especies sí puede ocurrir.



Figuras 79- 85. Geminación *in situ* de los granos de polen. 79. *Pinguicula esseriana*. Se observan granos de polen germinación dentro de la antera dehiscente de flores en antesis, así como granos de polen adheridos a las papilas estigmáticas adaxiales. 80. *P. esseriana*. Acercamiento de los granos de polen germinado al interior de la antera dehiscente. 81. y 82. *P. esseriana*, se muestran tubos polínicos teñidos con la tinción Alexander (flechas) y extraídos de anteras frescas dehiscentes. 83. *P. debbertiana*, se observa el desarrollo del tubo polínicos. 84 y 85. *P. ehlersiae*. Germinación de tubos polínicos dentro de la antera dehiscente y en dirección a la zona abaxial del labio mayor del estigma. A, antera; es, estigma; F, filamento; Tp, tubos polínicos.



Figuras 86 - 92. "Squash" de polinizaciones cruzadas hechas manualmente, el número superior izquierdo se refiere al nivel de corte. 86. Esquema que representa el nivel de corte (zona 1, estigma; zona 2 estilo-ovario; zona 3 placenta-óvulo). 87. *Pinguicula esseriana* x *P. esseriana*, se observan tubos polínicos cortos localizados a nivel del estigma a dos horas de la polinización.

88. *P. esseriana x P. esseriana*, se muestran tubos polínicos creciendo sobre la placenta a tres horas de la polinización. **89.** *P. esseriana x P. esseriana*. Entrada del tubo polínico al óvulo por el micrópilo a tres horas de la polinización. **90.** *P. debbertiana x P. ehlersiae*, se muestran los tubos polínicos sobre el tejido del estigma y el estilo. **91.** *P. debbertiana x P. ehlersiae*. Crecimiento de tubos polínicos en la placenta y en dirección a los óvulos (flecha). **92.** *P. debbertiana x P. ehlersiae*. Entrada del tubo polínico al óvulo. **Tp**, Tubos polínicos.

Formación del haustorio antipodal, fecundación y desarrollo de la semilla

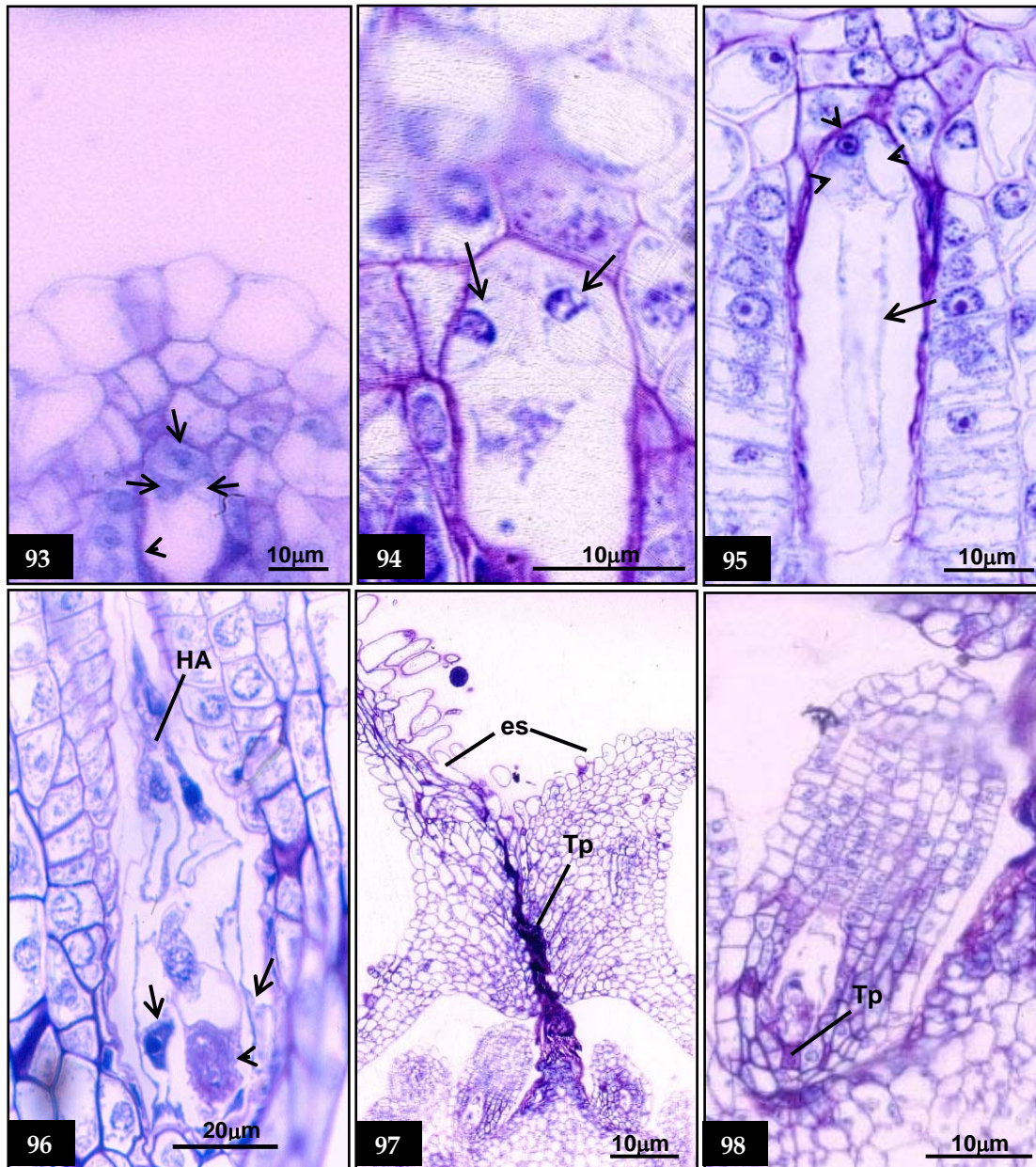
Se observó algo que llamó la atención, durante la maduración del saco embrionario y hasta la formación del endospermo comienza la diferenciación de un tejido que surge en la zona calazal y originado a partir de las tres antípodas, ya que la nucela está en degeneración (Fig. 93). Las antípodas comienzan a aumentar de tamaño presentando un citoplasma denso y un núcleo evidente (Fig. 94). Posteriormente hay una diferenciación y una de las tres antípodas empieza a alargarse y forma un citoplasma dirigido hacia la zona micropilar, algunas veces desplazando el citoplasma de la célula central (Fig. 95). Las antípodas comienzan a dividirse a tasas diferentes formando un tejido haustorial de células alargadas y digitiformes con un núcleo evidente, a lo que se llamó haustorio antipodal (Fig. 96).

Los tubos polínicos crecen a través del tejido estigmático y el canal estilar, cruzan la columna placentaria y se dirigen a los óvulos (Fig. 97). La fecundación es de tipo porógama (Fig. 98). Una vez que el tubo polínico entra al óvulo y descarga las células espermáticas, las sinérgidas se colapsan y degeneran. Mientras los núcleos polares de la célula central ya se han fusionado y están listos para la triple fusión con uno de los núcleos espermáticos. Como resultado de la doble fecundación se observa al núcleo primario del endospermo y al cigoto. El tejido haustorial crece en dirección al cigoto (Fig. 99). A partir de la fecundación y durante el desarrollo de la semilla el tapete tegumentario degenera gradualmente en dirección micrópilo-calaza, mientras que el haustorio antipodal crece, pasando lateralmente por el núcleo primario del endospermo y llegando a la zona micropilar (Fig. 100). En las primeras etapas de la degeneración del tapete tegumentario comienzan a formarse una cámara endospermica calazal y una cámara endospermica micropilar respectivamente.

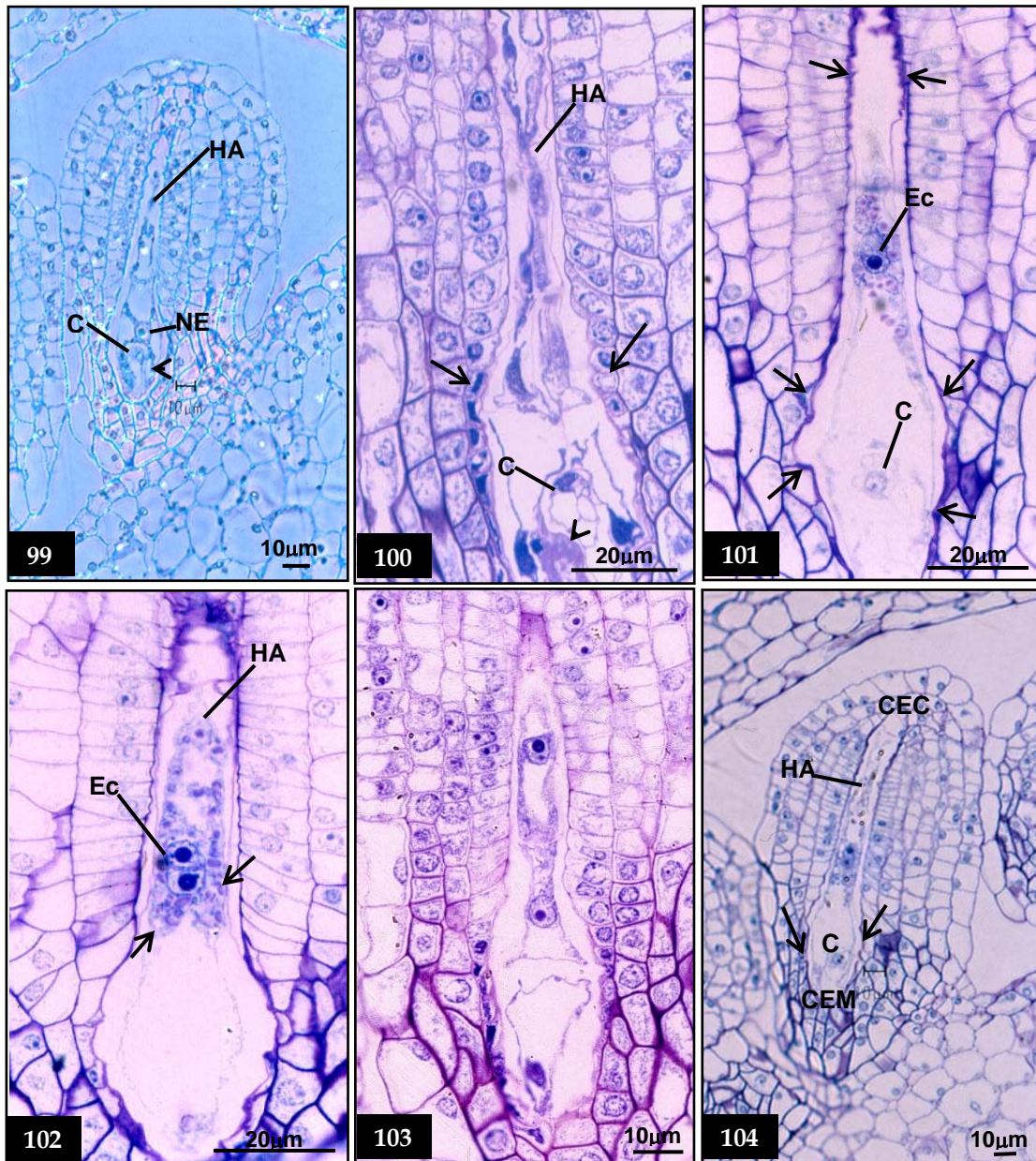
Endospermogénesis

Una vez realizada la triple fusión, el núcleo primario del endospermo se encuentra rodeado por un citoplasma compuesto por granos de almidón y es evidente la formación de ambas cámaras endospérmicas, superando en tamaño la micropilar respecto a la calazal (Fig. 101). El tejido haustorial invade la zona del micrópilo.

Posteriormente, el núcleo primario del endospermo se divide transversalmente dando origen a dos células de gran tamaño, separadas por una pared celular (Fig. 102), lo cual indica que el desarrollo del endospermo es del tipo celular. Las células de este tejido se alargan presentando un citoplasma denso (Fig. 103). Posteriormente estas células se dividen transversalmente formando un endospermo de cuatro células ubicadas en un principio en el centro del saco embrionario y rodeadas de las células del haustorio antipodal (Fig. 104).



Figuras 93 - 98. Formación del haustorio antipodal y fecundación. 93. *Pinguicula ehlersiae*, se muestran las tres antípodas (flechas), localizadas en la zona calazal. 94. *P. debbertiana*. Las antípodas son de gran tamaño y el citoplasma es denso (flechas). 95. *P. ehlersiae*, diferenciación antipodal, una de las tres antípodas comienza a alargarse en dirección a la zona micropilar (flecha), las otras conservan su posición (cabezas de flecha). 96. *P. debbertiana*. El haustorio antipodal (HA) de células digitiformes alcanza la zona micropilar (flechas), los núcleos polares ya se han fusionado (cabeza de flecha). 97. *P. debbertiana*. recorrido de los tubos polínicos a través del estigma, estilo y columna placentaria en dirección a los óvulos. 98. *P. debbertiana*, se muestra la fecundación de tipo parógama. es, estigma; HA, haustorio calazal antipodal; Tp, tubos polínico



Figuras 99 - 104. Desarrollo de la semilla. 99. *P. debbertiana*, se observa el núcleo primario del endospermo, el cigoto, una sinérgida en degeneración (cabeza de flecha) y el HA desde la cálaza hasta el micrópilo. 100. *P. debbertiana*. Se muestra el cigoto, la degeneración del tapete tegumentario (flechas) y de una sinérgida (cabeza de flecha); el HA formado por células digitiformes hasta el micrópilo. 101. *P. ehlersiae*. El núcleo primario del endospermo rodeado con granos de almidón. Se evidencian las cámaras endospérmicas (flechas). 102. *P. ehlersiae*. Primera división del endospermo celular. El HA presenta numerosos núcleos. 103. *P. debbertiana*, se muestran las primeras células del endospermo, alargadas y con un citoplasma denso. 104. *P. ehlersiae*, se observan las cámaras endospérmicas calazal y micropilar, al centro el endospermo de cuatro células; el cigoto y la degeneración del tapete tegumentario (flechas). Las células del haustorio abarcan la zona micropilar y calazal, formado por múltiples núcleos. C, cigoto; CEC, cámara endospérmica calazal; CEM, cámara endospérmica micropilar; Ec, endospermo celular; HA, haustorio calazal antipodal; Ne, núcleo primario del endospermo.

Embriogénesis

La primera división del cigoto es transversal, dando origen a la célula apical y la célula basal, esta última se divide una vez más en plano transversal y da origen a dos células superpuestas.

La célula de posición más basal origina al suspensor, mientras que la célula adyacente a la célula apical, es pequeña y rectangular y se divide longitudinalmente para dar origen a las células que separan al suspensor del cuerpo del embrión. En las células del endospermo, se observan divisiones longitudinales principalmente en la región micropilar.

Al mismo tiempo las células del cuerpo del embrión tienen divisiones principalmente longitudinales, observándose la etapa de cuadrante (Fig. 99). Posteriormente, en las células del embrión ocurren divisiones transversales y tangenciales, lo que origina un embrión globular (Figs. 100-101). En este momento las células del suspensor empiezan a colapsarse.

El fruto maduro es capsular, constituido por la epidermis y de seis a siete estratos con engrosamientos celulósicos que al deshidratarse permiten la dehiscencia del fruto liberando numerosas semillas que descansan sobre una columna (Fig. 102). Se observó en *Pinguicula ehlersiae* y *P. esseriana* la presencia de semillas abortivas. La primera especie presenta semillas carentes de embrión y en forma de gota (Fig. 102), mientras que en *P. esseriana* pueden ser de forma y tamaño normal pero con la testa colapsada y carentes de embrión (Fig. 103) o amorfa, de menor tamaño (0.5 mm-0.7 mm por 0.14 mm-0.2 mm y con testa ligeramente reticulada (Fig. 104).

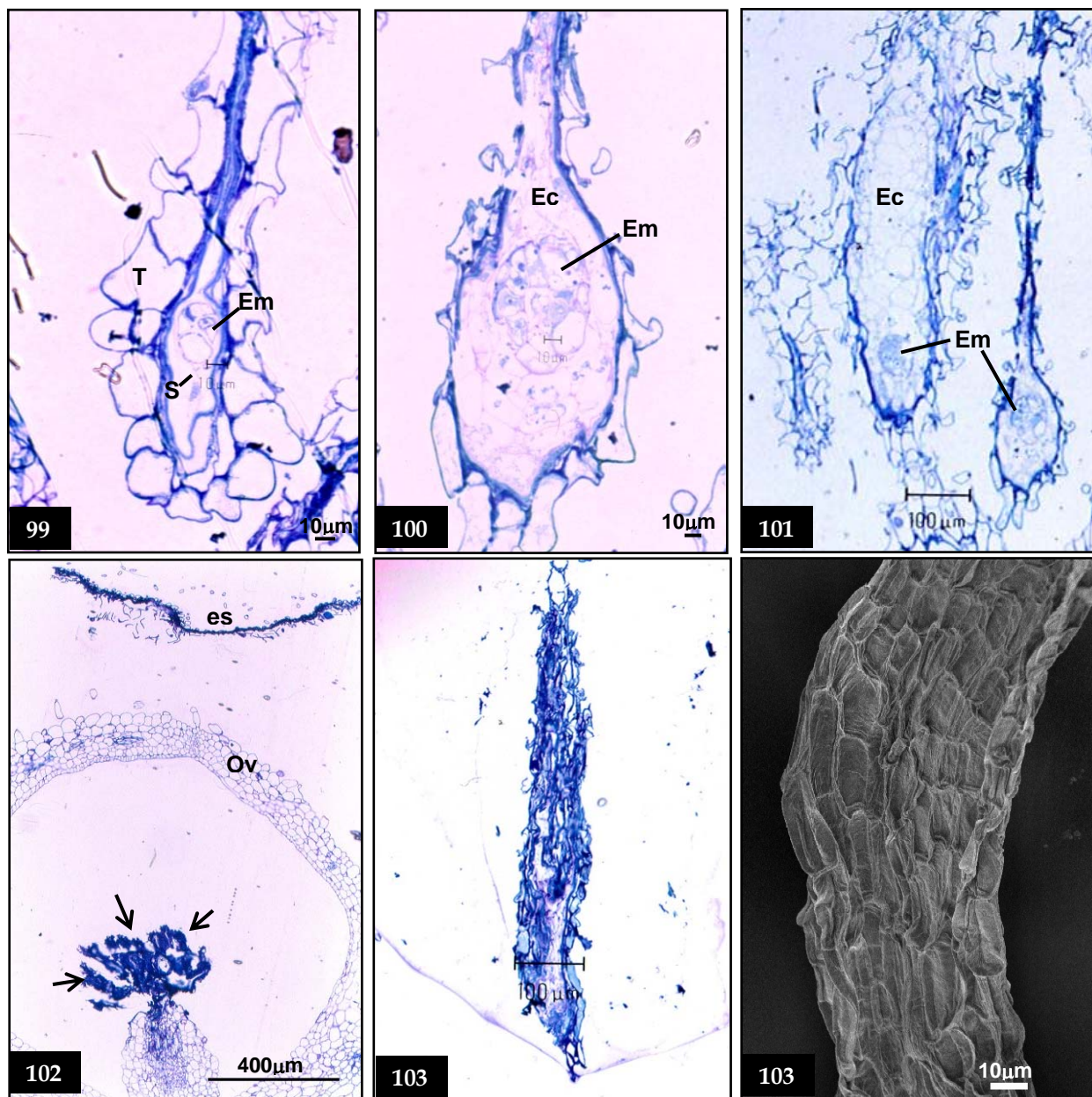
En los tres taxa, la cubierta seminal en una semilla madura está constituida solamente por la epidermis externa del tegumento, los restos de los estratos se observan entre las células del endospermo y la testa. El endospermo se reduce durante las etapas finales del desarrollo del embrión a una sola capa uniestratificada que rodea al embrión.

Las semillas de *Pinguicula debbertiana* miden en promedio 1 a 1.4 mm de largo por 0.3 a 0.4 mm de ancho, son cilíndricas, delgadas hacia la zona calazal (Fig. 105), de color café.

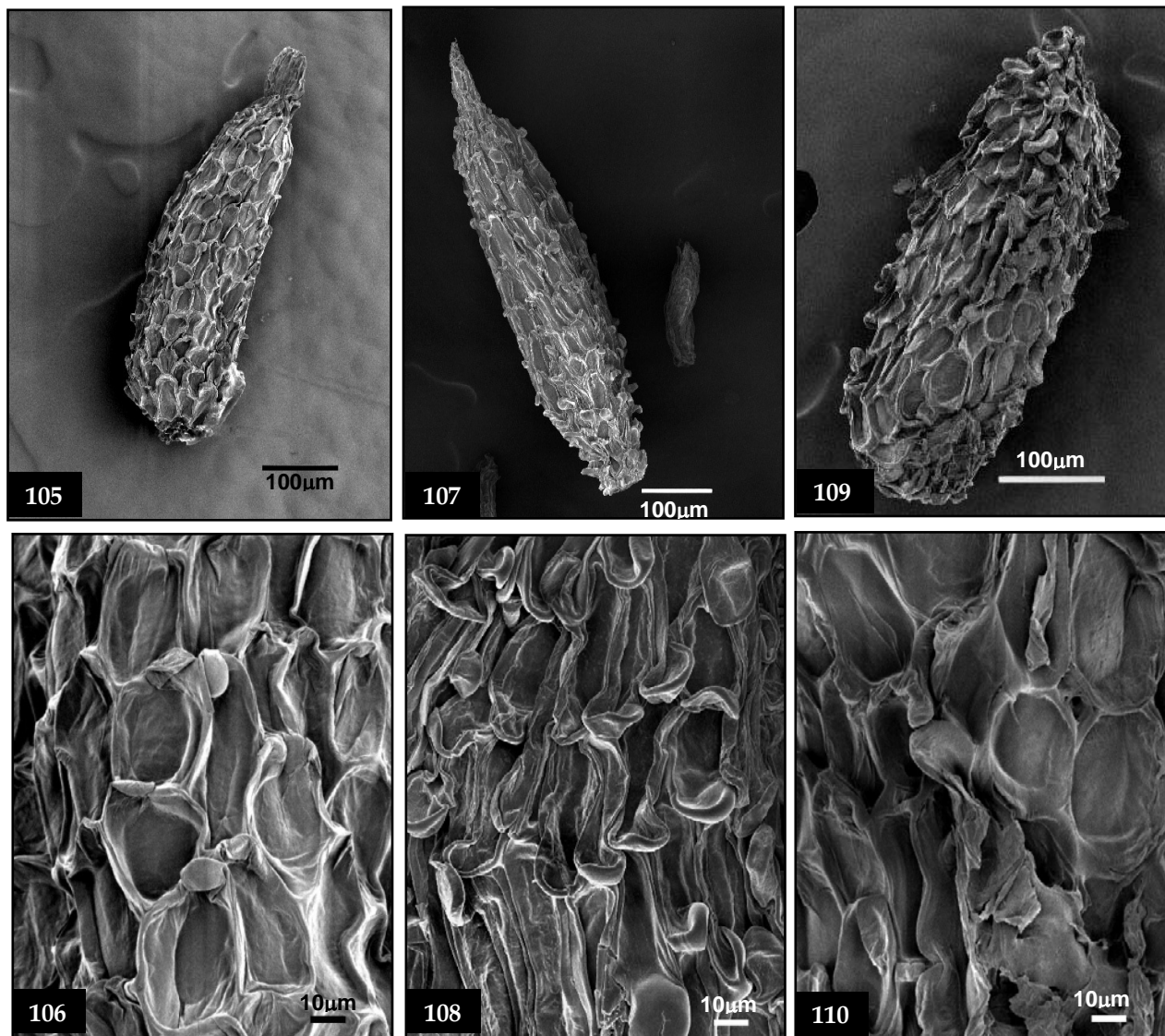
La testa es reticulada y está formada por hileras longitudinales de células ovaladas que tienen paredes anticlinales uniformemente engrosadas, las que marcan los límites celulares, presentan verrugas o papilas. Las paredes periclinales externas tienen cutícula lisa y están ligeramente hundidas (Fig. 106).

En *P. ehlersiae* las semillas maduras miden en promedio 0.5 a 1 mm de largo por 0.3-0.4 mm de ancho, de forma cilíndrica más delgada hacia la zona calazal (Fig. 107). Son de color café. La superficie de la cubierta seminal es reticulada formada de células ovaladas que tienen paredes anticlinales uniformemente engrosadas, con verrugas o papilas. Las paredes periclinales externas tienen cutícula lisa y están ligeramente hundidas (Fig. 108).

En *P. esseriana* (híbrido), las semillas maduras miden en promedio 0.5 mm - 0.7 mm de largo por 0.03 - 0.2 mm de ancho, las semillas son de forma cilíndrica, ligeramente adelgazadas en la zona micropilar y fuertemente adelgazadas hacia la zona calazal y son de color café (Fig. 109). La testa es reticulada y presenta células ovaladas con paredes anticlinales fuertemente engrosadas, con verrugas o papilas. Las paredes periclinales externas son ligeramente hundidas y presentan una la cutícula lisa (Fig. 110).



Figuras 99 - 104. Desarrollo de las semillas. 99. *Pinguicula esseriana*. Se muestra el embrión de cuatro células y el suspensor que lo sostiene, rodeados por una testa uniestratificada. 100. *P. ehlersiae*. Corte longitudinal de semilla con embrión globular, rodeado de un endospermo celular, se observa la testa uniestratificada. 101. *P. ehlersiae*. Corte longitudinal de semillas, se observa el endospermo celular y el embrión. Las semillas tienen formas de gota (inferior derecho) o cilíndricas (superior izquierdo). 102. *P. ehlersiae*. Fruto abortivo, mostrando restos del estigma. La pared del ovario que presenta de seis a siete estratos, en su interior se observa una placenta reducida, con algunas semillas abortivas (flechas). 103. *P. esseriana*. Semilla abortiva o no viable, se observan los estratos de la testa colapsados y carece de embrión. 104. *P. esseriana*. Semilla abortiva con testa ligeramente reticulada. Ec, endospermo celular; Em, embrión; es, estigma; Ov, Ovario; P, placenta; T, testa



Figuras 105 - 110. Morfología de semillas vistas al MEB. 105. *Pinguicula debbertiana*. Semilla viable, cilíndrica, delgada hacia la zona micropilar. **106.** *P. debbertiana*. Cubierta seminal reticulada y formada por hileras longitudinales de células ovaladas con paredes anticlinales uniformemente engrosadas, con papilas o verrugas; las paredes periclinales externas tienen cutículas lisas y están ligeramente hundidas. **107.** *P. ehlersiae*. Semilla viable de forma cilíndrica, más delgada hacia la zona micropilar. **108.** *P. ehlersiae*. Testa reticulada con células ovaladas, las cuales tienen paredes anticlinales uniformemente engrosadas, con verrugas. Las paredes periclinales externas tienen cutícula lisa y están ligeramente hundidas. **109.** *P. esseriana*. Semilla viable, cilíndrica, ligeramente adelgazada en la zona calazal y fuertemente delgada hacia la región micropilar. **110.** *P. esseriana*. Cubierta seminal reticulada, presenta células ovaladas con paredes anticlinales engrosadas, con verrugas. Las paredes periclinales están ligeramente hundidas y tiene una cutícula lisa.

VIII. DISCUSIÓN

La embriología del género *Pinguicula* no ha sido completamente estudiada, ya que hay aspectos del desarrollo de las estructuras reproductoras tanto masculinas como femeninas que no han sido descritas con detalle o la información es escasa. Por lo antes expuesto la discusión se basa principalmente en los resultados obtenidos por Espinosa (2005) y Espinosa *et al.*, (2005) y en estudios embriológicos y morfológicos realizados en el género *Utricularia* y así como en los estudios de evolución que señalan a *Pinguicula* como el grupo hermano del clado formado por *Utricularia* y *Gensilea* (Jobson y Albert, 2002; Jobson *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que las características morfológicas encontradas en las especies estudiadas en este trabajo, que demuestran las similitudes y diferencias que comparten estas taxa y permiten evidenciar la relación que hay entre *P. esseriana*, considerada como posible híbrido y aquellas especies propuestas como sus progenitores, *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*. Las alteraciones estructurales y morfológicas encontradas en *P. esseriana* respaldan la hipótesis de su posible origen híbrido, planteada inicialmente por Zamudio (2001) y de la cual surge la presente investigación.

Perianto

En la sección *Orcheosanthus*, la corola de las flores en antesis, se caracteriza por tener lóbulos de forma y tamaño constantes en individuos de una misma población. Es importante señalar que algunas especies como *P. moranensis*, las flores presentan un gran número de variantes tanto en color como en forma y tamaño de sus lóbulos, las cuales se aprecian comparando las localidades (Zamudio, 2001, 2005). Sin embargo en la población de *P. esseriana*, localizada en el parador Tepozán, se observaron variantes muy marcadas, como flores que presentan lóbulos ovobados- cuneados, oblongos y oblatos. Mientras que el tamaño de la flor varía desde 24 hasta 42 mm. Esta extraordinaria variación

anteriormente había sido reportada por Zamudio (2001, 2005) y es una de las características que respaldan el posible origen híbrido de *P. esseriana*.

Anteriormente han sido reportadas variantes morfológicas en flores de híbridos interespecíficos de *Pinguicula*, o variedades, o especies de este género, los cuales van desde aquellos con dos lóbulos (*P. jaumavensis* x *P. cyclosecta*), 4 lóbulos (*P. poldinii*, *P. heterophylla*, ***P. esseriana***), 6 lóbulos (*P. grandiflora* subsp. *grandiflora*, *P. fiorii*, *P. "weser"*, *P. "hans"*, *P. crystallina* subsp. *hirtiflora*, ***P. esseriana***, ***P. ehlersiae***), 7 lóbulos (*P. laeana*), hasta 8 lóbulos (*P. moranensis*). También se han reportado anomalías como dos flores en un mismo pedúnculo (*P. longifolia*, *P. lausana*, *Pinguicula vallisneriifolia*, ***P. esseriana***) y una flor con dos espolones (*P. "weser"*), (http://www.pinguicula.rg/pages/pages_principales/Bizarre.htm).

La presencia de un paladar cubierto por tricomas multicelulares uniseriados globosos, la densidad y distribución de éstos, así como la coloración amarilla del paladar son características que evidencian la cercanía entre *P. debbertiana* y *P. esseriana*, y apoyan la posibilidad del origen híbrido de esta última (Zamudio, 2001, 2005).

Androceo

Como anteriormente se había mencionado, el androceo es el primer verticilo sexual en desarrollarse. Esto se debe a la asincronía que existe en el desarrollo de la flor, la que se inicia primero es la parte anterior y después la zona posterior lo cual ocurre tanto en *Pinguicula* como en *Utricularia* (Kausik, 1938; Khan, 1954; Casper, 1966; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005), lo que trae como consecuencia que en las especies incluidas en esta investigación y en el género, el androceo sea el primer verticilo sexual en aparecer. Sin embargo, y contrario a lo observado en *Pinguicula* por otros autores (Casper, 1966; Koczyńska, 1964; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005), en *P. esseriana* se observó que la maduración de los verticilos sexuales es sincrónica.

Otro carácter que no se había observado en este mismo género es la germinación *in situ* de los granos de polen en flores abiertas de *P. esseriana* y *P. ehlersiae*, y en flores

cerradas de *P. debbertiana*. Estas observaciones, así como la ubicación de las líneas de dehiscencia de anteras maduras de *P. ehlersiae* dirigidas al labio mayor del estigma, sugieren la posibilidad de que ocurra autopolinización en antesis y en botón floral; lo cual ha sido reportado que también ocurre en algunas flores de *Utricularia*. En este género se menciona que los granos de polen germinan en el interior de la antera cerrada y algunas de sus especies han sido descritas como cleistógamas (Kausik, 1938; Slinger, 1954; Farooq y Siddiqui, 1967; Siddiqui, 1978).

En la familia Lentibulariaceae el androceo consta de dos estambres con anteras dorsifijas con los filamentos unidos a la corola (Casper, 1966; Taylor, 1989; Zamudio, 2000, 2001; Espinosa, 2005a, 2005b). Este estado de carácter también fue observado en los tres taxa estudiados en la presente investigación, además algunas flores de *P. esseriana*, presentan anomalías en el desarrollo del androceo como la presencia, aunque esporádica de una sola antera, o en su defecto una de menor tamaño que la otra, lo cual puede ser producto del posible proceso de hibridación, carácter no observado en las especies estudiadas por Espinosa (2005) y Espinosa *et al.* (2005). Este tipo de anomalías también se han observado en *P. zecheri*, una especie donde el desarrollo del androceo presenta alteraciones, y es sugerida también como de origen híbrido, aún en proceso de diferenciación (Zamudio y Ludlow- Wichers, 1993).

Gineceo

Las especies aquí estudiadas: *P. debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*, en general presentan ovario súpero, unilocular y bicarpelar con placentación libre central, con numerosos óvulos, salvo en algunas flores de *P. ehlersiae* donde se aprecia la diferenciación de pocos óvulos. El estilo hueco y corto, así como un estigma bilabiado con labios de diferente tamaño y función; son características que concuerdan con las descritas en otras especies del mismo género y con especies de *Utricularia* (Kausik, 1938; Slinger, 1954; Khan, 1963, 1970; Farooq, 1966, 1967; Farooq y Siddiqui, 1965, 1967; Siddiqui, 1965, 1978; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005). Se han reportado alteraciones en la morfología del estigma de *P. villosa*, en esta especie los labios del estigma se encuentran enrollados

hacia fuera y tienen las mismas dimensiones (Heide 1912, citado en Espinosa, 2005a), mientras que para el resto de las especies los labios estigmáticos son de diferente tamaño. En *U. scandens*, *U. uliginosa* y *U. arcuata* los labios del estigma también se encuentran enrollados y dirigidos hacia el canal estilar, lo que sugiere una autopolinización (Farooq, 1965, Farooq y Bilquis, 1966).

A diferencia de la mayoría de las especies de *Pinguicula* (Kopczyńska, 1964; Espinosa, 2005) y *Utricularia* (Kausik, 1938; Khan, 1954,1970; Farooq, 1966; Farooq y Siddiqui 1965, 1967) en donde la placenta es esférica y masiva con numerosos óvulos, en *P. debbertiana*, *P. ehlersiae*, *P. esseriana* y las especies estudiadas por Casper (1966), así como en *Utricularia arcuata* (Farooq, 1965) y *U. estriatula* (Farooq, 1966), la parte apical de la placenta carece de óvulos; y de acuerdo con las observaciones, funciona como un puente entre la zona del estigma y la placenta. A través de este puente pueden viajar los tubos polínicos que bajan por el estilo, hasta alcanzar a los óvulos.

Microsporogénesis y microgametogénesis

Los resultados encontrados en *P. debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana* coinciden con las observaciones realizadas por Casper (1966) y Espinosa *et al.* (2005), las anteras maduras son secundariamente biloculares, lo cual se debe a la degradación del tejido conectivo y de los septos entre cada par de microsporangios presentes en cada lóbulo de la antera. En *Utricularia*, las anteras mantienen sus características morfológicas y anatómicas durante su desarrollo, y no se ha observado la degradación de tejidos (Khan, 1954; Farooq, 1965).

El desarrollo de la pared de la antera en las especies estudiadas es de tipo dicotiledóneo, y las capas de ésta son uniestratificadas, el tapete es de tipo secretor y el endotecio presenta engrosamientos fibrosos en forma de barra; características que comparten con las especies estudiadas por Casper (1966), Espinosa (2005), Espinosa *et al.* (2005) y con algunas especies de *Utricularia* (Khan, 1954; Farooq, 1965).

La pared de la antera joven en los taxa estudiados, está compuesta por una epidermis, un endotecio prominente que presenta engrosamiento de lignina, lo cual

reporta Johri *et al.* (1992) para la familia. En contraste, Espinosa (2005) encontró en *P. crenatiloba* la presencia de un endotecio parcialmente biestratificado, carácter no reportado para el género *Pinguicula* y que no comparte con las especies aquí estudiadas. Mientras que en *Utricularia* es común que el endotecio sea parcial o totalmente biestratificado especialmente en *U. arcuata*, *U. uliginosa*, *U. estriatula* (Farooq, 1965, 1966), *U. scandens* (Farooq y Bilquis, 1966) y *U. stellaris* (Farooq y Siddiqui, 1967). Con respecto a la capa media, ésta es efímera en todas las especies reportadas.

La pared de la antera madura en las especies estudiadas, así como otras del género *Pinguicula*, consta de dos capas uniestratificadas, la epidermis persistente y el endotecio prominente (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992; Espinosa, 2005).

En las especies investigadas aquí, la microsporogénesis es de tipo sucesivo y es totalmente sincrónica, caracteres que comparte con otras especies del género *Pinguicula* (Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005). En contraste, en *Utricularia* además del tipo sucesivo presenta el tipo simultáneo, estos procesos también ocurren de forma asincrónica, observándose al mismo tiempo tétradas de microsporas y microsporas libres uninucleadas en el microsporangio (Khan, 1954; Farooq, 1966; Farooq y Bilquis, 1966; Davis, 1966).

La tétrada de microsporas es tetraédrica para los tres taxa, como el observado en algunas especies de *Utricularia*, esta última también puede presentar tétradas isobilaterales, en forma de T, decusas y romboides, destacando que en un mismo esporangio pueden presentarse más de un tipo de éstas (Khan, 1954; Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992).

En la familia Lentibulariaceae, generalmente en *Utricularia*, la exina se ha descrito como tectada, perforada-verrugada, tectada reticulada, tectada microreticulada y tectada ligeramente reticulada lisa o rugosa (Kausik, 1938; Farooq, 1965; Siddiqui, 1978; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005). El tipo de ornamentaciones de la exina aquí obtenidos concuerda con lo descrito para Lentibulariaceae, y muestran la presencia de una exina

tectada perforada para *P. debbertiana* y *P. esseriana*, mientras que *P. ehlersiae* varía de tectada perforada en la zona ecuatorial a escasamente tectada perforada en la zona polar.

El número de aberturas en los granos de polen de las taxa estudiados van desde penta a hexacolporados, lo que concuerda con lo reportado para *Pinguicula*. En este género los granos de polen son desde tricolporados hasta hexacolporados y rara vez octacolporados (Casper, 1966; Taylor, 1989; Zamudio y Ludlow- Weichers, 1993; Zamudio 2001, 2005; Jonson, 2003; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

Las formas de los granos de polen observadas en esta investigación concuerdan con lo descrito en otras especies de *Pinguicula*, son granos de polen prolados a prolado esferoides, oblado esferoides, suboblados o esferoides (Zamudio y Ludlow- Weichers, 1993; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

Con excepción de *U. graminifolia* que tiene granos de polen tricelulares al momento de la dispersión, en *Pinguicula* (Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005) y el resto de las especies de *Utricularia* (Farooq, 1965, 1966; Farooq y Bilquis, 1966; Farooq y Siddiqui, 1967), los granos de polen son bicelulares al momento de la dispersión.

A diferencia de *Pinguicula debbertiana* y *P. ehlersiae*, en *P. esseriana* se observaron granos de polen con alteraciones en el tamaño y forma, y en algunos casos granos de polen no viables debido a la falta de citoplasma. Las anomalías morfológicas observadas se reflejan en cierto grado de esterilidad masculina, ya que no todos los granos de polen son viables y esto podría explicar el reducido número de semillas que se desarrollan, que redundan en una baja capacidad de reproducción sexual. Estas características apoyan la hipótesis de Zamudio (2001), al proponer el posible origen híbrido de *P. esseriana*.

El alto porcentaje de granos de polen abortivos en *P. esseriana*, no es la principal causa de la baja producción de frutos y semillas, debido a que las pruebas realizadas con azul de anilina indican la entrada de algunos tubos polínicos al óvulo, pero aún no se sabe si se efectúa la fecundación en la mayor parte de los óvulo; o bien si la abortión es

posterior a la formación del cigoto como ocurre en *U. coerulea* (Siddiqui y Farooq, 1965) y como se reporta para taxa que hibridizan pero que tienen barreras postcigóticas (Grant, 1981; Jones, 1988; Burke y Arnold, 2001).

De las especies de *Pinguicula* que han sido estudiadas, solo *P. zecheri* muestra casi un 90% de granos de polen anormales, tanto en forma como en tamaño, lo que sugiere un posible origen híbrido sin reproducción sexual (Zamudio y Ludlow- Weichers, 1993), de igual forma en *Utricularia australis* f. *australis* (Araki, 2000, citado en Espinosa, 2005), las alteraciones en los granos de polen y la escasa producción de semillas sugieren un posible origen híbrido. Estas observaciones hacen pensar, que la hibridación podría ser un proceso común en la familia Lentibulariaceae.

Tipo de óvulo

En las especies estudiadas se observaron óvulos anátropos, unitégmicos y teninucelados que se caracterizan por tener una nucela recta, con la cálaza alejada del hilo y muy cercano a éste se encuentra el micrópilo (Johri *et al.*, 1992; Espinosa-Osorio y Engleman, 1998). Estas observaciones coinciden con las realizadas en *P. vulgaris* (Kopczyńska, 1964), *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba* (Espinosa, 2005), y con algunas especies de *Utricularia* (Khan, 1953; Shivaramiah, 1964; Kausik y Raju, 1956; Begum, 1965; Farooq, 1965; Farooq y Siddiqui, 1967). Cabe mencionar que para este último género también se han reportado óvulos hemianátropos, ortótropos, anacampilótropos y es común que coexistan más de un tipo en un mismo ovario (Khan, 1953; Kausik y Raju, 1956; Shivaramiah, 1964; Begum, 1965; Farooq, 1965; Farooq y Siddiqui, 1967), lo que no ha sido reportado para ninguna especie de *Pinguicula*.

Megasporogénesis y megagametogénesis

La presencia de una célula madre de la megaspóra en posición hipodérmica, es un estado de carácter que comparten las especies de esta investigación y que también se han observado en *Utricularia* (Johri *et al.*, 1992). Es importante hacer notar que en *Utricularia*, se puede presentar un tejido arquesporrial multicelular y que cada célula arquesporrial que se

presenta, puede diferenciarse en el mismo número de células madres de la megaspóra (Khan, 1953; Kausik y Raju, 1965; Shivaramiah, 1964; Begum, 1965; Farooq, 1965; Farooq y Siddiqui, 1967).

En el género *Pinguicula* y así como en los taxa estudiados en la presente investigación, sólo en la megaspóra funcional ocurre mitosis, mientras que el resto degenera (Farooq y Siddiqui, 1964; Farooq, 1964, 1965, 1966; Espinosa, 2005).

También en *Pinguicula* se ha descrito que el desarrollo del saco embrionario es monospórico de tipo *Polygonum* (Kopczyńska, 1964; Begum, 1965; Espinosa, 2005), como lo encontrado en los tres taxa aquí estudiados, carácter que concuerda con lo observado en el género *Utricularia* (Khan, 1953; Kausik y Raju, 1965; Shivaramiah, 1964; Begum, 1965; Farooq, 1965; Farooq y Siddiqui, 1967).

En las especies de esta investigación, así como en *Pinguicula vulgaris* (Kopczyńska, 1964), *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba* (Espinosa, 2005a), y las especies de *Utricularia* (Khan, 1953; Kausik y Raju, 1965; Shivaramiah, 1964; Begur, 1965; Farooq, 1965; Farooq y Siddiqui, 1967), el saco embrionario es heptacelular y octanucleado (Kopczyńska, 1964; Espinosa, 2005). El hecho de haber observado un saco embrionario heptacelular y octanucleado en *Pinguicula esseriana*, sugiere que a pesar de su posible origen híbrido aún conserva caracteres importantes tales como la meiosis, misma que está totalmente ausente en especies cuyo origen híbrido se ha confirmado (Rieseberg, 1997; Barton, 2001). La presencia de la meiosis hace pensar que la posible aborción de tejidos no se da a este nivel, sino en eventos postmeióticos, lo que explicaría la poca o nula producción de semillas, las cuales mostraron tejidos colapsados.

La presencia de un tapete tegumentario en el óvulo es un carácter representativo de las familias que conforman el orden Lamiales (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992), en el cual, la familia Lentibulariaceae se distingue porque, además del tapete tegumentario se presentan otros tejidos nutritivos que contribuyen al desarrollo del óvulo y la semilla, características

observadas en los tres taxa estudiados y en otras especies, aunque al parecer el origen puede variar (Davis, 1966; Johri *et al.*, 1992).

En *Utricularia*, se presentan diversas estructuras nutritivas como la cálaza, el micrópilo, el funículo, la placenta, además del tapete tegumentario (Kausik, 1935, 1938; Khan, 1953, 1954, 1970; Kausik y Raju, 1955; Farooq, 1964, 1965, 1966; Farooq y Siddiqui, 1964). La placenta con tejido nutritivo es un carácter que solo ha sido registrado en *Utricularia*, y no se presenta en ningún otro miembro del orden Lamiales (Khan, 1970; Johri *et al.*, 1992). En contraste, en *Pinguicula* sólo habían reportado al tapete tegumentario y al endospermo, como tejidos nutritivos (Crété, 1956; Kopczyńska, 1964; Kahn, 1970, Johri *et al.*, 1992; Espinosa, 2005).

En algunas angiospermas tanto las sinérgidas como las antípodas pueden formar tejidos nutritivos (haustorios), por medio de la división mitótica de sus células como en *Cortaderia selloana*, *Quinchamalium chilense* y en los géneros *Grindelia*, *Haplopappus* (Bhojwani y Bhatnagar, 1999). Para Lentibulariaceae, se ha descrito en *Utricularia*, la formación de un tejido nutritivo de origen antipodal y situado en la cálaza que puede formarse después de la fecundación como en *Utricularia coerulea* o incluso antes de que la doble fecundación ocurra (Wylie y Yocom, 1925; Kausik, 1925). Kopczyńska (1964), observó en *Pinguicula vulgaris* que dos de las tres antípodas comienzan a degradarse cuando el saco embrionario es maduro, la tercer antípoda migra en dirección al micrópilo y comienza a dividirse mitóticamente formando dos células de igual tamaño, a estas células las nombro "antipodal chamber", este autor desconoce la funciones de estas células. En los tres taxa analizados en este estudio, por primera vez en el género *Pinguicula*, se observó la formación de un tejido nutritivo formado por células digitiformes con uno o dos núcleos que se origina en la zona calazal que surge de las tres antípodas, lo cual coincide con la etapa de degeneración de la nucela. En cierta medida nuestros resultados concuerda con lo observado en otros géneros de Lentibulariaceae, pero principalmente en las observaciones realizadas en *Utricularia* y *Pinguicula*. Aunque se desconoce si en *Utricularia coerulea* (Wylie y Yocom, 1925; Kausik, 1925) este tejido antipodal se origina de las tres antípodas como ocurre en los tres taxa

estudiados en la presente investigación, o bien de sólo una de las antípodas como ocurre en *P. vulgaris* (Kopczyńska, 1964).

De los tres tipos de comportamiento haustorial más común en *Utricularia*: haustorio parcialmente intraovular, haustorio extraovular y haustorio intraovular (Kausik, 1935, 1938; Kausik y Raju, 1955; Khan, 1953, 1954, 1970; Farooq, 1964, 1965, 1966; Farooq y Siddiqui, 1964, 1967; Shivaramiah, 1964; Siddiqui, 1978), ninguno de ellos se ha observado en *Pinguicula*, tal vez por que carece de tejido nutritivo abundante en la placenta. En los taxa de esta investigación se encontró que el tejido haustorial se diferencia de las antípodas, y no solo invade la zona calazal, sino que debido a su alta proliferación, llega hasta la zona del micrópilo, pero internamente en el saco embrionario, sin extenderse hacia los tegumentos. El haustorio incluso es más desarrollado en la zona micropilar que en la cálaza. En contraste, en *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba* estudiadas por Espinosa (2005), se observó la formación de dos cámaras haustoriales originadas a partir del tejido endospermico, las que nutren al embrión por medio de la degradación de los tejidos de la cálaza y el micrópilo. En esas especies no se menciona la proliferación de tejido antipodal como haustorio.

Polinización y fecundación

Aún no se conoce con certeza el tipo de polinizadores de *P. debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*, sin embargo, de acuerdo a las observaciones realizadas por Zamudio (com. pers.), algunos de los polinizadores de las especies de este género podrían ser pequeñas mariposas. Para el caso del género *Utricularia*, las flores son visitadas por miembros de los órdenes Himenoptera, Diptera y Lepidoptera (Taylor, 1989). Además en *Utricularia*, la autopolinización es un proceso común debido a que los granos de polen germinan en el interior de las anteras antes de la indehiscencia, lo que ha llevado a pensar que la cleistogamia es frecuente en este género (Kahn, 1954; Farooq, 1964, 1965, 1966; Farooq y Siddiqui, 1967; Siddiqui, 1978). De igual forma, en las especies de la presente investigación: *P. debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*, no se descarta la ocurrencia de la cleistogamia o autofecundación en antesis (geitonogamia), ya que se observaron granos de polen germinando en el interior de anteras tanto de botones florales como en anteras abiertas de flores en antesis.

Las modificaciones en la morfología de la flor en *P. esseriana*, entre las que destacan la maduración y germinación de los granos de polen en el interior de las anteras indehiscentes, el estigma bifurcado hacen posible que los granos de polen entren en contacto con el estigma, permitiendo que las anteras abran cerca de la zona receptiva del estigma y pueda ocurrir autofecundación. Lo cual también fue observado por Heide (1912, citado en Espinosa 2005a) en *P. alpina*, *P. vulgaris* y *P. villosa*, donde se muestra la autocompatibilidad de estas especies. Se menciona que en *P. vulgaris*, el labio anterior del estigma está enrollado de tal forma que la superficie receptiva entra en contacto con el polen de la misma flor; y en *P. villosa*, el estigma no cubre por completo a las anteras, de tal manera que los granos de polen liberados se depositan y germinan en el estigma papiloso de la misma flor. Estas modificaciones en la morfología de la flor no se limitan al género *Pinguicula*, Kausik y Raju (1955), también se observaron en flores de *Utricularia* que se autopolinizan.

En el género *Pinguicula* se han reportado la dicogamia y hercogamia como mecanismos que evitan la autopolinización. La dicogamia fue reportada en *P. alpina* (Heide 1912, citado en Espinosa 2005), en *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba* (Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005). De igual forma, en las especies de esta investigación las anteras se desarrollan y maduran antes que los óvulos, salvo en algunos individuos de *P. esseriana*.

En los taxa estudiados exceptuando algunas flores de *P. ehlersiae*, así como en *P. agnata*, *P. oblongiloba* y *P. crenatiloba* reportadas por Espinosa (2005) y Espinosa *et al.* (2005), la hercogamia se hace evidente en la rotación gradual que experimentan los estambres y en el alargamiento del filamento, lo que provoca un cambio en la disposición de las anteras durante la anthesis, éstas, quedan dirigidas hacia el tubo de la corola, de tal forma que separan al estigma de las anteras, provocando que los granos de polen caigan al interior del tubo de la corola, evitando así la autopolinización (Snell, 1976; Espinosa, 2005).

P. debbertiana, *P. ehlersiae* y *P. esseriana* en general muestran rasgos morfológicos relacionados con la fecundación cruzada, como la presencia del espolón, los colores llamativos de las flores y la separación espacial de los órganos sexuales (hercogamia) para atraer a polinizadores; sin embargo, en algunos individuos de *P. esseriana* la hercogamia

puede ser descrita como parcial, debido a la presencia de estigmas que no cubren por completo a las anteras como en *P. vulgaris* y *P. villosa* (Heide 1912, citado en Espinosa 2005). Aunque esto puede ser producto de las malformaciones en el gineceo debido a su posible origen híbrido.

Desarrollo de la semilla

Debido a la falta de flores de ambos progenitores que coincidan en antesis para cruzarlas manualmente no se pudo comprobar por un lado que la hibridación puede ocurrir consecuentemente entre estas taxa y por otro se pudo dar seguimiento completo a la formación de semillas para la obtención de la F₁ híbrida.

En las tres especies estudiadas se observó la formación de endospermo de tipo celular y la invasión por parte del haustorio antipodal que llega hasta el micrópilo, eventos que se asocian con el desarrollo de las semillas y que son una entrada de nutrientes para el embrión, lo cual ha sido ya reportado para otras especies de *Pinguicula* (Kahn, 1954, Kopczyńska, 1964; Johri *et al.*, 1992).

La producción de frutos y semillas en *P. esseriana* (posible híbrido), es muy baja o casi nula; una posible explicación de este fenómeno podría ser la degeneración del cigoto y endospermo. También puede deberse a la degradación temprana del haustorio antipodal, incluso antes del desarrollo del embrión, como en el caso de *Utricularia coerulea* (Siddiqui y Farooq, 1965). O bien a que la aborción de tejidos nutritivos se presente en etapa de cigoto (Grant, 1981), como en *U. vulgaris var americana* y *U. flexuosa* (Khan, 1963; Farooq y Siddiqui, 1965; Jones, 1988).

El alto porcentaje de granos de polen abortivos en *P. esseriana*, no es la principal causa de la baja producción de frutos y semillas, debido a que las pruebas realizadas con azul de anilina indican la entrada de algunos tubos polínicos al óvulo, pero aún no se sabe si existe un alto porcentaje de óvulos fecundados; o bien si la aborción es posterior a la formación del cigoto como ocurre en *U. coerulea* (Siddiqui y Farooq, 1965).

IX. CONCLUSIONES

La gran variación morfológica de las flores de *Pinguicula esseriana*, las modificaciones estructurales de los gametos, la presencia de granos de polen abortivos (59.7%), la aborción de óvulos, la poca o nula producción de semillas y la gran capacidad de multiplicación vegetativa por medio de las hojas de invierno, anteriormente reportada por Zamudio (2001), refuerzan la hipótesis que señala a esta especie como una entidad de origen híbrido, que se ha mantenido con éxito y relativamente aislada de sus progenitores.

De acuerdo a los resultados micromorfológicos y embriológicos de las estructuras masculinas y femeninas, así como las polinizaciones manuales de individuos de *P. esseriana* y de *P. debbertiana* con *P. ehlersiae*, se puede decir que *P. esseriana* si es un posible híbrido resultado de la cruce de *P. debbertiana* con *P. ehlersiae*.

Sin embargo para afirmar el origen híbrido de *P. enseriana*, hace falta un análisis molecular donde se incluyan los híbridos encontrados en el campo, los progenitores y asimismo los híbridos producto de las polinizaciones manuales.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Lista de algunos híbridos artificiales registrados, tomados de http://www.omnisterra.com/bot/cp_home.cgi?name=pinguicula&submit=Submit+Query&search=cultivars.

Nombre común	Cruza	Registrada	Fuente
Aphrodite	<i>P. agnata</i> x <i>P. moctezumae</i>	J. Flisek y K. Pasek, 2001	Carnivorous Plant Newsletter 33:88 (2004)
Enigma *	<i>P. cyclosecta</i> x <i>P. esseriana</i>	T.H.Wyman, 2003	Carnivorous Plant Newsletter 33:88 (2004)
Florian	<i>P. debbertiana</i> x <i>P. jaumavensis</i>	O.Gluch, 2003	Carnivorous Plant Newsletter 33:20 (2004)
George Sargent	<i>P. moranensis</i> x <i>P. gypsicola</i>	A.Slack, 1998	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Gina	<i>P. zecheri</i> x <i>P. agnata</i>	Miloslav Studnicka, 1991	Carnivorous Plant Newsletter 21:6 (1992)
Hameln	<i>P. gypsicola</i> x <i>P. moranensis</i>	A.Slack, 2002	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Hanka	<i>P. zecheri</i> x <i>P. rotundiflora</i>	Miloslav Studnicka, 2000	Carnivorous Plant Newsletter 29:46 (2000)
L'Hautil	<i>P. ehlersiae</i> x <i>P. moranensis</i>	L.Legendre y S.Lavayssiere, 1998	IPSG Newslett.3:8 (1993)
Pirouette	<i>P. agnata</i> x <i>P. moranensis</i> x <i>P. ehlersiae</i>	J.Brittacher, B.Meyers-Rice y L.Song, 2000	Carnivorous Plant Newsletter 29:17 (2000)
Sethos	<i>P. ehlersiae</i> x <i>P. moranensis</i>	A.Slack, 1998	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Tina	<i>P. agnata</i> x <i>P. zecheri</i>	H.Weiner y A.Slack, 2002	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Titan	<i>P. agnata</i> x <i>P. macrophylla</i>	B.Meyers-Rice y L.Song, 1999	Carnivorous Plant Newsletter 30:11 (2001)
Weser	<i>P. moranensis</i> x <i>P. ehlersiae</i>	H.Weiner y A.Slack, 1998	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)

ANEXO 2. Morfología floral de *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*. La información fue tomada de los resultados de la presente investigación.

		Subgénero <i>Pinguicula</i>			
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>		
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>	
Morfología floral	Flor	Carácter	Bisexual y bilabiada		
		Tipo	zigomórfica		
		Simetría	zigomórfica		
		Tamaño (incluyendo el espolón)	25 mm -40mm	30mm- 45mm	23mm- 45mm
	Cáliz	Número de flores por roseta	1- 3 en estado silvestre y 1 en ambiente controlado		
		Tipo	Bilabiado, persiste hasta la etapa de fructificación		
		Forma y color de los sépalos	Obovados, verdes y pubescentes en ambas superficies		
	Corola	Número de sépalos	Tres en el labio superior y dos en el inferior		
		Color y número de lóbulos	violáceo-purpúreo, con venación muy marcada. - 5, tres en el labio superior y dos en el inferior.	color morado-purpúreo. - 5, tres en el labio superior y dos en el inferior.	violáceo- purpúreo. - 5, tres en el labio superior y dos en el inferior. - 6, tres en cada labio
		Forma de los lóbulos	Obovados	Obovados	Obovados-cuneados, obovados y oblatos
		Paladar	dos protuberancias evidentes de forma ovalada	Carece de paladar	Dos protuberancias poco marcadas o una
		Color del paladar	amarillo	No observado	Amarillo-verdoso o café
		Tricomas del paladar	Forma globosa, abundantes, multicelulares y uniseriados	No observado	Abundantes a escasos. Multicelulares uniseriados de forma cilíndrica y globosa.
		Garganta	Amarilla blanquecina, pilosa	Verde, con escasos tricomas	Blanca, densamente pilosa
		Espolón	Del mismo tamaño que el tubo de la corola o ligeramente más grande	Más largo que el tubo de la corola y curvo o ligeramente recto	Más largo que el tubo de la corola , poco incurvado
Color del espolón		Verde con nervadura morada	Verde con una nervadura púrpura	Blanco -verdoso o ligeramente morado, con venación morado-violáea	
Ángulo aprox. de divergencia de los labios de la corola	90°	180°	80°		

ANEXO 3. Morfología del androceo y gineceo de *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*. La información fue tomada de los resultados de la presente investigación.

		Subgénero <i>Pinguicula</i>				
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>			
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>		
Morfología floral	Androceo	Filamento	Carácter			
		Forma	Cilíndrico curvo			
		Tamaño	homodínamos		Generalmente homodínamos	
		Número	dos		Uno o dos	
		Tricomas	Presentes			
	Posición	Anteriores, insertas en la base de la corola				
	Anteras	Tipo	dorsifijas			
		Tamaño	homodínamos		Generalmente homodínamos	
		Forma	ovaladas		Ovaladas o amorfas	
		Anormalidades	No observado		una sola antera o dos de diferente tamaño y con malformaciones.	
		Posición en flores preantesicas	La línea de dehiscencia está cubierta por el labio mayor del estigma			
		Posición en la antesis	Líneas de dehiscencia dirigidas al tubo de la corola	Líneas de dehiscencia dirigidas al labio mayor del estigma	Líneas de dehiscencia dirigidas al tubo de la corola	
		No. de esporangios en una antera joven	Cuatro			
		No. de esporangios en una antera madura	Uno, por la degradación del tejido conectivo y septo			
	Gineceo	Estigma	Tipo	Bilabiado		
			Labio mayor	Forma discoidal		
			Función del labio mayor	Cubre a las anteras, con diferencias en la superficie adaxial y abaxial		
			Papilas secretoras del labio mayor en la superficie adaxial. Zona receptiva.	De forma triangular, unicelulares con un núcleo evidente, con cutícula delgada y lisa.		De forma alargada, unicelulares con un núcleo evidente, con cutícula delgada y lisa.
			Superficie abaxial del labio mayor	Considerada no receptiva, con tricomas multicelulares largos		
			Labio menor	Triangular, de menor tamaño que el labio mayor y con papilas no secretoras.		
Anormalidades			No observadas	No observadas	Bifurcado casi desde su base	
Estilo		Se origina a partir del ensanchamiento del ovario. Hueco				
Canal estilar	Delimitado por células con citoplasma denso y núcleos evidentes.					

		Subgénero <i>Pinguicula</i>			
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>		
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>	
Morfología floral	Gineceo	Ovario	Carácter		
			Tipo	Súpero, con numerosos óvulos	
			Forma	Globular	
			Tricomas	Localizados en la superficie, y se desarrollan de las células de la epidermis externa	
			Tipo de tricomas	Multicelulares de tipo secretor, con una célula basal cilíndrica y células apicales que forman la cabeza	
			No. de carpelos	Dos fusionados, que forman un solo lóculo	
			Tipo de placentación	Libre central, masiva de forma esférica, excepto en donde se forma la columna	
			Columna	Presente, es un tejido de contacto con el estilo y que facilita la entrada de los tubos polínicos	
			Pared de un ovario joven	Formada por 6 ó 7 estratos celulares de naturaleza parenquimática, delimitados por una epidermis uniestratificada.	
Pared de un ovario durante la antesis	6 ó 7 estratos celulares de naturaleza parenquimática con paredes engrosadas y presentan almidón.				

ANEXO 4. Desarrollo embrionario del androceo de *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*. La información fue tomada de los resultados de la presente investigación.

		Subgénero <i>Pinguicula</i>			
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>		
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>	
Embriología	Desarrollo del la pared de la antera, microsporogénesis y microgametogénesis	Carácter			
		Tipo de desarrollo de la pared de la antera	Dicotiledoneo		
		Epidermis	Persistente, formada por un estrato		
		Endotecio	Formado por 1 estrato		
		Capa media	Constituida por 1 estrato, efímera		
		Origen del tapete	Doble origen (parietal y del conectivo)		
		Tapete	Formado por 1 estrato, de tipo secretor y binucleado		
		Tipo de microsporogénesis	Sucesiva		
		Ocurrencia de la microsporogénesis	Sincrónica		
		Tipo de tétradas de microsporas	Tetraédricas, y rodeadas de calosa		
		No. de células en un grano de polen maduro	2		
		Citoplasma en los granos de polen maduros	Denso, con granos de almidón		Citoplasma escaso o nulo
		Dispersión del polen	Mónadas bicelulares		
		Forma de los granos de polen	Oblado y esféricos	Prolado y suboblatos	Prolado y suboblatos
		No. de aberturas	Hexa-colporados	Penta a hexa-colporados	Penta a hexa-colporado
		Exina	Tectada perforada	Tectada perforada (zona ecuatorial) a tectada perforada (zona polar)	Tectada perforada
		Porcentaje de granos de polen anormales	No observado	No observado	40.74%
		Anormalidades en los granos de polen	No observado	No observado	Del mismo tamaño que los normales pero carentes de citoplasma o de menor tamaño y amorfos
		Granos de polen con germinación <i>in si tu</i>	Presente	Presente	Presente

ANEXO 5. Desarrollo embrionario del gineceo y fecundación de *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*. La información fue tomada de los resultados de la presente investigación.

		Subgénero <i>Pinguicula</i>		
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>	
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>
Carácter				
Embriología	Desarrollo de l gineceo	Tipo de óvulo	Anátropos	
		No. de tegumentos en el óvulo	Unitégmico	
		No. de estratos en el tegumento	4 - 5	
		Micrópilo	Formado por el único tegumento	
		Funículo	Corto	
		Calaza	Carente de tejido nutritivo	
		Tapete tegumentario	Presente	
		Hautorio calazal antipodal (HA)	Presente	
		Origen del HA	De las antípodas, antes de la fecundación.	
		Células del HA	Digitiformes, que se distribuyen de la calaza al micrópilo.	
		Desarrollo de los óvulos en el gineceo	Asincrónico	
		Nucela	Efímera y teninucelada	
		Célula arquesporial	Una, en posición hipodérmica, con mayor tamaño que el resto de las células y con núcleo evidente	
		División de la célula arquesporial	No hay división, se diferencia directamente en la célula madre de la megaspora	
		Tipo de tétradas de megasporas	Lineal	
		Megaspora funcional	Una, localizada en la calaza	
		Tipo de desarrollo del saco embrionario (SE)	<i>Polygonum</i>	
		No. de células en el SE	Octanucleado y heptacelular	
		Células antipodales	3, originan el haustorio antipodal	
	Núcleos polares	2		
Sinergidas	2			
Aparato de huevo	Intraovular			
Fecundación	Tipo de polinización	Cruzada o posibles autopolinizaciones debido a la germinación <i>in situ</i> de los granos de polen		
	Entrada del tubo polínico al óvulo	Por el micrópilo (porógama)		
	Tipo de fecundación	Cruzada y posible autogamia en antesis		

ANEXO 6. Desarrollo embrionario de las semilla de *Pinguicula debbertiana*, *P. ehlersiae* y *P. esseriana*. La información fue tomada de los resultados de la presente investigación.

Carácter		Subgénero <i>Pinguicula</i>			
		Sección <i>Pinguicula</i>	Sección <i>Orcheosanthus</i>		
		<i>P. debbertiana</i>	<i>P. ehlersiae</i>	<i>P. esseriana</i>	
Embriología	Desarrollo de la semilla	Tipo de desarrollo del endospermo	Celular		
		Primera división del núcleo primario del endospermo	Transversal, se encuentra rodeado por un citoplasma rico en almidón		
		Origen de la cámara endospermica micropilar y la cámara endospermica calazal	Se originan por la degeneración de tapete tegumentario, la cámara endospermica micropilar es de mayor tamaño que la cámara endospermica calazal.		
		Endospermo haustorial	Ausente		
		Endospermo en la semilla madura	Un solo estrato alrededor del embrión		
		Primera división del cigoto	Transversal		
		Forma de la semilla madura	Cilíndricas, delgadas hacia la zona calazal		Cilíndricas, fuertemente delgadas hacia la zona calazal
		Color de la semilla	Café		
		Tamaño de la semilla madura	1 - 1.4 mm de largo por 0.3 - 0.4 mm de ancho	0.5 -1mm de largo por 0.3 - 0.4 mm de ancho	0.5 - 0.7mm de largo por 0.03 - 0.2 mm de ancho
		Semillas abortivas	No observadas	Carentes de embrión y en forma de gota	Carentes de embrión y de igual o menor tamaño que las viables, con testa ligeramente reticulada
		Origen de la testa	De la epidermis externa del tegumento		
		No. de estratos de la cubierta seminal	Uno		
		Superficie de la cubierta seminal	Reticulada y verrugosa		
		Forma de las células de la testa	Ovaladas, y dispuestas en hileras longitudinales, con paredes anticlinales uniformemente engrosadas		
		Cutícula	Lisa y ligeramente hundidas		
Fruto	Capsular, consiste de epidermis y seis estratos con engrosamientos celulósicos				

ANEXO 7. Polinizaciones manuales.

		Localización de los tubos polínicos	Polinizaciones manuales	
			Posible híbrido	Progenitores
Tiempo Post- polinización	2 horas	Se encuentran en el tejido del estigma y son cortos	<i>P. esseriana</i> x <i>P. esseriana</i>	<i>P. debbertiana</i> x <i>P. ehlersiae</i>
	3 horas	Están en la placenta y alcanzan a llegar a los óvulos, entrando por el micrópilo y realizando la fecundación.	✓	No se realizó
			✓	✓*

* afirma la posibilidad de que la hibridación entre estas especies sí puede ocurrir.

XI. LITERATURA CONSULTADA

- ❖ Aboot, R. J. 1992. Plant invasion, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 401-405.
 - ❖ Albert, V., Stephen E. y M. Chase. 1992. Carnivorous Plants: Phylogeny and structural evolution. *Science* **257**: 1491- 1495.
 - ❖ Alcalá, R. y C. Domínguez. 1997. Biología de las plantas carnívoras: aspectos ecológicos y evolutivos. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **60**: 59- 69.
 - ❖ Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.* **55**:13-18.
 - ❖ Arnold, M. y S. Hodges. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative their parents?. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, **2**: 67 -70.
 - ❖ Barton , N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular ecology* **10**: 551- 568.
 - ❖ Barton, N. H. y M. Hewitt. 1981. Hybrid zone and speciation. Pp.109 -145 in W. R. Atchley y D. S. Woodruff, eds. *Evolution and speciation, essays in honour of M. J. D. White*. Cambridge University Press, Cambridge.
 - ❖ Begum, M. 1965. Studies on the embryology of *Utricularia graminifolia* Vahl. *Current Science.* **34**: 355-356.
 - ❖ Bhojwani, S. y S. Bhatnagar. 1999. *The embryology of angiosperms*. Vikas Publishing House PVT LTD. New Delhi.
 - ❖ Bozzola, J. y L. Russell. 1999. *Electron Microscopy: Principles and techniques for biologists*. Jones and Bartlett. London.
 - ❖ Burke, J. y M. Arnold. 2001. Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 31- 52.
 - ❖ Casper, J. 1966. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica.* **31**: 1- 29.
 - ❖ Crété, P. 1956. Lentibulariacées. Développement de l' embryon chez les *Pinguicula*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences Paris.* **242**: 1346- 1349.
 - ❖ Cronquist, A. 1968. *The evolution and classification of flowering plants*. Houghton Mifflin Company. Boston.
-

-
- ❖ Davis, G. L. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. John Wiley and Sons, New York.
 - ❖ Debbert, P. 1991. Einige neue Arten der Gattungen *Drosera* (Droseraceae) and *Pinguicula* (Lentibulariaceae). *Munchen* **30**: 372 -380.
 - ❖ Ellison, A. y N. Gotelli. 2001. Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends in Ecology & Evolution*. **16 (11)**: 623- 629.
 - ❖ Ellstrand, A. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review Ecological Systematics* **30**: 359-363.
 - ❖ Espinosa - Osorio, G. y E. Engleman. 1998. Breve recopilación de anatomía de semillas. Colegio de Postgraduados. México.
 - ❖ Espinosa, S. 2005. Estudio embriológico comparativo de los subgéneros *Isoloba*, *Pinguicula* y *Temnoceras* del género *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae L. C. Richard). Tesis de Doctorado en Ciencias, Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ❖ Espinosa, S., Zamudio, S. y J. Márquez. 2005. Embriología de las estructuras reproductoras masculinas del género *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae). *Bol. Soc. Bot. Méx.* **76**:43-52.
 - ❖ Farooq, M. 1964. Studies in the Lentibulariaceae 1. The embryology of *Utricularia stellaris* Linn. f. var. *inflexa* Clarke. Part I. Flower, organogeny, ovary, megasporogenesis and female gametophyte. *Proc. Natn. Inst. Sci. India*. B **30**: 263- 279.
 - ❖ Farooq, M. 1965. Studies in the Lentibulariaceae 2. The embryology of *Utricularia arcuata* Wt. *Journal of the Indian Botanical Society* **44**:326-346.
 - ❖ Farooq, M. 1966. Studies in the Lentibulariaceae 4. The embryology in *Utricularia striatula* Sm. *Journal of the Indian Botanical Society* **45** (1- 2): 1- 13.
 - ❖ Farooq, M. y S. Bilquis. 1966. Studies in Lentibulariaceae 7. The embryology in *Utricularia scandens* Benj. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. **42**: 127-131.
 - ❖ Farooq, M. y S. Siddiqui. 1965. Abnormal ovules and embryo sac in *Utricularia vulgaris* var *americana* A. Gray. *Naturwissenschaften* **52**: 90.
 - ❖ Farooq, M. y Siddiqui S. A. 1967. Studies in the Lentibulariaceae 6. The embryology of *Utricularia stellaris* Linn. *Journal of the Indian Botanical Society*. **46**: 31-44.
-

-
- ❖ Gibson, D. 1974. Lentibulariaceae. Standley, P., Williams, L. y D. Gibson (eds.) *in*: Flora de Guatemala. *Fieldiana, Bot.* **Vol 24**, Part X (4): 315- 328.
 - ❖ Godfrey, R. y H. Stripling. 1961. A sinopsis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in the Southeastern United States. *The American Midland Naturalist.* **66** (2): 395- 409.
 - ❖ Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York.
 - ❖ Heslop, Y. 2004. *Pinguicula* L. In: Biological floral of the British isles. *Journal of Ecology* **92**: 1071- 1118.
 - ❖ Hughes, C.E. y S. A. Harris. 1994. The characterization and identification of a naturally occurring hybrid in the genus *Leucaena* (Leguminosae: mimosoideae). *Plant Systematic sand Evolution* **192**: 177- 197.
 - ❖ Jobson, R. y E. Morris. 2001. Feeding ecology of a carnivorous bladderwort (*Utricularia uliginosa*, Lentibulariaceae). *Austral Ecology* **26**: 680- 691.
 - ❖ Jobson, R. y V. Albert. 2002. Molecular rates parallel diversification contrasts between carnivorous plant sisters lineages. *Cladistics* **18**: 127- 136.
 - ❖ Jobson, R., Playford, J., Cameron, K. y V. Albert. 2003. Molecular phylogenetics of Lentibulariaceae inferred from plastid *rps16* intron and *trnL-F* DNA sequences: implications for character evolution and biogeography. *Systematic Botany* **28** (1): 157 – 171.
 - ❖ Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw-HILL. London.
 - ❖ Johri, B., Ambegaokar, K. y P. Srivastava. 1992. *Comparative Embriology of Angiosperms*. Vol. **1-2**. Springer - Verlag. Alemania.
 - ❖ Jones, S. B. 1988. Sistemática Vegetal. McGraw-Hill.
 - ❖ Judd, W. C. Campbell, E. Kellogg, P. Stevens, M. Donoghue. 2002. Plant Systematics. A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts USA.
 - ❖ Juniper, B., Robins, J. y D. Joel. 1989. The carnivorous plants. Academic Press. London.
 - ❖ Kameyama, Y., Toyama, M. y M. Ohara. 2005. Hybrid origins and F₁ dominance in the freefloating, sterile bladderwort, *Utricularia australis* F. *australis* (Lentibulariaceae). *American Journal of Botany* **93** (3): 469- 476.
 - ❖ Karlsson, P., Nordell, K., Eirefelt, S. y A. Svensson. 1987. Trapping efficiency of three carnivorous *Pinguicula* species. *Oecologia* **73**: 518 – 521.
-

-
- ❖ Karlsson, S., Svensson, B., Carlsson, B. y K. Nordell. 1990. Resource investment in reproduction and its consequences in three *Pinguicula* species. *Oikos* **59**: 393- 398.
 - ❖ Kausik, S. 1935. The life history of *Utricularia coerulea* L. *Current Science* **3**: 357- 359.
 - ❖ Kausik, S. B. 1938. Pollen development and seed formation in *Utricularia coerulea*. *Beihefte zum Botanischen Zentralblatt* **58A**:365-378.
 - ❖ Kausik, S. B. and M. V. Raju. 1965. Variations in the development of the proembryo in *Utricularia coerulea*. *Current Science* **25**: 296- 297.
 - ❖ Khan, R. 1953. Haustorial behavior of the chalazal end of the embryo sac and reversion of polarity in *Utricularia flexuosa*. *Current Science* **22**:179-180.
 - ❖ Khan, R. 1954. A contribution to the embryology of *Utricularia flexuosa* Vahl. *Phytomorphology* **4**:80-117.
 - ❖ Khan, R. 1963. The behaviour the integumentary tapetum in the ovules containing degenerating gametophytes in *Utricularia flexuosa* Vahl. *Proceedings of the national academy of sciences of India* **33**:651-655.
 - ❖ Khan R. 1970. Lentibulariaceae In: Symposium on Comparative embryology of angiosperms. *Proceedings of the national academy of sciences of India* **41**:290-297.
 - ❖ Kirchner, B. 1981. *Pinguicula esseriana* (Lentibulariaceae)- eine neue Art aus Mexiko. *Willdenowia* **11**: 317 -319.
 - ❖ Kondo, K. 1972. A comparison of variability in *Utricularia cornuta* and *Utricularia juncea*. *Amer. J. Bot.* **59**: 23- 37.
 - ❖ Kopczyńska, K. 1964. Embryo sac development in *Pinguicula vulgaris* L. *Acta societatis Botanicorum Poloniae* **Vol. XXXIII, 1**: 141- 156.
 - ❖ Lester, R. N. Y J. H. Kang. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanun* species and hybrids. *Annals of Botany* **82**: 445- 453.
 - ❖ Lloyd, F. 1976. The carnivorous plants. Dover Publications. New York.
 - ❖ López Curto, M.L., J. Márquez Guzmán y G. Murgía Sánchez. 1998. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Coordinación de Servicios Editoriales de la Facultad de Ciencias de la UNAM. México.
-

-
- ❖ Méndez, M. Y P. Karlsson. 2004. Between- population variation in size- dependent reproduction and reproductive allocation in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae) and its enviromental correlates. *Oikos* **104**: 59- 70.
 - ❖ Müller, K., Borsch, T., Legendre, L., Porembski, S., Theisen, I. y W. Barthlott. 2004. Evolution of carnivory in Lentibulariaceae and Lamiales. *Plant Biology* **6**(2004): 477- 490.
 - ❖ Müller, K. y T. Borsch. 2005. Phylogenetics of Utricularia (Lentibulariaceae) and molecular evolution of the *trnK* intron in a lineage whit high substitutional rates. *Plant Syst. Evol.* **250**:39- 67.
 - ❖ Niklas, K. J. 1997. The evolutionary Biology of plants. The University of Chicago Press.
 - ❖ Olvera, G. 1996. El Género Utricularia en México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM. Serie Botánica* **67**:347-384.
 - ❖ Olvera, G. y E. Martinez. 2002. Primer registro de Genlisea (Lentibulariaceae) para México. *Acta Botánica Mexicana* **59**: 71-73.
 - ❖ Pietropaolo, P. 1986. Carnivorous Plants of the World. Press Portland, Oregon.
 - ❖ Rhymer, J. y D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **27**: 83- 109.
 - ❖ Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**: 944 - 953.
 - ❖ Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review Ecological Systematics* **28**: 359 - 389.
 - ❖ Rutishauser, R. y B. Isler. 2001. Developmental genetics and morphological evolution of flowering plants, especially Bladderworts (*Utricularia*): Fuzzy arberian morphology complements classical morphology. *Annals of Botany* **88**:1173- 1202.
 - ❖ Ruzin, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford, Oxford University Press.
 - ❖ Schnell, D. 1976. Carnivorous Plants of the United States and Canada. J. Blair Publischer. Winston Salem, North California.
 - ❖ Siddiqui, A. y M. Farooq. 1965. Degeneration in the ovules of *Utricularia coerulea* L. var. *filicaulis* Clarke. *Bolletín of the Torrey Botanical Club* **4**:245 -249.
-

-
- ❖ Siddiqui, A. 1975. Studies in the Lentibulariaceae 7. The development of endosperm and embryo in *Utricularia coerulea* var *filicaulis* Clarke. *Bot Not.* **128**:432- 437.
 - ❖ Siddiqui S. A. 1978. Studies in the Lentibulariaceae 9. Pollination, fertilization, endosperm, embryo and seed in *Utricularia dechotoma* Labill. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie.* **100**:237-245.
 - ❖ Siddiqui, S. A. 1979. Studies in the Lentibulariaceae 11. The development of endosperm and embryology in *Utricularia cornuta* Mixch. *Proceedings of the Indian academy of sciences* **88**: 213-218.
 - ❖ Shivaramiah, G. 1964. A contribution to the embryology of *Utricularia exoleta* R. BR. *Current Science.* **33**: 501- 503.
 - ❖ Slack, A. 1980. The carnivorous plants. Cambridge, Massachusetts. MIT press.
 - ❖ Slinger, J. 1954. The morphology and anatomy of *Utricularia transrugosa* Stapf. *Bothalia* **6**: 385- 406.
 - ❖ Snyder, I. 1987. Carnivorous Plant Evolution: Family Lentibulariaceae. *Carnivorous Plant Newsletter* **16**(1):17-19.
 - ❖ Speta, F. y F. Fuchs. 1982. Neue *Pinguicula* - arten (Lentibulariaceae) aus México. *Stapfia* **10**: 111- 119.
 - ❖ Speta, F. y F. Fuchs. 1992. Neue *Pinguicula debbertiana* (Lentibulariaceae) eine weitere neue Art aus Mexiko. *Linzer Biol. Beitr.* **24**: 375 -380.
 - ❖ Stolt, H. 1936. Beiträge zur Embriologie del Lentibulariaceen. *Svensk Botanisk Tidskrift* **30**:690- 696.
 - ❖ Svensson, B., Carlsson, B., Karlsson, P. y K. Nordell. 1993. Comparative long- term demography of three species of *Pinguicula*. *Journal of Ecology* **81**: 635- 645.
 - ❖ Taylor, P. 1977. Lentibulariaceae. In Woodson, R. E. Flora of Panama. *Ann Missouri Bot. Gard.* **63**: 565 – 580.
 - ❖ Taylor, P. 1989. The genus *Utricularia*. *Kew Bulletin* **14**:1- 724.
 - ❖ Van Marm, J. y S.E. Lampard. 1992. Some notes on Mexican *Pinguicula*. *The International Pinguicula Study Group Newsletter* **2**: 12- 16.
 - ❖ Worley, A. y D. Lawrence. 1996. Size- dependent resource allocation and cost of reproduction in *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae).
-

-
- ❖ Wylie, R. B. and A. E. Yoccom. 1923. The endosperm of *Utricularia*. *Univ. Iowa Studies in natural history* **10**: 3-18.
 - ❖ Zamora, R. 2002. Environmental heterogeneity and the Ecology of carnivorous plants: implications for conservation. *Revista Chilena de Historia Natural* **75**:17-26.
 - ❖ Zamora, R., Gómez, J. y J. Hódar. 1998. Fitness responses of a carnivorous plant in contrasting ecological scenarios. *Ecology* **79** (5): 1630- 1644.
 - ❖ Zamudio, S. 1993. El género *Pinguicula* (Lentibulariaceae) en México. Primera reunión Académica Anual. Instituto de Ecología A. C.
 - ❖ Zamudio, S. y B. Ludlow- Wincher. 1993. No. 4. Lentibulariaceae, *Pinguicula*. In Ludlow-Weichers, N. Diego- Pérez y J. Márquez- Guzmán. eds. *Flora Palinológica de Guerrero*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
 - ❖ Zamudio, S. 2000. The genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in Mexico and Central America. Abstract of the XVI Internacional Botanical Congreso. St. Louis Missouri, USA.
 - ❖ Zamudio, S. 2001. Revisión de la sección *Orcheosanthus* del género *Pinguicula* (Lentibulariaceae). Tesis de Doctorado en Ciencias, Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - ❖ Zamudio, S. 2005. Familia Lentibulariaceae. In: *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Instituto de Ecología, A. C. Fascículo 136: 61pp.

PÁGINAS CONSULTADAS EN LINEA

- ❖ <http://www.omnisterra.com/botany/cp/slides/pings/pings.htm>
- ❖ http://www.omnisterra.com/bot/cp_home.cgi?name=pinguicula&submit=Submit+Query&search=cultivars
- ❖ http://www.pinguicula.org/pages/pages_principales/Bizarre.htm

