



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Hibridación interespecífica entre
Pinguicula ehlersiae y *Pinguicula
debbertiana*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

NORMA YVETTE CASTILLO SOSA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA
DR. SERGIO ZAMUDIO RUIZ

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/244/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de febrero de 2011 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) CASTILLO SOSA NORMA YVETTE con número de cuenta 96238471 con la tesis titulada "Hibridación interespecífica entre *Pinguicula elhersiae* y *Pinguicula debbertiana*", realizada bajo la dirección del (la) DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA:

Presidente: DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN
Vocal: DR. SERGIO ZAMUDIO RUIZ
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DRA. MARTHA JUANA MARTÍNEZ GORDILLO
Suplente: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de abril de 2011

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/grf*

Mi agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Por su apoyo durante el desarrollo y culminación del presente proyecto de investigación.

Para la realización de la presente tesis goce de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro de becario 225402, durante el periodo de febrero de 2009 a enero de 2011.

Agradezco de manera especial a los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Sonia Vázquez Santana	Facultad de Ciencias, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM
Dr. Sergio Zamudio Ruiz	Instituto Nacional de Ecología, Centro Regional del Bajío

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Sonia Vázquez Santana.

Agradezco la asesoría y estancia brindada por el Dr. Felipe Cruz García del laboratorio 104 del departamento de Bioquímica en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADEZCO

- ☞ A Dios por darme la oportunidad de vivir, por todas las enseñanzas y bendiciones que me ha dado.
- ☞ A la Dra. Sonia Vázquez Santana por el tiempo, compromiso y dedicación que me dio a lo largo de mi formación académica y profesional.
- ☞ Al Dr. Sergio Zamudio y al Dr. Felipe Cruz, por las enseñanzas, la paciencia, los comentarios y observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.
- ☞ A los integrantes del jurado revisor: Dra. Judith Márquez Guzmán, Dr. Sergio Zamudio Ruiz, Dr. Felipe Cruz García, Dra. Martha Juana Martínez Gordillo y al Dr. Luis Felipe Jiménez García, por sus valiosas observaciones y comentarios críticos a este trabajo.
- ☞ A mis padres que con su ejemplo y amor me han ayudado a alcanzar los objetivos que me he propuesto.
- ☞ A mi hermana que siempre ha estado a mi lado cuando la he necesitado.
- ☞ A mis amigos por todas las experiencias que compartimos a lo largo de estos años, ustedes saben lo importantes que son en mi vida y lo mucho que los quiero.
- ☞ A mis queridos maestros y compañeros del Laboratorio de Desarrollo en Plantas.
- ☞ A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio 104 del Conjunto E, gracias por su amistad, ayuda y apoyo en el laboratorio. Especialmente a Yuridia, quien con su tolerancia y enseñanza me ayudó a domar los AFLP's.
- ☞ A la Dra. Silvia Espinoza Matías, por el procesamiento y toma de fotografías en el Microscopio Electrónico de Barrido.
- ☞ Al Sr. Adolfo, por la asesoría en la propagación y geminación de semillas de *Pinguicula*.

“En medio del invierno, me pareció que había, dentro de mí, un invencible verano”.

Albert Camus

"Cuánto más se sabe, más se desea aprender. Con el saber crece paralelamente la sensación de no saber o, mejor dicho, de saber que no se sabe."

Friederich Von Schlegel

"Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la investigación desinteresada e incesante de la verdad."

Karl Popper

"La transición de los datos a la teoría requiere imaginación creativa. Las hipótesis y teorías científicas no se "derivan" de los hechos observados, sino que se "inventan" para dar cuenta de ellos."

Carl Hempel



ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	
1.1. Especiación	3
1.2. Fuerzas evolutivas involucradas en el proceso de especiación	3
1.3. Aislamiento reproductivo y barreras para el flujo genético	5
1.4. Modos de especiación	6
1.5. Hibridación natural	7
II. Antecedentes inmediatos	10
2.1. Hibridación en Lentibulariaceae	12
2.2. Marcadores moleculares en plantas	14
III. Hipótesis	16
IV. Objetivos	16
4.1. Objetivo general	16
4.2. Objetivos particulares	16
V. Materiales y métodos	
5.1. Especies estudiadas y sitios de colecta	17
5.2. Colecta de material	20
5.3. Obtención de la generación F ₁	20
5.4. Análisis morfológico	20
5.4.1. Técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB)	20
5.4.2. Tinción de Alexander (viabilidad de los granos de polen)	20
5.4.3. Pruebas de germinación de semillas	21
5.5. Caracterización molecular	22
VI. Resultados y discusión	
6.1. Análisis morfológico	25
6.1.1. Morfología floral	25
6.1.2. Morfología atípica en las posibles especies híbridas	30
6.1.3. Paladar	31
6.1.4. Polen	31

6.1.5. Semillas	34
6.2. Conteo y viabilidad de los granos de polen	36
6.3. Pruebas de germinación de semillas	38
6.4. Características morfológicas de los híbridos artificiales	40
6.5. Caracterización molecular	42
6.6. Análisis fenético	43
VII. Conclusiones	48
Literatura citada	49
Apéndice I	57
Apéndice II	60
Apéndice III	61
Apéndice IV	63
Apéndice V	65

RESUMEN

El género *Pinguicula*, formado por plantas insectívoras, tiene su principal centro moderno de diversificación en México, donde se concentra casi el 50% de las especies existentes en el mundo, la mayoría endémicas del país. Este género comprende aproximadamente 86 especies de plantas herbáceas, perennes o anuales, de hábito terrestre o epifítico; sus hojas se concentran en una roseta basal y están densamente cubiertas en el haz con tricomas glandulares y glándulas sésiles que les permiten atrapar y digerir a sus presas.

Dentro del género se han mencionado algunas especies de origen híbrido, pero sin ser corroboradas. Debido a ello y a la gran importancia que tiene la hibridación en la formación de nuevas especies, se presenta el estudio de un complejo híbrido natural que podrían ser resultado de la hibridación en el pasado entre *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana*. Entre las especies del complejo híbrido se encuentran *Pinguicula esseriana* y *Pinguicula jaumavensis*, las que forman poblaciones cuyos individuos presentan características morfológicas tanto de *P. ehlersiae* como de *P. debbertiana* y aunque actualmente los posibles parentales no se encuentran cercanos a las poblaciones híbridas, se creó que existió un contacto entre ellas en el pasado. Se analizaron aspectos reproductivos y se revisaron caracteres morfológicos y moleculares que permitieron analizar a los taxa involucrados y establecer mediante análisis estadísticos las relaciones de similitud que estas especies guardan entre sí.

Los resultados encontrados muestran que los híbridos naturales son fértiles; sin embargo, tienen una esterilidad masculina parcial, ya que a pesar de que se forman los granos de polen, éstos tienen una baja viabilidad y algunas malformaciones, llevando a una escasa producción de frutos y semillas. Sin embargo, alternan la reproducción sexual con reproducción asexual propagándose por medio de las hojas de las rosetas de invierno (como en otras especies de *Pinguicula*). También se encontraron anomalías en la formación de los lóbulos de la corola, estigmas y anteras. El análisis estadístico basado en los caracteres moleculares sitúa a los taxa *P. esseriana* y *P. jaumavensis* en un solo grupo, con lo que se confirma positivamente la hipótesis inicial de hibridación en el pasado entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*, aunque actualmente están aisladas geográficamente.

ABSTRACT

The genus *Pinguicula*, consisting of insectivorous plants, it has its main modern center of diversification in México, where live almost 50% of existing species in the world, most of them endemics to the country. This genus is formed by about 86 species of herbaceous, perennial or annual, terrestrial or epiphytic plants; its leaves are concentrated in a basal rosette and are densely covered in the upper side with glandular trichomes which allow them to trap and digest their preys.

Within the genus some species of hybrid origin have been mentioned, but without be corroborated. Because of this and the great importance of the hybridization in the formation of new species, we studied a complex of natural hybrids that could be the result of hybridization in the past between *Pinguicula ehlersiae* and *Pinguicula debbertiana*.

Among the species of the complex hybrid are *Pinguicula esseriana* and *Pinguicula jaumavensis*, which form populations whose individuals show morphological characteristics of both *P. ehlersiae* and *P. debbertiana*. Although currently the putative parentals are not close to the hybrid populations, it is believed that there existed a contact between them in the past.

Morphological, reproductive and molecular characters were analyzed in order to explore the relationships among the taxa involved through statistical analyzes.

The results show that natural hybrids are fertile; however, they have partial male sterility, because the pollen grains have low viability and some malformations, leading to a low production of fruits and seeds. However, sexual reproduction alternate with asexual reproduction, which occur through the winter rosette leaves (as in other species of *Pinguicula*). There were found also abnormal in the forms of in the corolla lobes, stigma and anthers.

The statistical analysis based on molecular characters places *P. esseriana* and *P. jaumavensis* into a single group, confirming the proposed hybridization in the past between them, *P. debbertiana* and *P. ehlersiae*, in spite of now they are isolated and independent species.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Especiación

El proceso de formación de nuevas especies es llamado especiación (Hollocher, 2000), y es la principal fuente del incremento de la biodiversidad en el planeta, ocurre cuando el intercambio genético entre poblaciones hermanas se reduce lo suficiente como para permitir que cada una siga su propio camino evolutivo (Bush, 2001). Es un mecanismo de magnitud asombrosa, sobre todo si consideramos que todas las especies de plantas verdes comparten un ancestro común en una simple alga que vivió hace unos 500 millones de años (Brown y Lomolino, 1998).

La especiación es un proceso casi tan complejo y variado como la diversidad por si misma (Hollocher, 2000). Pero para entender cómo se origina la biodiversidad, es decir, cómo se produce la especiación, primero hay que diferenciar una especie. Desde el siglo pasado se han desarrollado varias definiciones de especies (Tabla 1) y en la actualidad no existe una sola definición universalmente aceptada (Hollocher, 2000; Hey, 2001, 2006; Perfectti, 2003).

Sin embargo, los estudios sobre biología evolutiva y especiación se centran principalmente en la adquisición de aislamiento reproductivo (Perfectti, 2003), esto es, usan el concepto biológico de especie (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942). Este concepto define a las especies como un grupo de organismos reproductivamente aislado, que forman un linaje evolutivo diferenciado y existen barreras geográficas y/o biológicas que impiden el intercambio genético con otras poblaciones. Estos organismos constituyen poblaciones independientes en cuanto a su respuesta genética a las fuerzas ambientales que causan el cambio evolutivo (Brown y Lomolino, 1998). Este concepto falla cuando lo aplicamos a especies fósiles o a especies con reproducción asexual. Además, hay muchos ejemplos de especies que hibridan y producen descendencia viable y fértil (Perfectti, 2003).

1.2. Fuerzas evolutivas involucradas en el proceso de especiación

La especiación es la divergencia de las poblaciones en sus características genéticas como resultado de la influencia que ejercen sobre ellas fuerzas evolutivas como la deriva génica, la selección natural, la selección sexual, el flujo genético y la mutación. Los alelos, es decir, las diferentes formas de un mismo locus en un gen, son los responsables de las diferencias en los rasgos heredables de un individuo a lo largo del tiempo (Hollocher, 2000).

Tabla 1. Principales conceptos de especie. (Sintetizado y adaptado de Wheeler y Meier, 2000 y Perfectti, 2003).

Concepto	Autores	Criterios
Morfológico	Naturalistas de los siglos XVIII y XXI	Características morfológicas
Fenético	Sneath y Sokal, 1973	Análisis morfométricos y taxonomía numérica
Agrupamiento genotípico	Mallet, 1995	Análisis genéticos
Biológico	Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942	Aislamiento reproductivo
Reconocimiento	Paterson, 1985	Interacciones entre los miembros
Evolutivo	Wiley, 1981	Aislamientos por barreras ecológicas y geográficas
Filogenético	Cracraft, 1989	Apomorfías y sinapomorfías
Genealógico	Baum y Shaw, 1995	Exclusividad
Cohesivo	Templeton, 1989	Interacción genética y/o demográfica

La **deriva génica** es el cambio al azar en la frecuencia de los alelos a lo largo de las generaciones de una población finita (Hollocher, 2000). Es una fuerza relativamente débil, pero importante a lo largo de muchas generaciones. Su efecto en grandes poblaciones es relativamente pequeño, pero puede influir de forma importante la evolución de pequeñas poblaciones como ocurre en las islas, donde nuevas especies empiezan a partir de pequeñas poblaciones fundadoras (Brown y Lomolino, 1998).

La **selección natural** es el proceso evolutivo por el cual se presentan las variaciones heredables son preservadas y llegan a ser más comunes en generaciones sucesivas dentro de una población (Darwin, 1859). Este proceso modifica la tasa reproductiva o la eficacia biológica de los seres vivos en relación con características heredables, dando lugar a cambios en las frecuencias de los fenotipos de la población en generaciones futuras (Soler, 2003). Durante muchas generaciones, los alelos para determinados rasgos adaptativos tienden a incrementar su frecuencia a expensas de alelos que confieren menor eficacia biológica. Las poblaciones tienden a divergir si existe suficiente variación en el ambiente para seleccionar diferentes características de acuerdo con diferentes condiciones ambientales (Brown y Lomolino, 1998).

Por otro lado, la **selección sexual** es un mecanismo que mejora la habilidad de los organismos para reproducirse y dejar mayor descendencia. Ésta surge de las diferencias en el éxito reproductivo causado por competencia durante los apareamientos (Hollocher, 2000).

El **flujo genético** es el movimiento de los alelos, dentro de una población o entre diferentes poblaciones, causado por la dispersión de los gametos o de la descendencia. Tiende a actuar en contra de la deriva génica y la selección natural, pues retarda la divergencia genética. Los individuos que migran a una nueva área, y que portan sus genes

con ellos, y que se reproducen exitosamente, difunden sus genes dentro de la población local. Esta migración genética influye previniendo o por lo menos retardando el desarrollo de poblaciones diferenciadas geográfica y genéticamente (Brown y Lomolino, 1998).

La selección (natural o sexual) y la deriva génica sólo pueden actuar cuando existe variabilidad genética. Aunque algo de variabilidad puede ser generada a través de la recombinación genética y la selección al azar de los gametos durante la reproducción, la **mutación** espontánea es la principal fuente de variación genética (Hollocher, 2000). Las mutaciones espontáneas se producen de forma natural en los individuos de las diferentes poblaciones, debido a errores producidos a escala pluricelulares, lo cual ocurre con una probabilidad de entre 10^{-5} y 10^{-14} según la especie (Cabrero y Camacho, 2003). Normalmente, las mutaciones espontáneas son dañinas para el individuo, lo que se traduce generalmente en la muerte de éste y por lo tanto no suelen pasar a generaciones posteriores. Sin embargo, en ocasiones son benéficos, representando una ventaja adaptativa frente al resto de individuos de la población, ya que confieren una mayor eficacia biológica al individuo en el que ocurre, aumentando así el éxito reproductivo de éste y por lo tanto pasando a sucesivas generaciones (Cabrero y Camacho, 2003).

1.3. Aislamiento reproductivo y barreras para el flujo genético

El libre intercambio de genes entre poblaciones que se están adaptando a diferentes nichos inhibe la evolución de sistemas genéticos independientes. Tan pronto se forman las combinaciones de genes en respuesta a presiones adaptativas, éstas se deshacen por la recombinación causada por la reproducción entre individuos de diferentes poblaciones (Bush, 2001). Por otra parte, el aislamiento reproductivo es la incapacidad de producir descendencia viable entre los individuos de diferentes poblaciones (Brown y Lomolino, 1998). Éste puede ser producido por diferentes barreras reproductivas agrupadas en dos tipos: precigóticas y poscigóticas.

Las barreras precigóticas incluyen las situaciones que impiden la reproducción, como el aislamiento ecológico o de hábitat, el aislamiento estacional o temporal, el aislamiento sexual, así como barreras mecánicas o fisiológicas para la reproducción, carencia de polinizadores y el aislamiento de los gametos que bloquea la fecundación (Hollocher, 2000).

Por otro lado, las barreras poscigóticas incluyen aquellas situaciones posteriores a la fecundación post-cópula que reducen la eficiencias de los híbridos, como la mortalidad de los cigotos, la inviabilidad de los híbridos, la esterilidad de los híbridos y la baja eficiencias de éstos en el uso de determinados recursos (Hollocher, 2000; Perfectti, 2003).

1.4. Modos de especiación

La especiación conlleva el debilitamiento de las fuerzas que mantienen a las poblaciones juntas, como por ejemplo el flujo genético, el compartir sistemas reproductivos, sufrir mutaciones recurrentes o la selección natural en el mismo ambiente, y favorece la ocurrencia de otras fuerzas que llevan a la divergencia de las poblaciones, como la acción de la deriva génica, sufrir mutaciones diferentes y la selección natural y sexual en diferentes ambientes en ausencia de flujo genético (Hollocher, 2000).

Existen varias clasificaciones basadas en diferentes criterios para distinguir los modos de especiación, como por ejemplo una clasificación centrada en los mecanismos que llevan a la evolución del aislamiento reproductivo (Shluter, 2001) o una clasificación basada en la distribución geográfica resultante tras el proceso (Perfectti, 2003). Sin embargo la más utilizada en biología evolutiva es la que se basa en la forma de especiación geográfica (alopátricos) y la ecológica (no alopátricos) es (Bush, 2001).

- 1) La **especiación geográfica o alopátrica** es quizá el modo de especiación más simple y frecuente (Brown y Lomolino, 1998; Salomon, 2001). Ocurre cuando dos poblaciones se aíslan y la falta de intercambio genético permite el desarrollo de diferencias genéticas regionales en respuesta tanto a la selección natural como a la deriva genética. En este caso, las poblaciones alopátricas pueden desarrollar mecanismos de aislamiento reproductivo que impiden la reproducción una vez que las poblaciones vuelven a contactarse (contacto secundario) (Shluter, 2001). Este proceso de especiación puede ocurrir de dos maneras:
 - a. **Especiación dicopátrica o vicariante**, que ocurre cuando una población con una amplia zona de distribución es dividida en dos o más sub-poblaciones por una barrera que impide el paso de los individuos.
 - b. **Especiación peripátrica** o de evento fundador, sucede cuando un pequeño número de individuos fundadores establecen una población geográficamente aislada (Hollocher, 2000).

La especiación geográfica o alopátrica puede o no ir acompañada de una transformación ecológica, debido a que el aislamiento reproductivo entre poblaciones hermanas origina y acumula cambios genéticos de forma independiente en cada población durante el periodo de aislamiento geográfico (Bush, 2001).

- 2) La **especiación ecológica o no alopátrica** ocurre cuando la reproducción se realiza dentro de un hábitat determinado o cuando existe una preferencia para reproducirse con una determinada variación sexual fenotípica, la que está asociada a un determinado hábitat. En los organismos con reproducción sexual se reconoce la existencia de tres modos de especiación ecológica:

- a. **Especiación parapátrica**, tiene lugar cuando especies hermanas evolucionan por adaptación a hábitats contiguos, pero espacialmente segregados o con ecotonos a lo largo de una estrecha zona de contacto (Perfectti, 2003).
- b. **Especiación simpátrica**, ocurre en ausencia de segregación geográfica cuando especies hermanas evolucionan dentro de la misma área de distribución, normalmente usando distintos nichos ecológicos, es decir, por adaptación al uso de diferentes recursos.
- c. **Hibridación**, sucede cuando nuevas especies evolucionan rápidamente a partir de la reproducción entre especies hermanas por una variedad de diferentes procesos. La hibridación como modo de especiación es un fenómeno frecuente en plantas, aunque muy raro en animales (Bush, 2001).

La adaptación a diferentes hábitats es la fuerza que inicia y mantiene la divergencia genética. La selección divergente sobre la variación genética existente lleva a la evolución del aislamiento reproductivo, así como, diferentes rasgos de variación genética son favorecidos por cada hábitat diferente.

1.5. Hibridación natural

La hibridación natural puede definirse como un proceso que genera descendencia a partir del entrecruzamiento de individuos pertenecientes a poblaciones de dos entidades que pueden distinguirse con base en por lo menos un carácter heredable, independientemente de su estatus taxonómico (Harrison, 1990, 1993; Arnold, 1997). Las poblaciones naturales que incluyen a individuos pertenecientes a ambos taxa progenitores, así como a híbridos con diversas genealogías y se conocen como *enjambres híbridos* (Arnold, 1997).

El resultado de la hibridación es la producción de descendencia, cuya fertilidad puede variar desde completamente fértil hasta completamente estéril (Grant, 1981; Abbot, 1992; Hughes y Harris, 1994; Rieseberg, 1995, 1997; Thórsson *et al.*, 2007), o incluso no llevar a cabo la reproducción sexual y sustituirla por reproducción vegetativa o agamospermia.

La esterilidad en los híbridos dependerá de la distancia genética que exista entre los taxa parentales (Niklas, 1997; Rieseberg, 1997) o del inadecuado desarrollo y funcionamiento de las estructuras reproductoras y/o anomalías en el apareamiento y segregación de los cromosomas durante la meiosis de los individuos híbridos (Jones, 1988; Lester y Kang, 1998; Kameyama *et al.*, 2005).

Algunas veces la hibridación es un evento que puede llevar a la introgresión, en donde existe un flujo de genes entre dos especies diferenciadas, como producto de repetidos eventos de hibridación y retrocruzamiento, incorporando alelos de una especie o taxón híbrido a uno o los dos taxa parentales (Arnold, 1997; Thórsson *et al.*, 2007). 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 denomina 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 poco ventajosas en la segunda generación (F2). Estas características recesivas pueden estar enmascaradas en el genotipo, pero luego de la segregación y de la distribución independiente esas características pueden aparecer en generaciones subsecuentes (Arnold y Hodges, 1995; Kameyama *et al.*, 2005; Thorsson *et al.*, 2007).

La hibridación puede presentarse entre especies de un género e incluso aunque con menor frecuencia entre especies de dos géneros (Rieseberg, 1995, 1997). También pueden presentarse eventos raros de hibridación en la que estén involucradas más de dos especies, tal es el caso de los triples híbridos, los que son resultado de la cruce de un híbrido primario con una tercera especie, ó bien la presencia de superhíbridos resultantes de la cruce de dos diversos híbridos fértiles, como en *Crataegus* (Kaplan y Fehver, 2007).

Para que se realice la hibridación, se requiere de la ocurrencia de varios factores como una floración sincrónica entre los taxa parentales, que haya una distribución sobrelapada, que compartan polinizadores, permitiendo polinización entre ellos y que no exista incompatibilidad entre los taxa, para que el polen pueda germinar y lograr la fecundación (Harrison, 1990, 1993; Ellstrand, 1999; Kameyama *et al.*, 2005).

Los eventos de hibridación permiten la formación de nuevas combinaciones de genes, que pueden resultar favorables en nuevos ambientes con respecto a aquellos en que se encuentran los parentales. Cuando esto ocurre, la hibridación ofrece una alternativa viable a otros atributos tales como la resistencia a las enfermedades o climas extremos, la 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; los dichos fenotipos que nunca antes habían sido probados por la selección natural pueden generar varios picos adaptativos (Barton y Hewitt, 1981; Rieseberg, 1997; Barton, 2001).

Los estudios realizados en *Pinguicula* mexicanas han mostrado que el género es muy antiguo en las montañas mexicanas, en donde ha 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).

En la presente investigación se aborda un problema de hibridación dentro del género *Pinguicula* de la familia Lentibulariaceae, en el que se encuentran involucradas cuatro poblaciones, determinadas como especies diferentes.

Se parte de la hipótesis de que *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana* (ambas del municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí), pudieron ser los progenitores de *Pinguicula esseriana* (de Cadereyta, Querétaro) y *Pinguicula jaumavensis* (de Jaumave, Tamaulipas), ya que estas dos últimas especies presentan características similares, posiblemente producidas al mezclarse las características de los primeros taxa.

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS

La familia Lentibulariaceae del orden Lamiales está integrada por los géneros *Utricularia*, *Genlisea* y *Pinguicula*, que suman más de 300 especies. Son pequeñas plantas carnívoras, herbáceas, anuales o perennes. Tienen una distribución casi cosmopolita, se encuentran en hábitats acuáticos, subacuáticos o terrestres. La importancia de estas plantas 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, tropicales, como en el círculo polar ártico (Gibson, 1974; Taylor, 1977; Juniper *et al.*, 1989).

Con base en análisis moleculares recientes sobre filogenia en plantas carnívoras, se ha establecido que la familia 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). El género *Pinguicula* comprende aproximadamente 86 especies de plantas herbáceas, perennes o anuales, de hábito terrestre o epifítico; sus hojas se concentran en una roseta basal y están densamente cubiertas en el haz con tricomas glandulares y glándulas sésiles 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.

A pesar de la existencia 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 reproductiva, incluida la biología de la polinización, el desarrollo floral, la genética, la biología molecular y la embriología (Zamudio, 2001, 2005; Espinosa, 2005; Espinosa *et al.*, 2005).

Casper (1966) reconoció 13 especies de *Pinguicula* para México y Centroamérica, sin embargo durante los últimos años el número de especies ha aumentado hasta llegar a cuarenta y seis taxa. Nuestro país también alberga 20 especies de *Utricularia* y una sola especie de *Genlisea* (Zamudio, 2001; Olvera y Martínez, 2002; Espinosa, 2005; Zamudio y Olvera, 2009).

Existen dos regiones de mayor diversidad del género *Pinguicula* en el mundo; una de ellas se encuentra alrededor del Mediterráneo en Europa, mientras que el área de mayor diversidad incluye a México, Centroamérica y las Antillas Mayores en América. Con cuarenta y seis 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).

En las plantas del género *Pinguicula*, la inflorescencia se ha reducido a su mínima expresión, por lo que cada pedúnculo da lugar a una sola flor terminal. Durante la temporada de floración, cada roseta produce entre uno y cinco pedúnculos. Las flores son 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*¹ 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*², 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 a mayor altura que las anteras, de tal forma que las cubre (Godfrey y Stripling, 1961; Schnell, 1976; Zamudio, 1993, 2001, 2005).

Pinguicula esseriana, *Pinguicula jaumavensis*, *Pinguicula debbertiana* y *Pinguicula ehlersiae*, 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 es entero (rara vez alguno de ellos emarginado), de coloración purpúrea, morada, roja o blanca, el tubo de la corola infundibuliforme de longitud variable, con o sin paladar, el espolón 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 tres de las especies involucradas en este estudio, *P. ehlersiae*, *P. jaumavensis* y *P. esseriana*); la sección *Longitubus* con cinco especies; la sección *Pinguicula* con dos, una de ellas es la cuarta especie involucrada en este estudio (*P. debbertiana*); por último la sección *Homophyllum* con una especie (Casper, 1966; Zamudio, 2000, 2001, 2005; Espinosa, 2005).

Situación taxonómica de las especies estudiadas

En 1981, Kirchner publicó la descripción de *P. esseriana*, colectada en las cercanías del Huizache, San Luis Potosí. Ubicándola en la sección *Orcheosanthus*. Un año después, Speta y Fuchs (1982) describieron dos nuevas especies, entre las que se encontraba *P. ehlersiae* de Guadalcazar, San Luis Potosí. Los mencionados autores, basándose en la gran similitud que compartían *P. esseriana* y *P. ehlersiae* en la forma y características de las hojas, así como en el número cromosómico somático de ambas especies ($2n= 32$), mismo que difiere al reportado en la mayoría de las especies estudiadas en la sección *Orcheosanthus* $2n= 22$. Decidieron separar a *P. esseriana* y *P. ehlersiae* en una nueva sección *Crassifolia*.

Se describe de acuerdo a la terminología utilizada por Zamudio (2001): ¹ *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 y representa al nectario. ² *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 que bien podría representar un osmóforo.

En 1991, Debbert describió *P. jaumavensis* colectada en unos peñascos cerca de Jaumave, en el estado de Tamaulipas; en su descripción señaló la afinidad del nuevo taxón con *P. esseriana*. En 1992 fue publicada *P. debbertiana* por Speta y Fuchs, con base el material colectado por Debbert, en las cercanías del Huizache, San Luis Potosí. Tanto *P. jaumavensis* como *P. debbertiana*, fueron colocadas por los autores en la sección *Crassifolia*.

Zamudio (2001), propone la permanencia de *P. esseriana* y *P. ehlersiae* en la sección *Orcheosanthus* debido a que estas especies cumplen muy bien con las características distintivas de esta sección. También sugiere que *P. debbertiana* se ubica mejor en la sección *Pinguicula*, por presentar un paladar bien desarrollado teñido de color amarillo, así como tener un limbo con una garganta muy amplia. En este mismo trabajo, el autor propone que *P. esseriana* y *P. ehlersiae* son entidades pertenecientes a una misma especie, en la que se podrían distinguir dos variedades. Siendo las diferencias más notorias entre ellas son la presencia de una mancha y un pladar densamente piloso en *P. esseriana* var. *esseriana*, características que no se encuentran en *P. esseriana* var. *ehlersiae*. Zamudio, considera a *P. jaumavensis* como una variante de *P. esseriana* var. *esseriana*. Cieslak et al. (2005), ubicaron nuevamente a *P. esseriana*, *P. ehlersiae* y *P. debbertiana* en la sección *Crassifolia*, basándose en caracteres morfológicos y en secuencias de DNA de cloroplasto.

2.1. Hibridación en la familia Lentibulariaceae

La hibridación en esta familia ha sido un tema poco estudiado, actualmente sólo se ha reportado dos caso de hibridación natural en la familia Lentibulariaceae. El primer caso se encuentra en el género *Utricularia*, el cual fue ampliamente estudiado y resuelto por Kameyama y Ohara (2006). Mientras que para el género *Pinguicula*, se ha reportado la presencia de hibridación natural entre *Pinguicula grandiflora* x *Pinguicula vulgaris*, dando origen a *Pinguicula* x *scullyi*, este hallazgo aún no ha sido corroborado (<http://www.pinguicula.org>). Para el género *Genlisea* se desconoce la presencia de híbridos naturales.

En los últimos años el interés de los horticultores por las pinguículas ha aumentado gracias a la facilidad para su cultivo, y por de pertenecer al grupo de plantas carnívoras. Ellos han intentado la formación de híbridos artificiales entre algunas especies de *Pinguicula* cultivadas principalmente en Europa (Zamudio, 2001; Tabla 2).

La extraordinaria variación de la corola en *P. esseriana* y *P. jaumavensis* hizo que Zamudio (2001), pensara en la posibilidad de que ambas especies se hubieran originado por eventos de hibridación en el pasado reciente. La presencia del 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 *Orcheosanthus* 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, mientras que la presencia de una garganta más estrecha, un espolón largo, así como la forma de la corola; sugieren a *P. ehlersiae* como el otro parental.

Tabla 2. Lista de algunos híbridos artificiales registrados.

Nombre común	Cruza	Fuente
Aphrodite	<i>P. agnata x P. moctezumae</i>	Carnivorous Plant Newsletter 33:88 (2004)
* Bettie	<i>P. debbertiana x cyclosecta</i>	Carnivorous Plant Newsletter 39:78-81 (2010)
+ Enigma **	<i>P. cyclosecta x P. esseriana</i>	Carnivorous Plant Newsletter 33:88 (2004)
* Florian +	<i>P. debbertiana x P. jaumavensis</i>	Carnivorous Plant Newsletter 33:20 (2004)
George Sargent	<i>P. moranensis x P. gypsicola</i>	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Gina	<i>P. zecheri x P. agnata</i>	Carnivorous Plant Newsletter 21:6 (1992)
Hameln	<i>P. gypsicola x P. moranensis</i>	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Hanka	<i>P. zecheri x P. rotundiflora</i>	Carnivorous Plant Newsletter 29:46 (2000)
* L'Hautil	<i>P. ehlersiae x P. moranensis</i>	IPSG Newslett.3:8 (1993)
* Pirouette	<i>P. agnata x P. moranensis x P. ehlersiae</i>	Carnivorous Plant Newsletter 29:17 (2000)
* Sethos	<i>P. ehlersiae x P. moranensis</i>	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Tina	<i>P. agnata x P. zecheri</i>	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)
Titan	<i>P. agnata x P. macrophylla</i>	Carnivorous Plant Newsletter 30:11 (2001)
* Weser	<i>P. moranensis x P. ehlersiae</i>	Insect-Eat.Pl. & How to Grow Them:113 (1986)

* especies progenitoras involucradas en este estudio; + especies híbridas involucradas en este estudio, ** Posible híbrido natural.

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)** 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)** alta proporción de polen anormal o aberrante; **d)** ausencia o escasa producción de frutos y semillas y **e)** la gran capacidad de propagación vegetativa a partir de las hojas de las rosetas de invierno (Zamudio, 2001, 2005; Castillo, 2007).

Existen evidencias que sustentan este posible hecho, como la compatibilidad entre estas especies, los polinizadores compartidos, la floración sincrónica y la distribución sobrelapada entre los taxa parentales en el municipio de Guadalcázar (San Luís Potosí),

lo que permite la exitosa fecundación y la generación de semillas híbridas (Zamudio, 2001; Castillo, 2007).

En las últimas décadas la hibridación ha sido objeto de numerosos estudios. En algunos de ellos se caracteriza a los híbridos a nivel morfológico, ya que al cruzarse dos especies, por lo general los híbridos presentan características morfológicas intermedias entre ambos progenitores, como consecuencia de la combinación de los genomas de los padres. Algunas veces los híbridos son particularmente estériles, pero cuando la fertilidad permite que se retrocruzen con los padres, la caracterización se vuelve complicada (Caputo *et al.*, 1981; Grant, 1981; Steinbruck *et al.*, 1986; Abbot, 1992; Rieseberg *et al.*, 1996; Thórsson *et al.*, 2007).

2.2. Marcadores moleculares en plantas

En general, los criterios que se han utilizado para la identificación y caracterización de híbridos son de índole cromosómico y morfológico. Sin embargo, debido a la gran importancia evolutiva atribuida a la hibridación y por lo tanto a la necesidad de presentar la mayor evidencia posible, recientemente se han utilizado técnicas moleculares que involucran un examen directo de DNA. La posibilidad de identificar híbridos con técnicas moleculares es una herramienta poderosa que ha ayudado a apoyar fuertemente los estudios realizados con caracteres morfológicos (Rosabelles, 1999; Meudt y Clarke, 2007).

Las ventajas de los marcadores moleculares sobre los caracteres morfológicos en el estudio de la hibridación incluyen: (1) el gran número de marcadores moleculares disponibles para el análisis; (2) los niveles generalmente bajos de variaciones moleculares no heredable y (3) la aparente selección neutral de muchos marcadores moleculares (Rieseberg y Ellstrand, 1993).

Los buenos marcadores son aquellos que, en la misma región del genoma, muestran variación entre organismos de la misma especie. Esto permite determinar diversidad entre familias y poblaciones; servir como base para la identificación de especies, cepas, híbridos y recursos genéticos; establecer paternidad y realizar el mapeo genómico aplicable en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular y genética conservacionista, entre otros (Liu y Cordes, 2004).

Existen varias técnicas para definir marcadores moleculares y detectar polimorfismos. Entre las técnicas más utilizadas en la última década están los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeat*), las amplificaciones al azar de ADN polimórfico ó RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción ó RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y el polimorfismo del largo fragmento amplificado o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), (Powell *et al.*, 1999; Montaña, 2006; Meudt y Clarke, 2007).

Los AFLPs proporcionan un buen nivel de precisión y reproducibilidad en la generación de marcadores moleculares, lo que garantiza una alta confiabilidad en estudios

de diversidad y relaciones genéticas (Vriesendorp y Bakker, 2005; Contreras *et al.*, 2007; Hong-Guang *et al.*, 2008). En comparación con otras técnicas para generar marcadores moleculares como RFLP, SSR y RAPD, la técnica de AFLP permite mapear un gran número de loci a la vez, generando por lo tanto el más alto índice de diversidad y ha permitido la comprobación de varios híbridos de angiospermas (Caputo *et al.*, 1981; Steinbruck *et al.*, 1986; Abbot, 1992; Vos *et al.*, 1995; Liscum, 1999; Liscum y Oeller, 1999; Cruz, 2002; Parrish *et al.*, 2003, Kiew *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007).

Algunos ejemplos de estudios en hibridación con AFLPs se presentan en: *Allium* (van Raamsdonk *et al.*, 2000), *Arabidopsis* (cDNA-AFLP, Radu *et al.*, 2006), *Berberis* (Bottini *et al.*, (2002), *Cardamine* (Marhold *et al.*, 2004), *Calopogon* (Goldman *et al.*, 2004), *Cicer* (Shan *et al.*, 2005) *Eucalyptus* (McKinnon *et al.*, 2008), *Mentha* (Gobert *et al.*, 2002; Shasany *et al.*, 2005), *Oryza* (Aggarwal *et al.*, 1999), *Rhododendron* (Contreras *et al.*, 2007) y *Utricularia* (Kameyama y Ohara, 2006), este último género pertenece a la familia Lentibulariaceae.

III. HIPÓTESIS

Dado que *Pinguicula esseriana* y *P. jaumavensis* presentan características fenotípicas y genéticas intermedias entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*, baja fertilidad, amplia variación morfológica floral y alta reproducción vegetativa, se propone que éstas pudieron ser el resultado de uno o varios eventos de hibridación en el pasado.

IV. OBJETIVOS

4.2 OBJETIVO GENERAL

Demostrar el origen híbrido de *Pinguicula esseriana* y *P. jaumavensis* a partir de los supuestos parentales *Pinguicula ehlersiae* y *Pinguicula debbertiana*.

4.3. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener híbridos artificiales (F₁) entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*.
2. Caracterizar la morfología y fertilidad de los supuestos híbridos naturales (*P. esseriana* y *P. jaumavensis*).
3. Determinar las relaciones genéticas entre los posibles progenitores, los híbridos artificiales y los supuestos híbridos naturales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para abordar la propuesta de investigación se analizaron caracteres morfológicos y moleculares para delimitar a los taxa involucrados y establecer mediante análisis estadísticos las relaciones de similitud que estas entidades taxonómicas guardan entre sí.

5.1 Especies estudiadas y sitios de colecta

A continuación se describen concretamente el hábitat y sitio de colecta de cada una de las especies, para una descripción más detallada ver Apéndice I.

Pinguicula debbertiana (Speta y Fuchs, 1991). Es una especie perenne que crece en laderas de roca caliza con afloramientos de yesos, en las grietas de las rocas, entre el matorral submontano con rosetófilos, en donde predominan las especies de *Hechtia glomerata*, *Agave striata* y *A. lechuguilla*. Las poblaciones colectadas se localizan en la ladera noroeste en un cerro cercano al Parador Núñez en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, México; localizado a 3 km de la desviación a Matehuala-Guadalcázar, siguiendo la carretera Matehuala-Saltillo. La localidad se ubica a 22° 40' 33" N y 100° 28' 52" W y a una altitud de 1850 msnm. La época de floración es de febrero a abril, mientras se mantiene la roseta de invierno (Fig. 1).

Pinguicula ehlersiae (Speta y Fuchs, 1982). Son plantas herbáceas perennes que crecen en laderas de rocas calizas y metamórficas en las grietas de las rocas. Habitan en bosques de encinos. Se distribuye en la Sierra Madre Oriental, cubriendo los estados de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí. El material utilizado fue colectado en La Cueva del Gato en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, México. La localidad se ubica a 22° 38' 42" N y 100° 25' 29" W y a una altitud de 1860 m snm. La floración se presenta de enero a abril, mientras se mantiene la roseta de invierno (Fig. 1).

Pinguicula esseriana (Kirchner, 1981). Planta herbácea perenne que crece en las laderas de rocas calizas, sobre suelo somero, en las grietas de las rocas. Habita en bosque de pino piñonero con *Pinus cembroides*, *P. pinceana*, *Juniperus deppeana* y *J. flaccida*, en bosque de encino, y en matorral submontano del centro de Querétaro. Las poblaciones colectadas se localizan en el Parador El Tepozán (20° 54' 29" N y 99° 38' 59" W y altitud de 2350 msnm), en el municipio de Cadereyta, Querétaro, México. 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).

Pinguicula jaumavensis (Debbert, 1991). Planta herbácea perenne que crece en las laderas de rocas calizas, sobre suelo somero, en las grietas de las rocas. Habita en bosque de encinos. Se ubica a una Altitud de 1450 msnm. Las poblaciones colectadas se encuentran en El Puerto de Mulas, sobre la carretera Jaumave rumbo a Ciudad Victoria,

Tamaulipas, México. La localidad se encuentra a 23°36'52" N - 99°14'56" W. La floración se presenta en marzo.

Cabe señalar que en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, se han encontrado en simpatría a *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, lo que hace suponer que éstas puedan hibridar o que hayan hibridado con anterioridad, aunque en la actualidad las poblaciones conocidas de *P. esseriana* y *P. jaumavensis* (ambos propuestos como híbridos de los mismos parentales) se encuentran aisladas geográficamente, en los estados de Hidalgo y Querétaro la primera y en Tamaulipas la segunda. En la actualidad en las cercanías del Huizache, San Luis Potosí, en los cerros aledaños al Parador Nuñez, se encontraron algunos individuos de *P. esseriana* (uno de los posibles híbridos) donde habita *P. debbertiana*, el otro posible parental (Zamudio, 2001).

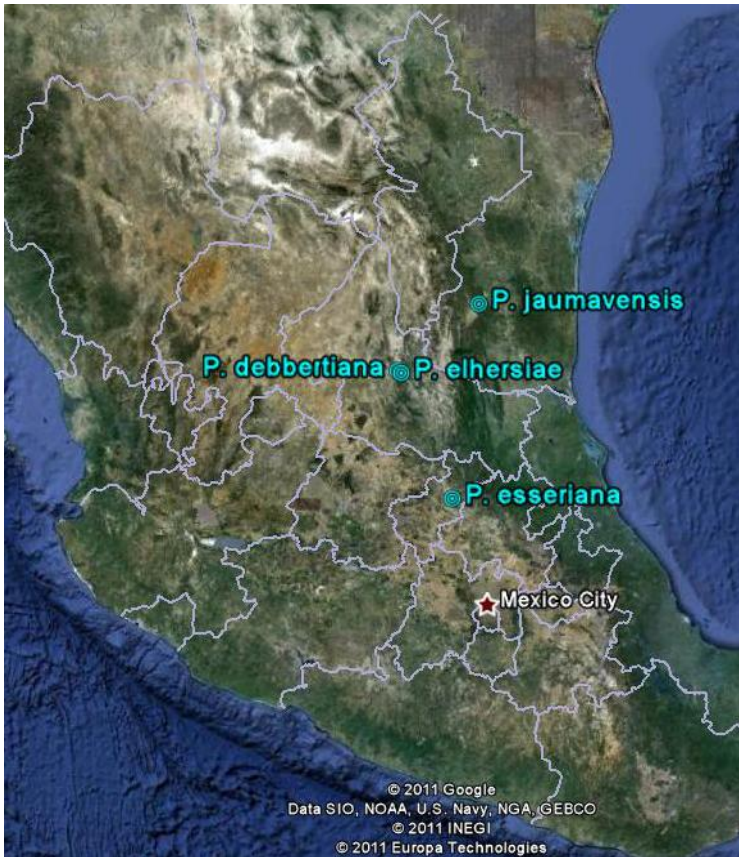


Figura 1. Mapa de los sitios de colecta de *Pinguicula debbertiana* y *P. elhersiae* (Municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí), *P. esseriana* (Municipio de Cadereyta, Querétaro) y *P. jaumavensis* (Municipio de Jaumave, Tamaulipas).

5.2 Colecta del material

El material biológico utilizado en esta investigación consistió de:

- ❖ Para la obtención de las diferentes cruzas así como para las pruebas de germinación y viabilidad de polen, fueron colectados individuos vivos de los cuatro taxa involucrados, colectados junto con el sustrato donde crecían. Estos fueron mantenidos en el invernadero del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.
- ❖ Para los análisis de AFLPs, se cortaron hojas jóvenes de 14 individuos por cada taxa.
- ❖ Así mismo se recolectaron flores en antesis, frutos y semillas, para ser fijadas en FAA (10% de formaldehído: 5% ácido acético: 50% alcohol etílico al 96%: 35% de agua) (López-Curto *et al.*, 2005). Para su posterior observación en el MEB.

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:

5.3 Obtención de la generación F₁

Se realizaron polinizaciones manuales entre *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, para obtener las semillas de la generación F₁. Una vez obtenidas las semillas, tanto de las cruzas de *Pinguicula debbertiana* x *Pinguicula ehlersiae* como a la de *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*, se germinaron en *peat moss* (sustrato neutro, que brinda humedad) y se mantienen en buenas condiciones para posteriores investigaciones cuando alcancen la etapa de floración.

5.4 Análisis morfológico

5.4.1 Técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB)

El material previamente fijado en FAA fue deshidratado gradualmente en etanol del 50 % al 100 % (ver Apéndice II), las muestras se secaron en una desecadora CPD-030 Balttec y se cubrieron utilizando una ionizadora Denton Vacuum Desk II. Las observaciones y toma de fotografías se hicieron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM- 5310LV.

5.4.2 Tinción de Alexander (viabilidad de los granos de polen)

Esta técnica se utilizó para determinar la viabilidad de los granos de polen utilizando material fresco, de *P. esseriana*, *P. jaumavensis*, *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*. Se tomó polen maduro de cinco flores (de cinco individuos) en antesis por cada especie. Las

flores se obtuvieron de diversos manchones para evitar en lo posible que se tratase del mismo individuo debido a la reproducción vegetativa. De cada flor se tomó una muestra de polen extraído de las dos anteras de flores frescas, se colocó sobre un portaobjetos, se agregó la solución de Alexander (ver Apéndice II) y se realizó 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 exina teñida de verde). Las observaciones se realizaron en cinco campos de 40x (para cada flor) y se contó el número de granos de polen viables.

5.4.3 Pruebas de germinación de semillas

Para conocer la viabilidad de las semillas de las cruzas: *P. ehlersiae* x *P. ehlersiae*, *P. debbertiana* x *P. debbertiana*, *P. esseriana* x *P. esseriana*, *P. jaumavensis* x *P. jaumavensis*, *P. debbertiana* x *P. ehlersiae* y *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*; se germinaron 4 lotes de 25 semillas por taxa, excepto para la crusa de *P. esseriana* x *P. esseriana* (para la que no hubo suficientes semillas). Debido a que la viabilidad se pierde rápidamente, las semillas se germinaron en los primeros días posteriores a la maduración del fruto. Las pruebas se realizaron en cajas Petri usando dos tipos de sustrato:

- Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a un tercio de la concentración normal. Tal y como lo hacen la mayoría de los horticultores que se dedican a la propagación de este tipo de plantas (ver Apéndice I).
- Peet Moss, previamente esterilizado.

La germinación se llevó a cabo bajo condiciones ambientales de luz y temperatura. Se consideró como semilla germinada aquella que presentara la emergencia de los cotiledones.

Los datos fueron sometidos al Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey, comparando medias con un nivel de significancia del 5%. Para ello, los datos porcentuales se normalizaron mediante la transformación arcoseno antes de realizar los análisis de varianza y la comparación de medias correspondientes (García de Santana y Ranal, 2000).

Cuando el análisis de la varianza fue significativo se realizó una prueba de Tukey de comparación múltiple de las medias para un nivel de significación del 5% ($P \leq 0,05$) (Sokal y Rohlf, 1979). Los datos fueron almacenados y transformados, según el caso, en hojas de cálculo del programa *Microsoft Excel 2000*. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa *Prism*. Los resultados se presentan en las tablas y en las figuras como media y desviación estándar de cada tratamiento.

5.5 Caracterización molecular

- **Purificación de DNA genómico**

Se tomaron muestras de tejido de hojas de 12 individuos por taxa y ocho individuos de la generación F1 de la cruce de *P. debbertiana* x *P. ehlersiae* y dos individuos *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*. En total, para la generación y el análisis de marcadores de DNA se tomaron en cuenta 56 individuos. La extracción de DNA total de estos individuos se llevó a cabo siguiendo el protocolo de extracción propuesto por Cruz (2002). Se pulverizaron de 0.5 – 0.6 g de hojas en nitrógeno líquido y se les adicionó 1.25 ml de buffer de extracción (ver Apéndice III), más la adición de 1.25 ml de PCI. La muestra se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 1.25 ml de PCI. Se centrifugó a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente al sobrenadante se le adicionó 1.25 ml de cloroformo y se centrifugó a 5000 rpm, durante 10 min.

La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó adicionando un volumen de isopropanol al sobrenadante obtenido en el paso anterior y se incubó durante 2 h a -20 °C. Después, se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min, a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en 490 µl de H₂O y 10 µl de RNAsa (20µg/ml). Se incubó a 37 °C durante 30 min. Se hizo una extracción con 500 µl de PCI agitando ligeramente. La muestra se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante fue precipitado con 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20 °C. Después, se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado fue lavado con 500 µl de alcohol al 70% y se dejó evaporar completamente. Finalmente el precipitado fue resuspendido en 55 µl de H₂O desionizada. Una vez obtenido el DNA genómico, se verificó la eficacia de este proceso electroforéticamente en un gel al 1% de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio y usando 10 µl de la reacción (ver Apéndice III).

- **Obtención de caracteres moleculares (DNA) por medio de AFLP's**

Para generar los marcadores moleculares se utilizó la técnica de AFLP desarrollado por Vos *et al.* (1995) y modificado por Liscum (1999). Esta técnica puede separarse en tres pasos básicos.

Digestión /Ligación de adaptadores. Para iniciar la digestión se incluyeron los siguientes reactivos : 20 µl de DNA genómico, 0.5 µl de EcoR1 (10U/µl), 1 µl de Mse1 (5U/µl), 2.5 µl de React. 1 (Invitrogen) y 1.0 µl de H₂O. La digestión doble se llevó a cabo durante toda la noche a 35°C. Posteriormente a 10 µl DNA digerido se le adicionaron 0.5 µl de cada uno de los siguientes adaptadores: Mse1 (ML33, 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'; ML34, 5' TAC TCA GGA CTC AT 3') y EcoR1 (ML35, 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'; ML36, AAT TGG TAC GCA GTC 3'). Más la adición de 6 µl de Buffer T₄ DNA ligasa, 1 µl de ligasa y 2 µl de H₂O. Se mezcló con micropipeta y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Volumen total de reacción: 20 µl (ver Apéndice III).

Preamplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Para evaluar la eficiencia de ligado de los adaptadores al DNA digerido, se tomaron 5 μ l del DNA quimérico (digerido y ligado) y se agregaron 0.6 μ l EcoR1 Core + Adaptador (ML37, GAC GAT GAG TCC TGA GTA A 3'), 0.6 μ l Mse1 + primer (ML38, 5' CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT C 3'), 1 μ l MgCl₂, 0.5 μ l dNTPs 25mM, 0.5 μ l Taq Polimerasa, 2.5 μ l de buffer 10x s/MgCl₂ y 9.3 μ l de H₂O (ver Apéndice II). Para un volumen total de reacción de: 25 μ l. Las muestras fueron amplificadas durante 20 ciclos de: 94 °C - 2 min, 94 °C - 30 seg, 55 °C - 1 min, 72 °C - 1 min; posteriormente a 72 °C durante 5 minutos y a 4 °C α . Se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio a 110 volts durante 40 min. El producto de la reacción de PCR se diluyó 10 veces (1:10).

PCR - AFLP (amplificación selectiva). A 5 μ l de DNA preamplificado y diluido previamente (1:10) del paso anterior, se le agregaron 1 μ l de primer EcoR1- AFLP x γ^{32} P-ATP (previamente marcado con el radio isótopo γ^{32} P, ver Apéndice), 1 μ l primer Mse1-AFLPz no marcado, 0.5 μ l dNTPs 10 mM, 2 μ l buffer de PCR 10x s/MgCl₂, 0.5 μ l Taq polimerasa y 9.2 μ l de H₂O (ver Apéndice III). Para un volumen total de reacción de 20 μ l. Se utilizaron 24 combinaciones de pares de primers.

Cada reacción se amplificó bajo las siguientes condiciones de PCR: 11 ciclos a 94 °C - 4 min, 94 °C - 30 seg, 65 °C - 30 seg, -0.7 °C por ciclo partiendo del próximo ciclo, hasta llegar a 56 °C. Posteriormente 25 ciclos a 72 °C - 1 min, 94 °C - 30 seg, 56 °C - 30 seg, 72 °C - 1 min, 72 °C - 5 min y finalmente a 4 °C - α . Para visualizar los fragmentos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%, el cual se prepara un día anterior al uso del gel de la siguiente forma: se mezclan 60 ml de acrilamida al 5% para secuenciación prefiltrada (Apéndice III), 150 μ l de persulfato de amonio (10 mM) y 100 μ l de TEMED. Se limpian perfectamente 2 vidrios para secuenciación con etanol al 96%; los separadores se colocan en el vidrio más grande y encima de éstos se puso el otro vidrio. Se sujetaron ambos vidrios con los separadores con clips grandes. Se vació el gel tratando de que no quedaran burbujas; finalmente se colocó el peine en la parte superior y se dejó polimerizando una hora a temperatura ambiente y luego se colocó a 4 °C para que se siguiera polimerizando durante toda la noche.

Desnaturalización de la muestra y electroforesis. A cada muestra de DNA quimérico templado amplificado, se le agregaron 10 μ l de buffer de secuenciación (ver Apéndice III) y se colocó a 94 °C durante 5 min. Inmediatamente después, la muestra se pasó a hielo por 5 min para evitar la renaturalización del DNA. Una vez polimerizado el gel, se retiró el peine del gel y con agua se lavaron los residuos de poliacrilamida que quedaron fuera de los vidrios. El gel se precalentó en el secuenciador durante una hora a 3000 volts con el buffer TBE 0.5x (ver Apéndice III). Con una jeringa se retiraron los restos de urea depositados en los pozos del gel, finalmente se cargó el gel con 8 μ l de cada muestra de DNA. La electroforesis se realizó a 3000 volts durante 2 h.

Obtención de imágenes. El gel fue transferido a papel Wattman 3MM y se cubrió con plástico autoadherente; se colocó en el secador al vacío durante 90 min a 85 °C. Posteriormente, el gel seco fue expuesto a una radiografía durante toda la noche dentro de

un cassette para revelar. La radiografía fue revelada y escaneada a mayor resolución para así poder visualizar las bandas generadas por los AFLPs.

Análisis de datos moleculares. Todos los análisis se realizaron con el programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000). Cada fragmento de DNA (marcador molecular) producto del AFLP, fue tratado como una unidad de carácter y registrado usando un código binario (1/0= presencia /ausencia). Únicamente se tomaron en cuenta aquellas bandas que estuvieron claramente definidas en todos los individuos o donde se observaron claramente una ausencia de éstas. Por lo que para el análisis estadístico solamente se tomaron en cuenta 16 combinaciones de pares de primers.

Para el análisis fenético se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard. El fenograma se construyó con el método de agrupamiento de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic means*) (Sokal y Michener, 1979), por presentar el valor más alto del coeficiente de correlación cofenético.

También se hizo un análisis de componentes principales (PCOORD) utilizándose la misma matriz que en el análisis anterior y usando el mismo coeficiente de similitud. El PCOORD se hizo por columnas para obtener la representación gráfica de los OTUs en un espacio multidimensional de caracteres y por hileras para determinar los caracteres que más contribuyen con los agrupamientos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En muchas familias de plantas con flores el estudio de la hibridación es fundamental para comprender la naturaleza de las diferencias entre especies, así como los mecanismos que originan el aislamiento reproductivo. Asimismo, los notables patrones de variación geográfica que pueden encontrarse en las zonas de hibridación han despertado el interés acerca de los procesos genéticos y ecológicos que ocurren en tales zonas (Rieseberg y Ellstrand, 1993; Rieseberg, 1995). Esto podría estar pasando en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, debido a que se han encontrado en simpatria a *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, lo que hace posible que éstas puedan hibridizar o que hayan hibridado con anterioridad, aunque en la actualidad las poblaciones conocidas de *P. esseriana* y *P. jaumavensis* están aisladas de los supuestos parentales; pero en las cercanías del Huizache, San Luis Potosí, en los cerros aledaños al Parador Nuñez, se encontraron algunos individuos de *P. esseriana* donde habita *P. debbertiana*, el otro posible parental, lo que permitiría la introgresión (Zamudio, 2001).

6.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Debido a la similitud en los caracteres morfológicos observados durante esta investigación en *Pinguicula esseriana*, *P. jaumavensis*, *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, éstos se describen en general para las cuatro especies y se hace alguna mención especial cuando alguna de ellas presenta alguna diferencia.

6.1.1 Morfología floral

En este trabajo se pudo observar un gran polimorfismo floral, principalmente en *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, lo que puede ser interpretado como el resultado de generaciones híbridas avanzadas (más allá de la F2), o bien al efecto de retrocruza con los parentales. Sin embargo en la población de *P. esseriana*, localizada en el parador Tepozán, se observaron variantes muy marcadas, como flores que presentan lóbulos ovobado- cuneados, oblongos y oblatos. Mientas 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*.

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

Pinguicula debbertiana. La flor mide entre 25 mm y 40 mm (incluyendo el espolón). La corola está dividida en cinco lóbulos 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. 2A-B). La garganta es amarilla blanquecina, pilosa. El espolón de igual longitud o ligeramente más

grande que el tubo de la corola (Fig. 2C), es de color verde y presenta una nervadura morada.

Pinguicula ehlersiae. Flor bilabiada, de 30 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón), dividida en cinco lóbulos obovados (Fig. 3A-E), oblongos (Fig. 3 F) y oblatos (Fig. 3G), de color morado-purpúreo; carece de paladar. La garganta es de color verde y presenta escasos tricomas. Con un espolón más largo que el tubo de la corola y curvo o ligeramente recto de color verdoso con una nervadura púrpura (Fig. 3H).

En esta especie se presenta una gran variación en la forma, posición y tamaño de los lóbulos de la corola en individuos de una misma población (Fig. 3). La posición de los lóbulos del labio superior de la corola pueden estar juntos (Fig. 3 A y F) o sobrelapados (Fig. 3 B, C, D, E y G). Los lóbulos laterales de labio inferior pueden ser de igual tamaño que el lóbulo central (Fig. 3 A, B y E) o ser de menor tamaño (Fig. 3 C y F); estos también pueden estar girados hacia la parte posterior de la corola (Fig. 3 B; C y F). 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).

Pinguicula esseriana (híbrido natural de Querétaro). Las flores miden entre los 23 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón); la corola es bilabiada, de color rosa a violáceo-purpúrea. Los lóbulos son obovado-cuneados, hasta obovado oblongos. La garganta es blanca y densamente pilosa, paladar amarillo-verdoso o café con dos pequeñas protuberancias cubiertas densamente con tricomas. Esta especie presenta mayor variación en la longitud de las flores y en la forma de los lóbulos de la corola ya que se observan dos variantes de lóbulos obovados (Fig. 4 A - B), oblongos (Fig. 4 C - F) y dos oblatos (Fig. 4 G - H). 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. 4 I).

Pinguicula jaumavensis. Las flores miden de 23 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón); la corola es bilabiada de color rosa a violáceo-purpúreo. Los lóbulos son obovado-cuneados, hasta obovados a oblongos. La garganta es blanca y densamente pilosa, paladar amarillo-verdoso (carácter con gran variación en los individuos de una misma población, Fig. 5) con dos pequeñas protuberancias cubiertas densamente con tricomas. Presenta una venación muy marcada a nivel de la garganta. Al igual que *P. esseriana*, *P. jaumavensis* presenta gran variación en la longitud de las flores (Fig. 5), y en la forma de los lóbulos de la corola originando un amplio polimorfismo, ya que se observan siete variantes de lóbulos obovado-cuneados (Fig. 5 A - D, J y K) y seis variantes obovadas (Fig. 5 F - I, L y M). Los lóbulos de la corola pueden encontrarse sobrelapados (Fig. 5 M), juntos (Fig. 5; A - C) o divergentes (Fig. 5; E, H y I), ya sea en uno o ambos labios. Se encontró una flor que guarda gran similitud a nivel de morfología floral con *P. debbertiana* (Fig. 5 N). El espolón es más largo que el tubo de la corola, poco incurvado, ligeramente morado con venas morado-violáceas (Fig. 5 Ñ).

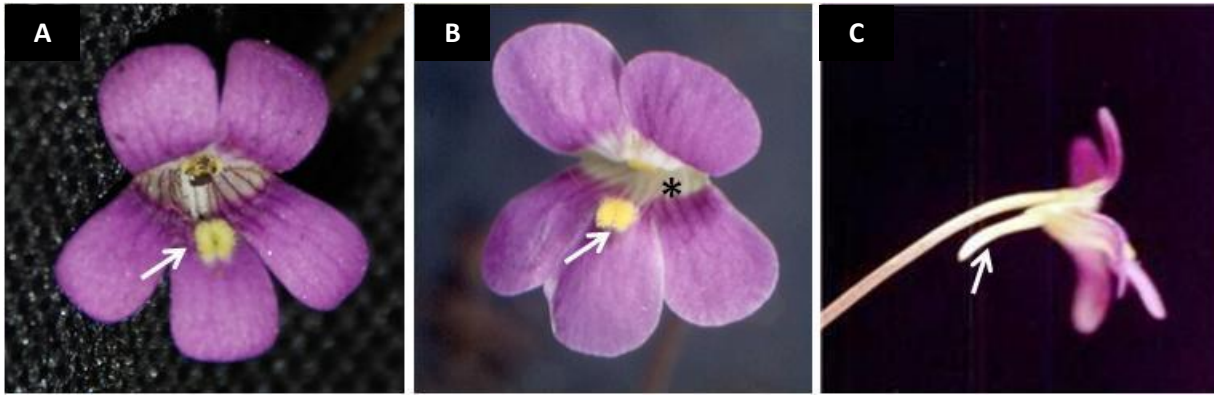


Figura 2. Flores de *Pinguicula debbertiana* (especie parental). **A.** Vista frontal. La corola bilabiada con cinco lóbulos obovados de color violáceo- púrpúreo y un paladar de color amarillo con dos protuberancias (flecha). **B.** Vista semi-lateral mostrando el paladar (flecha), venación muy marcada de color púrpura (asterisco). Flor con venación discreta de color rosa (asterisco). **C.** Vista lateral mostrando el nectario en forma de espolón corto (flecha).

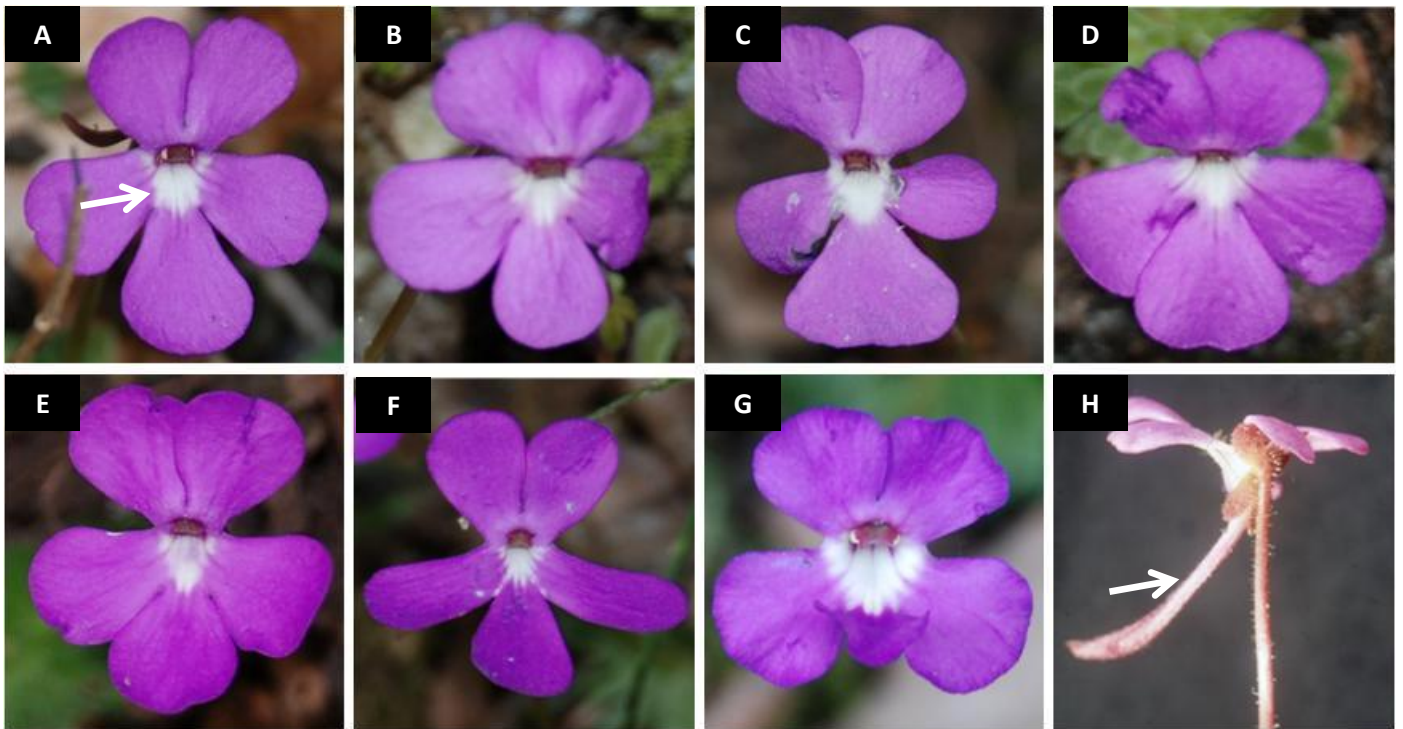


Figura 3. Polimorfismo floral en *Pinguicula ehlersiae* (especie parental). Corola bilabiada con cinco lóbulos obovados de color morado- púrpúreo y sin paladar. **A.** Variante floral más común en la población. Los lóbulos del labio superior de la corola son del mismo tamaño y están juntos, carencia de paladar (flecha). **B.** Flor con lóbulos superiores sobrepuestos y los lóbulos laterales ligeramente girados hacia la parte posterior de la corola. **C.** Corola con lóbulos superiores sobrepuestos, los lóbulos laterales ligeramente girados y de menor tamaño que el lóbulo central. **D.** Flor con lóbulos superiores sobrepuestos. **E.** Corola con los lóbulos superiores sobrepuestos y lóbulos inferiores del mismo tamaño. **F.** Flor con lóbulos oblongos, los lóbulos superiores están juntos y los laterales ligeramente girados hacia la parte posterior de la corola. **G.** Flor con lóbulos oblatos, los lóbulos superiores se encuentran sobrepuestos. **H.** Vista lateral que muestra el nectario en forma de espolón largo (flecha).

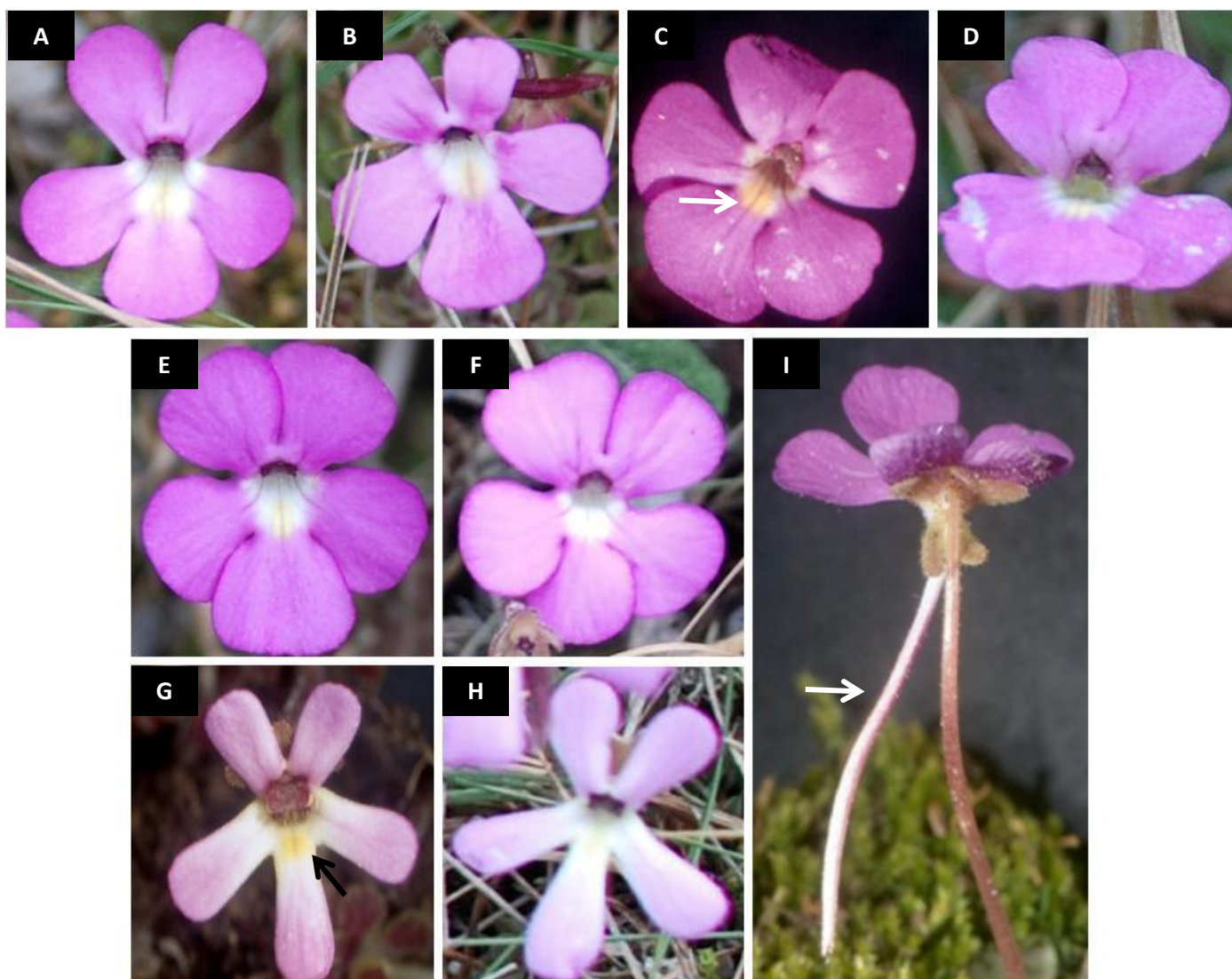


Figura 4. Variación floral en *P. esseriana*. Corola bilabiada, compuesta de cinco lóbulos generalmente obovados y paladar de color amarillo. **Lóbulos obovados:** **A.** los lóbulos superiores son ligeramente más angostos que los inferiores. **B.** Los lóbulos laterales son de diferente tamaño al lóbulo central. **Lóbulos oblongos, con lóbulos superiores sobrepuestos:** **C.** Corola con lóbulos del mismo tamaño, paladar (flecha). **D.** Flor con menor ángulo de divergencia con respecto a las otras flores. **E.** Flor con lóbulos del mismo tamaño. **F.** Corola con lóbulos inferiores sobrepuestos. **Variantes con lóbulos oblatos:** **G.** Flor con lóbulos oblongos y un paladar con dos protuberancias muy marcadas de color amarillo. **H.** Flor de color rosa pálido, de menor tamaño y con un paladar poco marcado. **I.** Vista lateral mostrando el largo espolón (flecha).

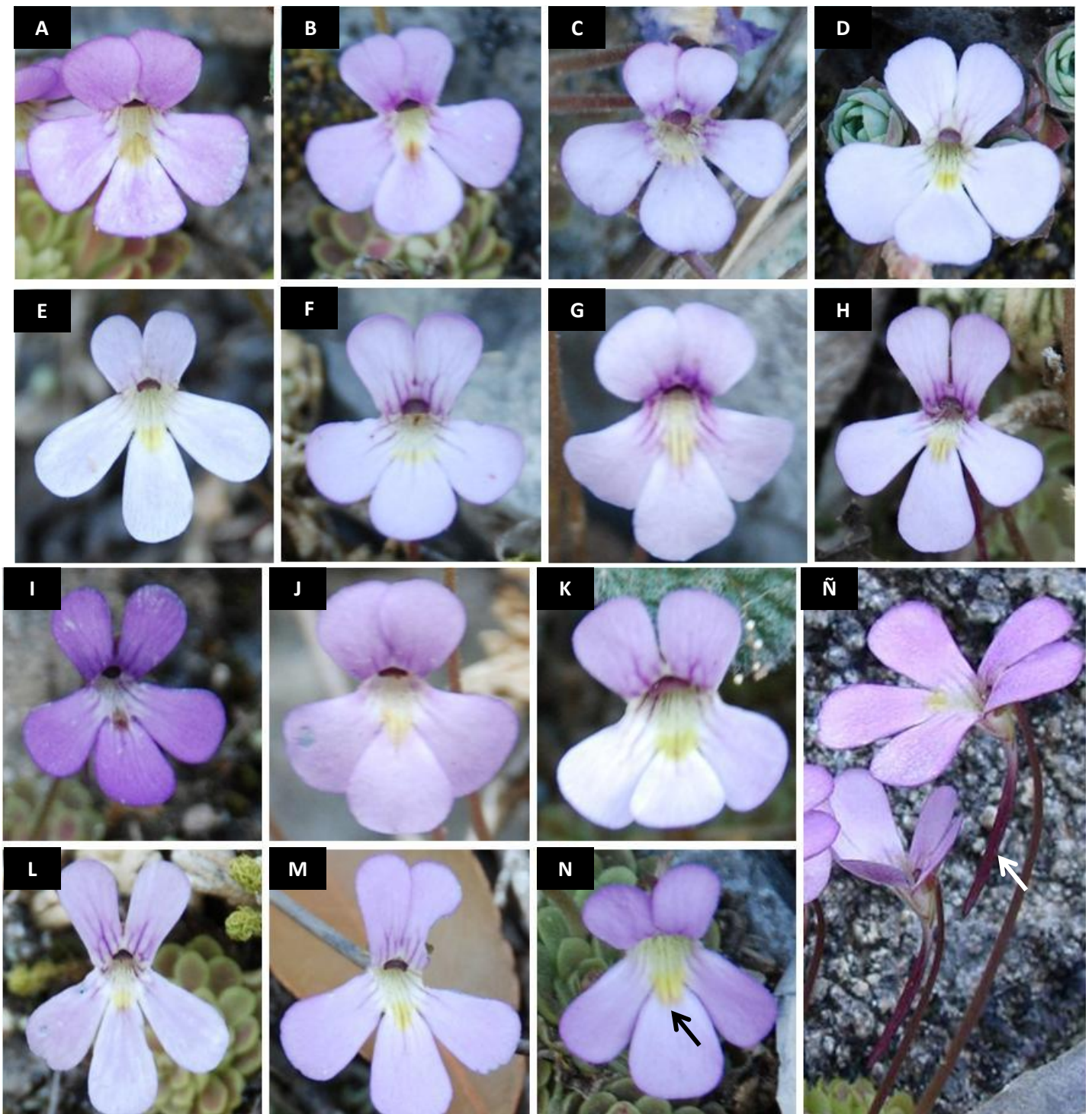


Figura 5. Polimorfismo floral en *Pinguicula jaumavensis*. Flores bilabiadas, conformadas por cinco lóbulos de color rosa a violáceo- púrpúreo. Paladar amarillo - verdoso con dos pequeñas protuberancias cubiertas con tricomas (flecha). **A, B, C y D.** Variantes de lóbulos obovado- cuneados, el labio inferior es más ancho que el superior. **E.** Flor con lóbulos obovados, el labio inferior es más ancho que el superior y los lóbulos inferiores divergen. **F.** Flor con lóbulos obovados, los superiores son ligeramente más grandes que los inferiores. **G.** Flor con lóbulos obovados, los lóbulos laterales se encuentran girados hacia la parte posterior de la corola. **H y I.** Flores con lóbulos obovados y divergentes (H. con venación marcada y paladar amarillo, I. con venación ligeramente marcada con respecto a I, pero con paladar de color café). **J.** Flor con lóbulos obovado- cuneados. **K.** Corola con lóbulos ampliamente obovado- cuneados. **L.** Lóbulos obovados y con venación muy marcada en el labio superior de la corola. **M.** Flor con lóbulos obovados, los del labio superior están sobrepuestos, mientras que los inferiores divergen. **N.** Flor con características muy similares a las de *P. debbertiana*, paladar amarillo (flecha). **Ñ.** Vista lateral, mostrando el espolón.

6.1.2 Morfología atípica en las posibles especies híbridas

En este trabajo se observaron diferencias muy marcadas entre las flores de *P. esseriana* pertenecientes a una forma específica de lóbulos, como anteriormente se había descrito, ya que algunas flores presentan una pequeña bifurcación localizada en el perímetro de los lóbulos (Fig. 6, A y B), otra presenta venación en cada uno de sus lóbulos (Fig. 6 C) y por último, flor cuyos lóbulos no se encuentran totalmente definidos, por lo que no se aprecia el número real de lóbulos que conforman la corola (Fig. 6 D). En *Pinguicula jaumavensis* se observó la presencia de una corola con tres lóbulos en vez de cinco (Fig. 6 E). En *Pinguicula ehlersiae* se presentaron ocasionalmente flores que surgen de un mismo pedúnculo, carácter no reportado con anterioridad para ninguno de los taxa (Fig. 6 F). Anteriormente han sido reportadas variantes morfológicas, clasificadas como anomalías, en flores de híbridos artificiales interespecíficos de *Pinguicula*, o variedades, o especies de este género, por lo que este evento es más frecuente. Estas variantes van desde aquellas flores 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"*). (www.pinguicula.rg). Es importante resaltar que tanto *P. ehlersiae* como *P. esseriana*, presentan mayor frecuencia en casos de variantes morfológicas, lo que sugiere una inestabilidad genética.

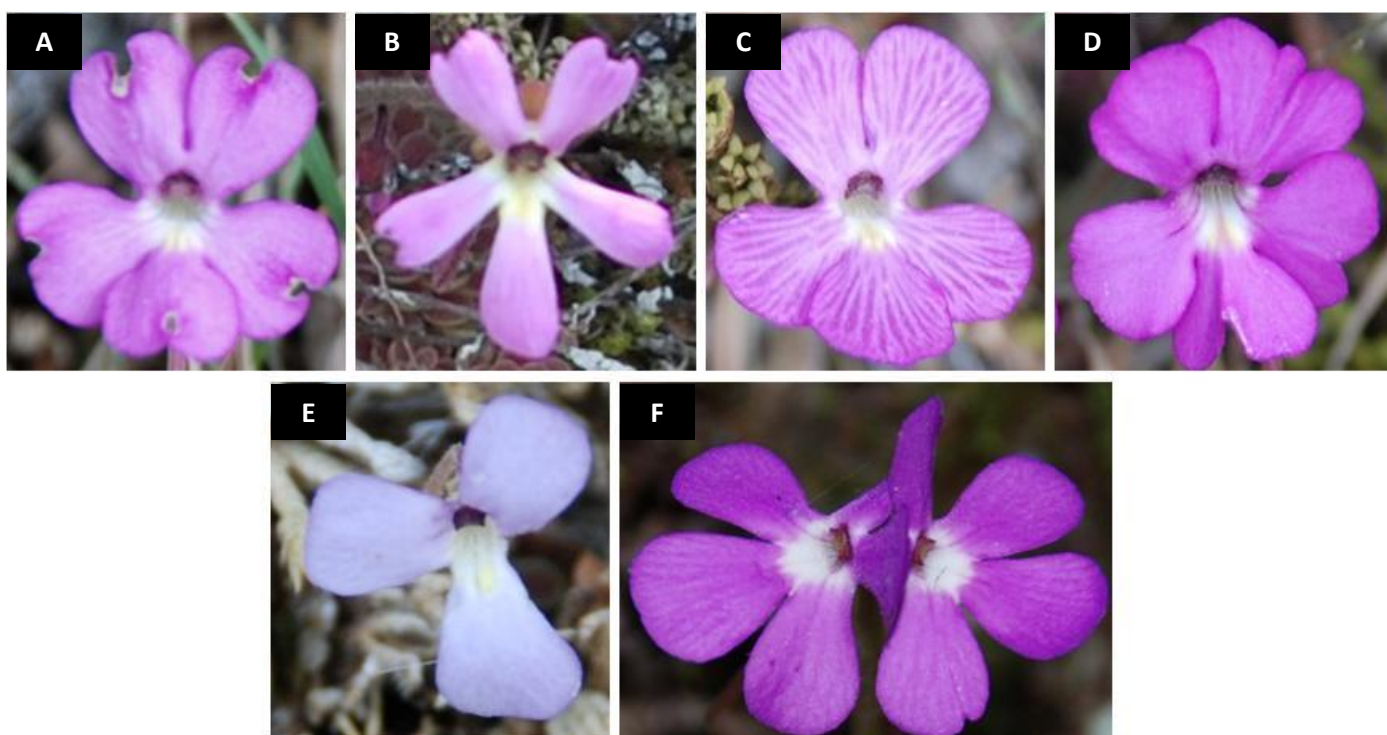


Figura 6. Morfología floral atípica. A. *Pinguicula esseriana*. A y B. Flores con una pequeña bifurcación en el perímetro de los lóbulos. C. Flor con venación en cada uno de los lóbulos D. flor cuyos lóbulos no se encuentran totalmente definidos por lo que no se aprecia el número real de lóbulos que conforman la corola E. *Pinguicula jaumavensis*, Flor con tres lóbulos F. *Pinguicula ehlersiae*, flores que surgen de un mismo pedúnculo.

6.1.3 Paladar

Esta estructura, ubicada en la base del lóbulo medio del labio inferior de la corola, en algunas especies presenta un indumento cubierto por tricomas glandulares multicelulares. En *P. debbertiana*, uno de los parentales, el paladar es de color amarillo y consiste de dos protuberancias evidentes de forma ovalada (Fig. 7A), cubiertas por tricomas multicelulares uniseriados de forma globosa, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos (Fig. 7 B-C). Como anteriormente se había mencionado, *P. ehlersiae*, la otra especie parental carece de paladar y de tricomas en esta zona (Fig. 7 D-E).

Dado que las dos especies híbridas *P. esseriana* (Fig. 7 F-H) y *P. jaumavensis* (Fig. 7 I-K) los tricomas que conforman el paladar, esto hace suponer el cual suponemos que fue heredado del progenitor *P. debbertiana*, son características que evidencian la cercanía entre *P. debbertiana*, *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, y apoyan la posibilidad del origen híbrido de esta última, lo cual ya había sido reportado por Zamudio (2001 y 2005).

Los tricomas se distribuyen en dos protuberancias poco marcadas (en algunas flores sólo se aprecia una protuberancia), de color amarillo-verdoso o café-verdoso; son escasos, 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. 7 F-K). 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*.

6.1.4 Polen

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

Pinguicula debbertiana tiene granos de polen prolados y hexacolporados, casi esféricos (Fig. 8A-B); con ornamentación de exina tectada y perforada (Fig. 8C); mientras que *P. ehlersiae*, tiene granos de polen prolados y de forma suboblata, hexagonal y penta a hexacolporados (Fig. 8D-E), con exina que varía de tectada perforada en la zona ecuatorial a escasamente tectada perforada en la zona polar (Fig. 8F).

En el caso de las especies híbridas, los granos de polen son pentagonales y pueden ser de penta a hexacolporados (Fig. 8G-H en *P. esseriana* y Fig. 8J-K en *P. jaumavensis*), con exina tectada perforada (Fig. 8I en *P. esseriana* y Fig. 8L en *P. jaumavensis*). Las muestras de granos de polen de ambos híbridos observados revelan la presencia de granos amorfos (posiblemente no viables), los cuales comprenden casi el 40% de los observados mediante microscopía electrónica de barrido.

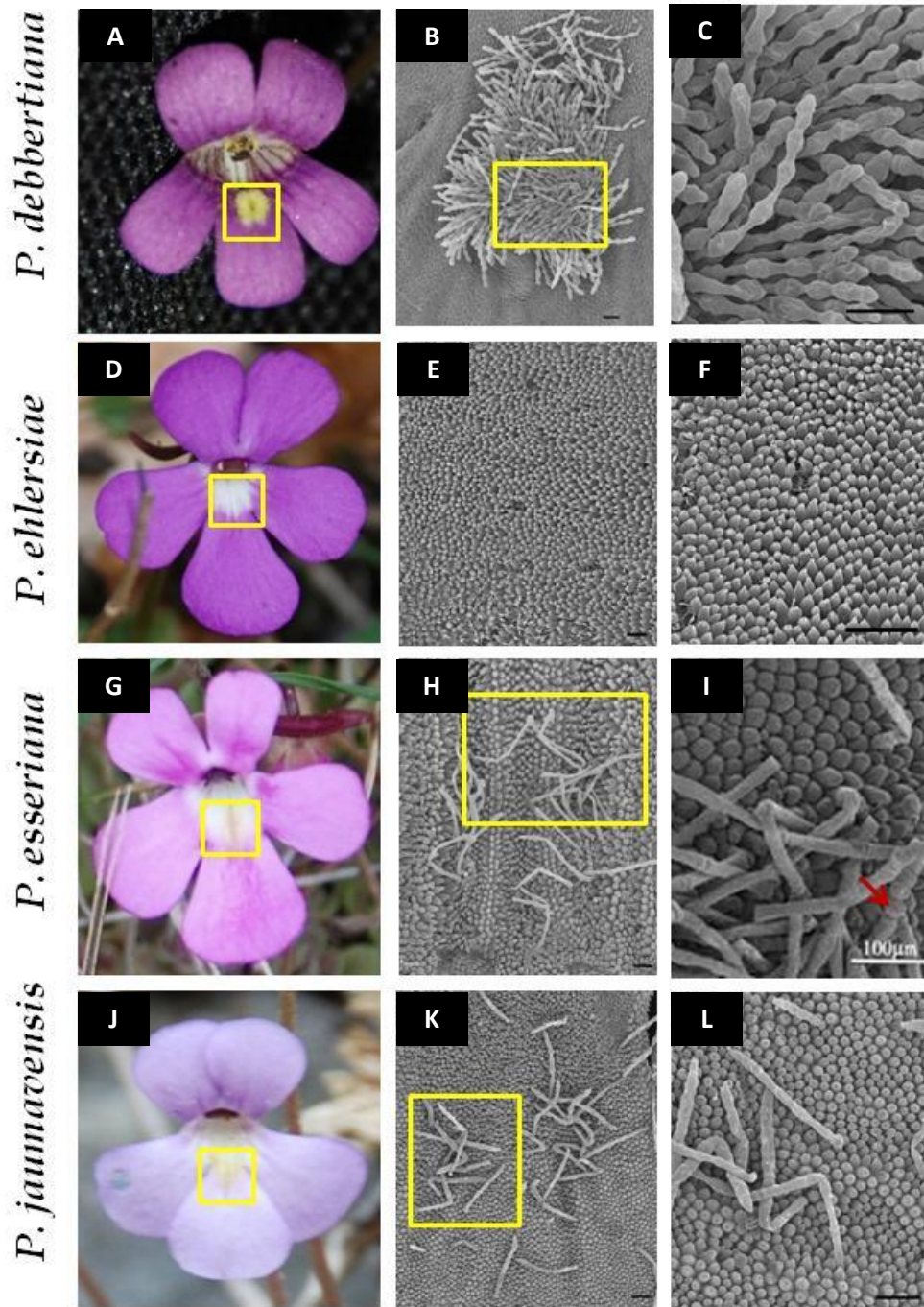


Figura 7. Área del paladar de los cuatro taxa visto al MEB. A-C. *Pinguicula debbertiana*. A. En el recuadro se muestra el paladar con dos protuberancias evidentes y de forma ovalada. B. Paladar cubierto por tricomas multicelulares ampliamente distribuidos. C. En el acercamiento se aprecian los tricomas multicelulares uniseriados de forma globosa. **D-F. *Pinguicula ehlersiae*.** D. Se muestra el área del paladar sin tricomas ni protuberancias. E-F. Acercamiento a la zona del paladar carente de tricomas. **G-I. *Pinguicula esseriana*.** G. Se observa una protuberancia poco marcada, cubierta con tricomas multicelulares largos. H-I. Acercamientos de los tricomas multicelulares uniseriados, de forma cilíndrica en la base y globosa en la zona apical (como los vistos en *P. debbertiana*, flecha). **J-L. *Pinguicula jaumavensis*.** Se observa el área del paladar con una ligera protuberancia que muestra tricomas uniseriados y multicelulares, de forma cilíndrica, excepto en la parte apical que es globosa. B, C, E, F, H, I, K y L; escala= 100µm.

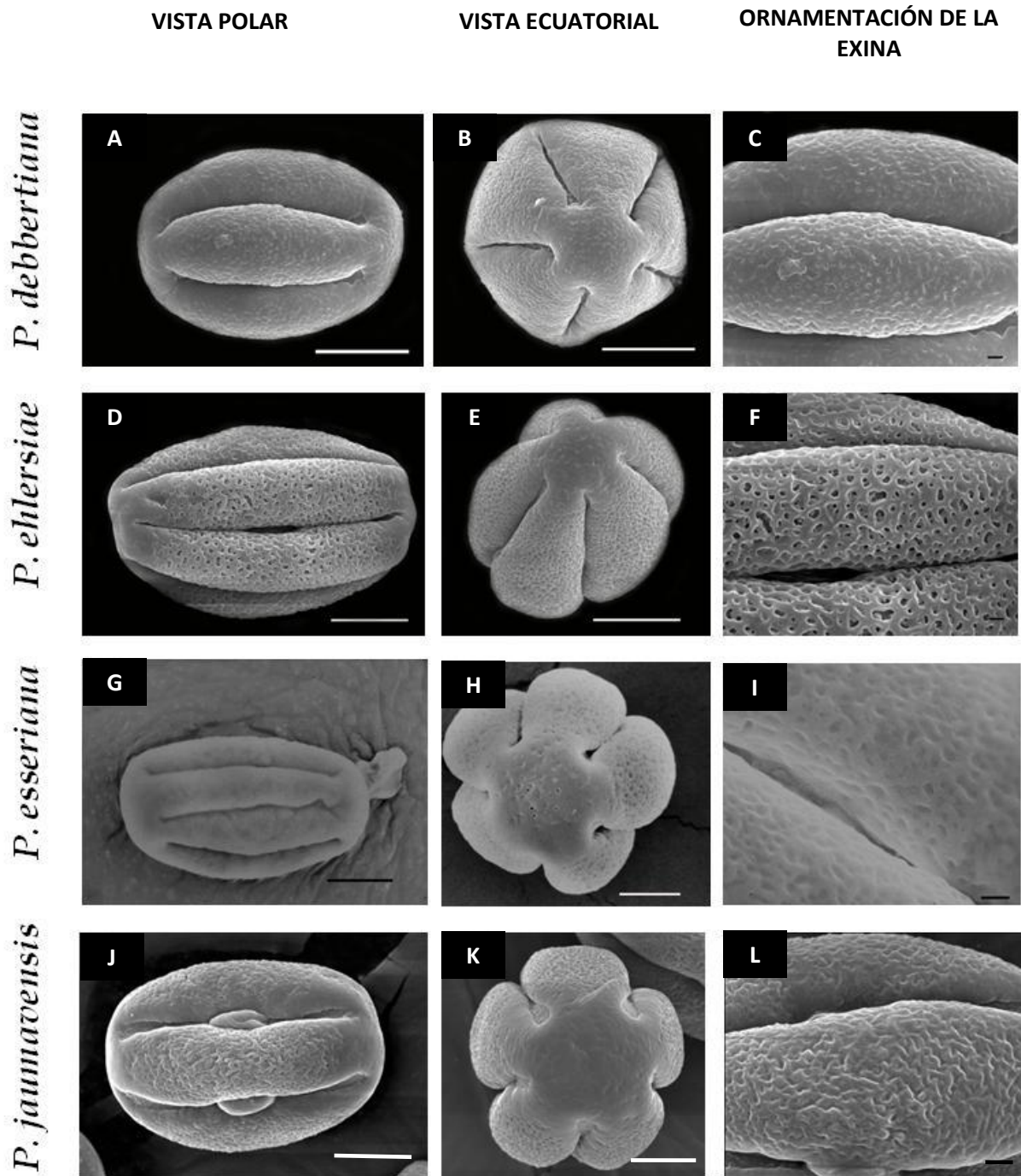


Figura 8. Micromorfología del grano de polen de los cuatro taxa. A-C. *P. debbertiana*. Los granos de polen son prolados, hexacolporados y de forma esférica. La ornamentación de la exina es tectada y perforada. D-F. *P. ehlersiae*. Los granos de polen prolados y de forma suboblata, con una vista polar hexagonal y penta a hexacolporados. La exina en el mismo grano de polen varía de tectada perforada en la zona ecuatorial a escasamente tectada perforada en la zona polar. G-I. *P. esseriana*. La vista polar el grano de polen es pentagonal, con exina tectada perforada y pueden ser penta a hexacolporado. Las muestras de granos de polen observados revelan la presencia de granos amorfos. J-L. *P. jaumavensis* tiene granos de polen prolados, pentacolporados y de forma suboblata, la exina es escasamente tectada perforada. A, D, G y J, escala= 10 μ m ; B, E, H y K, escala=10 μ m ; C, F, I y L, escala=1 μ m .

6.1.5 Semillas

Se observó una gran cantidad de semillas abortivas en las especies híbridas *P. jaumavensis* y *P. esseriana*, las cuales son de menor tamaño que las normales y presentan malformaciones, en su forma y en la constitución de la cutícula. Estas características fueron observadas en semillas colectadas en el 2008 y 2010, y hacen suponer que la reproducción sexual no es del todo exitosa, pero se da.

En *P. debbertiana* (Fig. 9A-B) miden en promedio de 1 a 1.4 mm de largo por 0.3 a 0.4 mm de ancho mientras que las semillas de *P. ehlersiae*, las semillas maduras miden en promedio 0.5 a 1 mm de largo por 0.3 mm de ancho (Fig. 9C-D). En ambas especies las semillas son cilíndricas, fuertemente delgadas hacia la zona micropilar. Las semillas son de color café. La superficie de la cubierta seminal o testa es reticulada y está formada por hileras longitudinales de células ovaladas que tienen paredes anticlinales uniformemente engrosadas con cimas, las cuales marcan los límites celulares. Las paredes periclinales externas están ligeramente hundidas y la cutícula es lisa (Fig. 9B, D).

En *P. esseriana* (híbrido), las semillas maduras miden en promedio 0.19 - 0.7 mm de largo por 0.03 - 0.2 mm de ancho, siendo las semillas viables las que se encuentran entre 0.5 - 0.7 mm por 0.14 - 0.2 mm. En ambos casos, las semillas son de forma cilíndrica adelgazándose fuertemente hacia la zona micropilar, son de color café. La testa es reticulada y presenta células ovaladas con paredes anticlinales fuertemente engrosadas (semillas viables) o ligeramente engrosadas (semillas no viables) ambas presentan una cima. Las paredes periclinales externas son lisas y están ligeramente hundidas, la cutícula es lisa (Fig. 9E-F). Las semillas de *P. jaumavensis* miden en promedio de 0.9 a 1.3 mm de largo por 0.3 a 0.4 mm de ancho, fuertemente adelgazadas hacia la zona micropilar. La cubierta seminal es muy similar a la presente en las semillas normales de *P. esseriana*, es reticulada y presenta células ovaladas con paredes anticlinales uniformemente engrosadas con cimas (Fig. 9G-H).

La producción natural de frutos y semillas en *P. esseriana* y *P. jaumavensis* (híbridos), es muy baja; se desconoce la causa de este hecho, pero una posible explicación podría ser la degeneración del cigoto y endospermo, tal y como se observó en estudios realizados por Castillo (2007) en *P. esseriana*, en donde se observó la entrada de los tubos polínicos al micrópilo y la absorción de algunos tejidos que impedían el desarrollo normal de estas semillas. 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 formación de tejidos nutritivos se interrumpen en etapa de cigoto (Grant, 1981), como en *U. vulgaris* var *americana* y *U. flexuosa* (Khan, 1963; Farooq y Siddiqui, 1965; Jones, 1988).

PROGENITORES

HÍBRIDOS NATURALES

P. debbertiana

P. ehlersiae

P. esseriana

P. jaumavensis

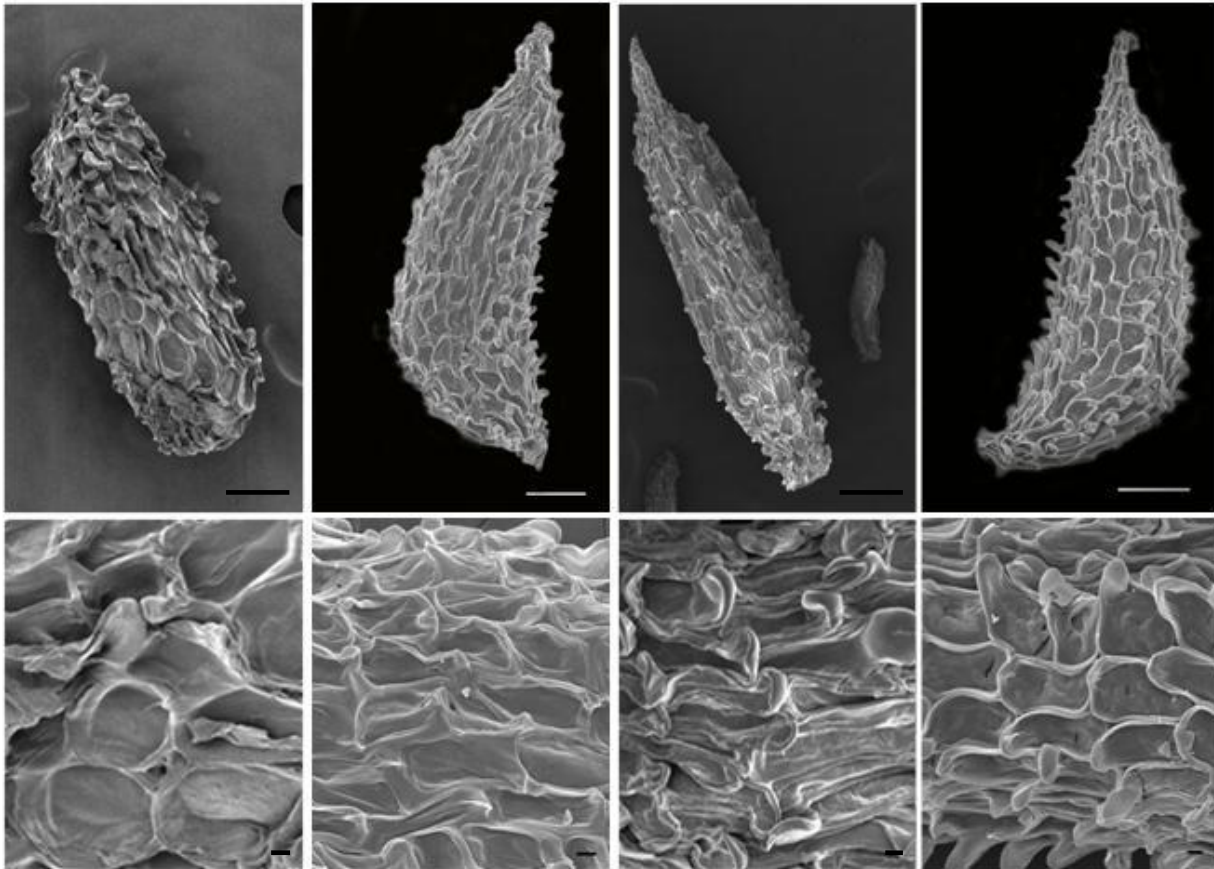


Figura 9. Morfología de semillas vistas al MEB. **A-B.** *Pinguicula debbertiana*. Semilla viable, cilíndrica, delgada hacia la zona micropilar. Cubierta seminal reticulada y formada por hileras longitudinales de células ovaladas con paredes anticlinales uniformemente engrosadas, con papilas o verrugas; las paredes periclinales externas tienen cutículas lisas y están ligeramente hundidas. **C-D.** *P. ehlersiae*. Semilla viable de forma cilíndrica, más delgada hacia la zona micropilar. 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. **E-F.** *P. esseriana*. Semilla viable, cilíndrica, ligeramente adelgazada en la zona calazal y fuertemente delgada hacia la región micropilar. Cubierta seminal reticulada, presenta células ovaladas con paredes anticlinales engrosadas, con verrugas. Las paredes periclinales están ligeramente hundidas y tiene una cutícula lisa. **G-H.** *P. jaumavensis*. Semilla fuertemente adelgazada hacia la zona micropilar. La cubierta seminal es muy similar a la presente en las semillas normales de *P. esseriana*, es reticulada y presenta células ovaladas con paredes anticlinales uniformemente engrosadas con cimas. **A, C, E y G,** escala= 100µm; **B, D, F y H,** escala= 10µm.

6.2 Conteo y viabilidad de los granos de polen

Para conocer la viabilidad de los granos de polen de los cuatro taxa involucrados, éstos fueron sometidos a la tinción de Alexander (1980) y se identificaron tres tipos diferentes de polen, los que son teñidos de rosa (viables) y dos tipos de polen no viable, uno presenta un tamaño similar a los viables, mientras que el otro es relativamente más pequeño, ambos carecen de citoplasma (Fig. 10).

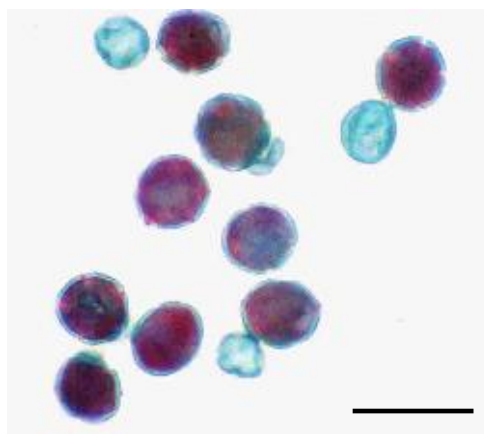


Figura 10. Tinción Alexander. Viabilidad de granos de polen en *P. jaumavensis*. Los granos de polen en verde sólo presentan exina y carecen de citoplasma. Los granos de polen en rosa y verde son granos de polen vivos. Escala= 300µm.

Con base en el conteo de los granos de polen se hizo un análisis de varianza para determinar el significado de estos datos (Tabla 3 y Fig. 11). Se esperaría que el menor porcentaje de viabilidad correspondiera a los taxa híbridos, y efectivamente *P. esseriana* que es uno de los posibles híbridos presentó el menor porcentaje (73%), pero el segundo supuesto híbrido *P. jaumavensis* presentó un porcentaje relativamente mayor que el esperado para un híbrido (90%), incluso más alto que uno de sus supuestos progenitores, *P. ehlersiae* (84%) y *P. debbertiana* (79%), (Tabla. 3). Mediante este análisis se observó que los datos presentan diferencias significativas para cada especie.

A diferencia de *Pinguicula debbertiana* y *P. ehlersiae*, las especies híbridas *P. esseriana* y *P. jaumavensis* 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. Asimismo, al realizar el conteo de los granos de polen para cada especie, *P. esseriana* y *P. jaumavensis* presentan menor número de granos de polen que el resto de las especies. 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 redundaría en una baja capacidad de reproducción sexual. Estas características apoyan la hipótesis de Zamudio (2001), al proponer el posible origen híbrido de *P. esseriana* y *P. jaumavensis*.

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 pero se requieren mayores evidencias.

Tabla 3. Análisis de varianza del porcentaje de viabilidad de granos de polen para los diferentes taxas. (F.V.= fuente de variación: S.C.= suma de cuadrados: G.L.= grados de libertad: C.M.= cuadrados medios).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	
Especies	0.07842	3	0.02614	P<0.0001
Residual	0.02849	15	0.001900	
Total	0.1069	18		

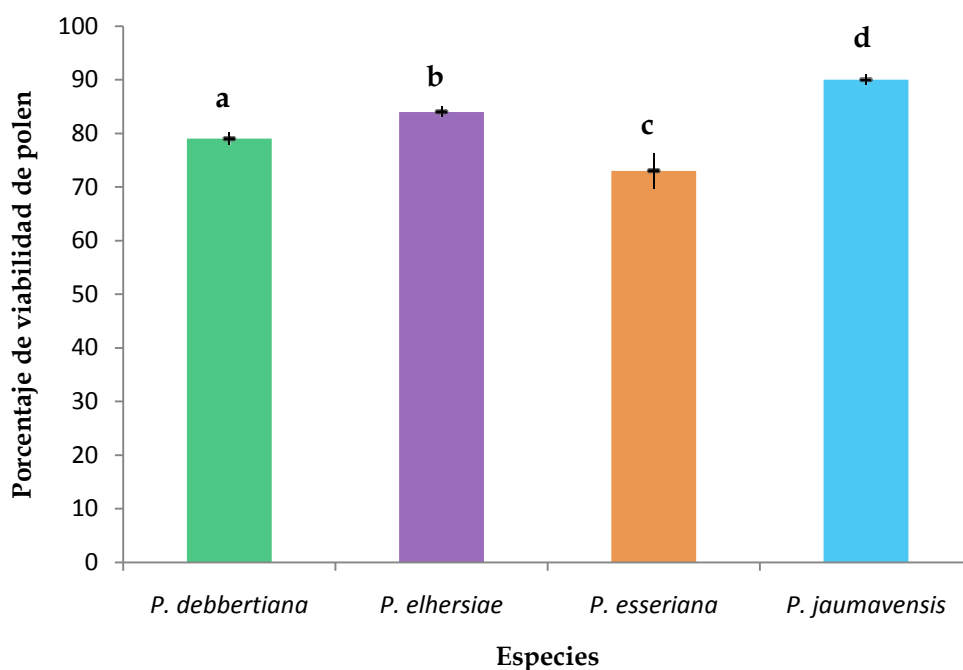


Figura 11. Porcentaje de viabilidad de granos de polen en los cuatro taxa estudiados, incluyendo los datos del análisis estadístico para cada cruz. Las letras a, b, c y d, implican diferencias significativas, después de una prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey, $\alpha= 0.05$.

Polinización y fecundación

Aún no se conoce con certeza el tipo de polinizadores de *P. debbertiana*, *P. ehlersiae*, *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, 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. Además, la forma del espolón, el cual se considera como el nectario estaría relacionado precisamente con polinización por mariposas.

Pinguicula debbertiana, *P. ehlersiae*, *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, 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; Castillo, 2007). Aunque esto puede ser producto de las malformaciones en el gineceo debido a su posible origen híbrido, por lo que no se descarta la ocurrencia de cleistogamia o autofecundación en antesis (geitonogamia), ya que en estudios previos se observaron granos de polen germinando en el interior de anteras tanto de botones florales como en anteras abiertas de flores en antesis (Castillo, 2007).

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; Castillo, 2007) 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*, ya que Kausik y Raju (1955), también observaron que las flores de *Utricularia* que se autopolinizan.

6.3 Pruebas de germinación de semillas

Se obtuvieron frutos resultantes de las siguientes cruza: *P. ehlersiae* x *P. ehlersiae*, *P. debbertiana* x *P. debbertiana*, *P. esseriana* x *P. esseriana*, *P. jaumavensis* x *P. jaumavensis*, *P. debbertiana* x *P. ehlersiae* y *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*, de polinizaciones naturales y artificiales de cada una de las especies, así como de la cruza de ambos progenitores. Las pruebas de germinación se realizaron de forma aleatoria, con cuatro replicas por cruza, de 25 semillas cada una. Para el caso de *P. esseriana* x *P. esseriana*, sólo se obtuvo un fruto de campo que contenía 70 semillas.

Las pruebas de germinación inicialmente se realizaron en cajas Petri estériles, usando como sustrato medio MS a un tercio de la concentración normal, tal y como lo hacen la mayoría de los horticultores que se dedican a la propagación de este tipo de plantas. Pero los resultados no fueron muy satisfactorios, ya que la mayoría de las cajas se infectaron de hongos y bacterias, por lo que preferimos hacer las pruebas de germinación usando como sustrato Peet Most estéril.

Las especies que presentaron mayor porcentaje de germinación son *P. ehlersiae* y *P. debbertiana*, especies progenitoras, seguida de la especie híbrida *P. jaumavensis* y finalmente *P. esseriana*. El porcentaje de germinación obtenido para las dos últimas especies muestra, ya que la producción de semillas es menor y el número de semillas abortivas es muy grande, lo que sugiere que estas especies no tienen una reproducción sexual prioritaria, como podría estar ocurriendo en las especies progenitoras como *P. debbertiana* y *P. ehlersiae* (Tabla 4, Fig. 12).

Tanto las plántulas correspondientes a la cruce artificial *Pinguicula debbertiana* x *Pinguicula ehlersiae* como a la de *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*, polinizaciones entre ambos progenitores, dan como resultado la formación de frutos que alcanzan la madurez y producen semillas viables.

La disposición de flores de ambos progenitores en antesis para cruzarlas manualmente es muy poca, pero a pesar de ello, se pudo comprobar que la hibridación puede ocurrir entre estas taxa y asimismo, se pudo dar seguimiento completo a la formación de semillas para la obtención de la generación F1. Los individuos obtenidos de esta cruce se encuentran en crecimiento vegetativo.

En estudios anteriores en pruebas realizadas con azul de anilina se observó la entrada de algunos tubos polínicos a los óvulos de *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, pero no se evaluó el porcentaje de óvulos fecundados; o bien si éstos abortan posterior a la formación del cigoto como ocurre en *U. coerulea* (Siddinqui y Farooq, 1965), pero no se descarta la posibilidad de que la baja producción de frutos y semillas en *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, podría deberse a la presencia de barreras reproductivas poscigóticas o incluso precigóticas, ya que la viabilidad de granos de polen es baja. Como ocurre en las zonas de hibridación en donde existe un reforzamiento de este tipo de barreras (principalmente precigóticas), (Howard, 1993).

Tabla 4. Análisis de varianza del porcentaje de germinación para las diferentes cruzas.
 (F.V.= fuente de variación; S.C.= suma de cuadrados; G.L.= grados de libertad;
 C.M.= cuadrados medios).

F. V.	S.C.	G.L.	C.M.	
Especies	0.2172	5	0.04344	P<0.0001
Residual	0.02488	13	0.001913	
Total	0.2421	18		

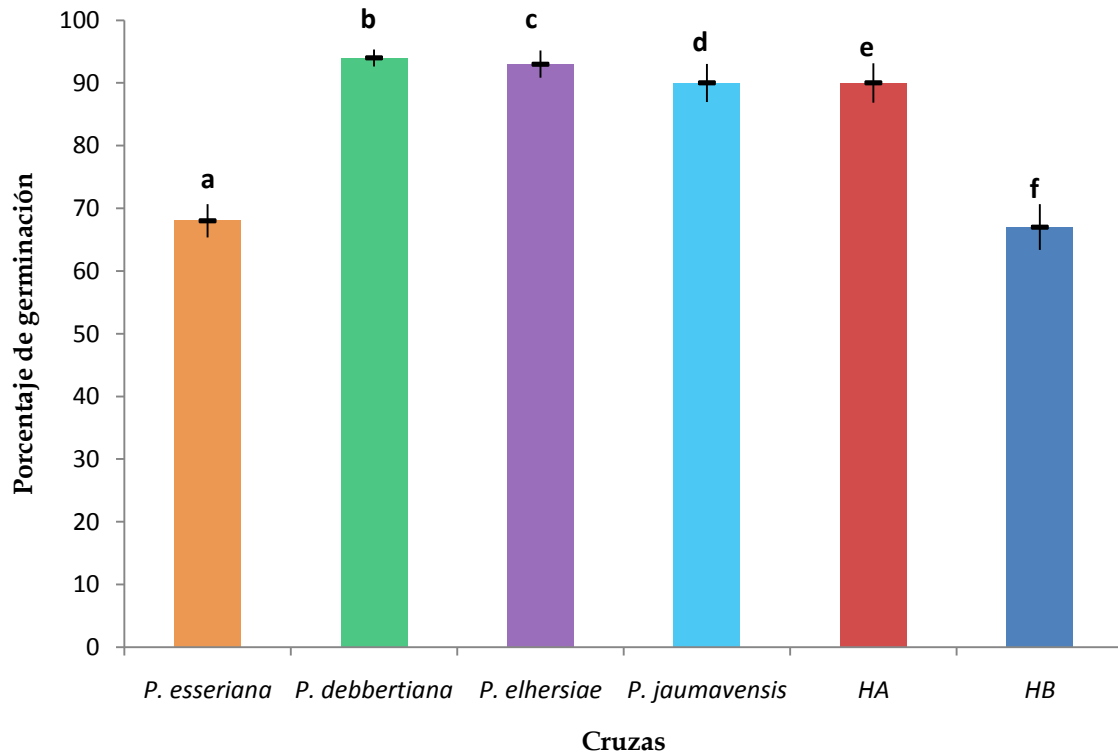


Figura 12. Representación de la germinación total para cada una de las cruzas, incluyendo los datos del análisis estadístico para cada crusa. . Las letras a, b, c, d, e y f, implican diferencias significativas. Letras diferentes implican diferencias significativas, después de una prueba de comparación múltiple de medias por el método de Tukey, $\alpha = 0.05$. (HA= *P. debbertiana* x *P. ehlersiae*; HB= *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*).

6.4 Características morfológicas de los híbridos artificiales

La crusa de *P. debbertiana* x *P. ehlersiae*, produjo 224 semillas híbridas (F1), pertenecientes a un sólo fruto. De las cuales se obtuvieron 48 plántulas. Estas fueron divididas en dos lotes y sometidas a diferentes condiciones ambientales. El primer lote se mantuvo bajo el cuidado de un horticultor que se dedica al cultivo de este tipo de plantas. Mientras que el segundo lote se mantuvo en condiciones ambientales normales.

Lote 1. De los 24 individuos híbridos, sólo sobreviven 11 y éstos presentan una roseta formada por 5 a 24 hojas de color verde. El ancho de éstas va de 0.2 a 0.5 cm, mientras que el largo es de 0.2 a 0.8 cm. El diámetro de estas rosetas es de 0.5 a 1.5 cm (Fig. 13A).

Lote 2. La sobrevivencia fue de 17 plántulas de 24. Las rosetas tienen un diámetro de 0.8 a 2 cm, cada una presenta de 10 a 20 hojas de color verde rosáceo de forma espatulada a ampliamente espatulada; con un ancho de 0.3 a 0.8 cm y un largo de 0.2 a 1cm (Fig. 13B).

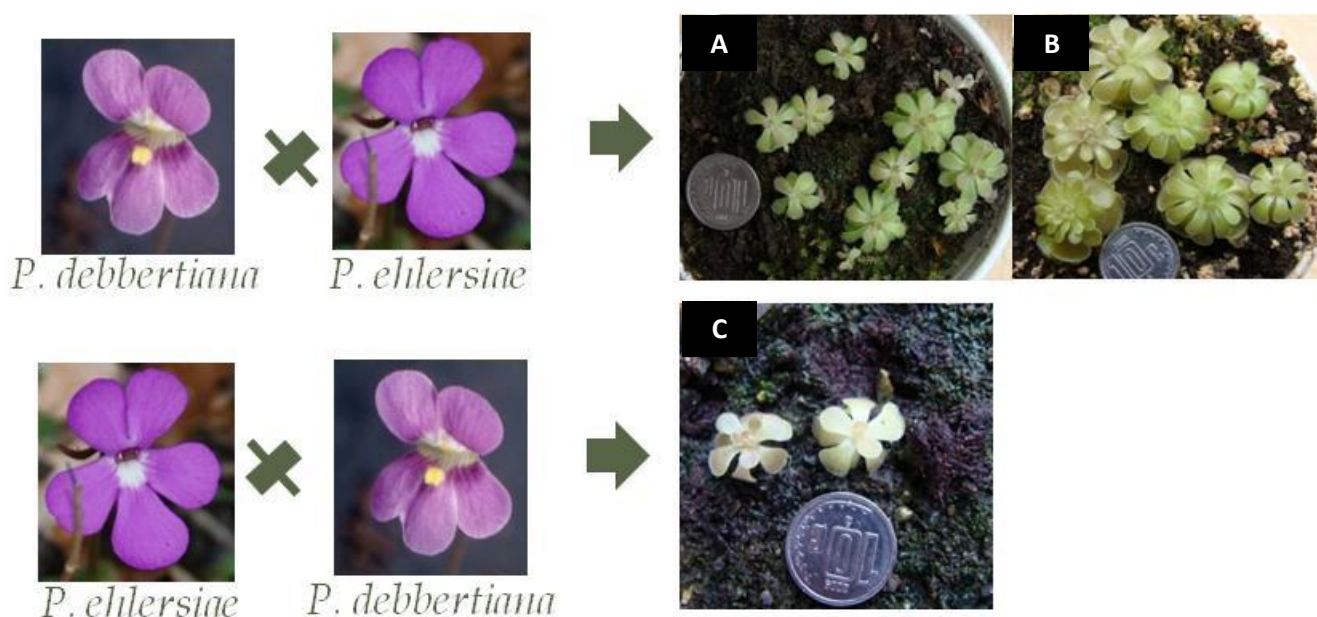


Figura 13. Plantas resultantes de la cruce de ambos progenitores (generación F1). A. *Pinguicula debbertiana* x *P. ehlersiae*, lote 1. **B.** *P. debbertiana* x *P. ehlersiae*, lote 2. **C.** *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*.

De 234 semillas obtenidas de la cruce de *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*, sólo 6 plántulas se lograron, lo que indica una baja viabilidad en estas semillas. Las rosetas son de color verde claro y presentan entre 5 u 8 hojas que van desde 0.2 a 0.6 cm de largo por 0.2 a 0.3 cm de ancho (Fig. 13 C).

La obtención de la generación F1 es un evento primordial para comparar la morfología floral de estos híbridos artificiales con los individuos de las poblaciones de los supuestos híbridos naturales. Lo anterior es para dar respuesta a la pregunta de si algunos de los morfos naturales son afines a los morfos del híbrido artificial. Estos individuos híbridos están en crecimiento para estudios posteriores.

6.5 Caracterización molecular

Recientemente, la utilización de caracteres moleculares ha servido de igual forma para inferir en géneros como *Paeonia* (Sang *et al.*, 1995), *Helianthus* (Rieseberg, 1991), *Gossypium* (Wendel *et al.*, 1991), entre otros, la existencia de especies o grupos de especies que posiblemente se originaron a partir de un ancestro híbrido, lo que se traduce en relaciones filogenéticas reticuladas, más que estrictamente divergentes.

Purificación del DNA genómico (que servirá de templado).

Del DNA de 14 individuos de cada taxa, así como de cinco individuos de la generación F1, se realizó la cuantificación de todas las muestras de DNA genómico. Debido a las bajas concentraciones de DNA genómico en los cuatro taxa (ver Apéndice III), se hicieron tres mezclas de cada uno de los taxa (Fig. 14), cada mezcla contuvo 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por lo que se tomaron 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cada individuo (excepto para la generación F1).

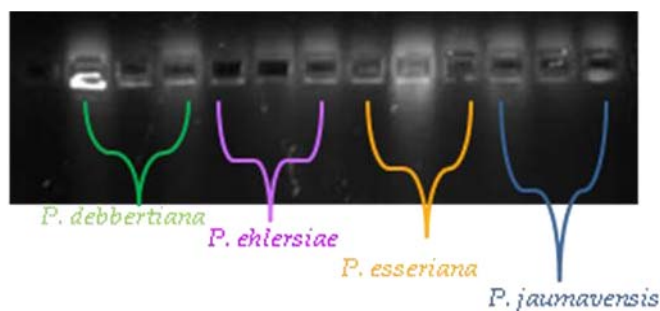
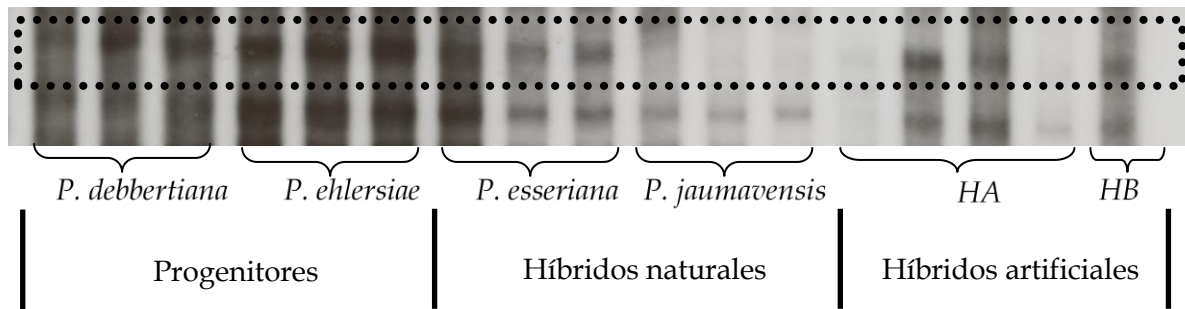


Figura 14. Formación de pools de DNAg de los cuatro taxa involucrados.

Obtención de marcadores moleculares por medio de AFLP's

De los métodos que se emplean con mayor frecuencia en estudios sobre hibridación en diferentes grupos de plantas y el que mejor resultados ha proporcionado ha sido el de AFLP's. Esta técnica a diferencia de otras, permite hacer una aproximación más real de las relaciones genéticas entre los individuos en estudio. Por lo anterior, en este trabajo se utilizaron caracteres moleculares generados por la técnica de AFLP's.

Se obtuvo la amplificación selectiva de 24 pares de primers, de los cuales, sólo 11 pares brindan datos relevantes sobre el nivel de polimorfismo existente entre los taxa, ya que presentan un gran número de bandas obtenidas por gel, así como una buena resolución (Apéndice IV). Posteriormente, los geles fueron leídos meticulosamente tomando en cuenta que cada una de las bandas obtenidas corresponde a un locus presente en el genotipo de esa especie (Fig. 15). La presencia o ausencia del locus permitió la elaboración de una matriz de datos, que refleja las similitudes o disimilitudes genéticas que las especies tienen entre sí. La matriz final contiene 324 loci, correspondientes a 17 individuos de los taxa aquí estudiados (Apéndice V).



MATRIZ DE DATOS:

PD 1	PD 2	PD 3	PEL 1	PEL 2	PEL 3	PE 1	PE 2	PE 3	PJ 1	PJ 2	PJ 3	H A-1	H A-2	H A-3	H A-4	H B-1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1

Figura 15. Formación de la matriz de datos mediante la lectura de geles de AFLP. La matriz completa se encuentra en el Apéndice IV.

6.7 Análisis fenético

La matriz fue analizada utilizando dos programas estadísticos diferentes, con el fin de obtener el mayor número de análisis que puedan brindar mayor sustento a este proyecto. Utilizando el programa NTSys 2.0 se realizó un fenograma mediante el análisis UPGMA, el cual muestra el grado de similitud o disimilitud que guardan los individuos de una misma especie, o de varias especies (Fig. 16).

Los caracteres moleculares permiten distinguir dos grupos bien marcados, por un lado se encuentran un progenitor, *P. ehlersiae*, los híbridos *P. esseriana*, *P. jaumavensis* y los híbrido artificiales; y por otro lado sólo se agrupan a los individuos de *P. debbertiana* (Figs. 16 y 17). En estas figuras se hacen evidentes cuatro aspectos: 1) los individuos de los híbridos *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, así como los híbridos artificiales, mantienen relaciones genéticas entre sí muy cercanas sin importar a que generación filial pertenecen. 2) Tanto los híbridos naturales como los artificiales tienen mayor similitud genética con los individuos de *P. ehlersiae* (progenitor), a diferencia de *P. debbertiana*; lo que sugeriría que los caracteres de uno de los progenitores predominan. 3) Los caracteres moleculares encontrados segregan a *P. debbertiana* del resto de los taxa, lo cual genera la formación de un grupo aparte. 4) *P. jaumavensis* y *P. esseriana*, presentan características genéticas similares que las agrupa siempre, incluso en el análisis morfológico, lo que apoya la hipótesis de un mismo origen, a pesar de que en la actualidad están aisladas geográficamente. Aunque queda por probar si estas especies pueden cruzarse.

La mayoría de los individuos analizados se agrupa de forma natural con los individuos de su misma especie, salvo en los casos de *P. jaumavensis* 1, la cual se localiza dentro del grupo conformado por los individuos de *P. esseriana*, sugiere una gran similitud entre ambas especies híbridas (Fig. 17).

Con la excepción de la muestra HA1, que corresponde al híbrido resultante de la cruce de *P. debbertiana* con *P. ehlersiae*, todos híbridos artificiales se agrupan en un solo bloque. En este grupo también está incluido el producto de la cruce de *P. ehlersiae* con *P. debbertiana*.

El análisis de Componentes Principales (Fig.17), permite ver mejor la relación que existe entre cada una de las especies de este estudio. Destacando las siguientes observaciones: 1) tanto los híbridos artificiales como los naturales comparten más caracteres con *P. ehlersiae* que con *P. debbertiana*, 2) De acuerdo a la proyección de las muestras podemos decir que los híbridos artificiales comparten menos caracteres con *P. ehlersiae*, debido a que existe mayor distancia entre ambas especies, a diferencia de *P. jaumavensis* y *P. esseriana*, 3) *P. jaumavensis* y *P. esseriana* son producto de una hibridación posiblemente más antigua y podrían haber experimentado alguna retrocruza con *P. ehlersiae*, por lo que guardan mayor cercanía con ésta. 4) *P. esseriana* es la especie que comparte más caracteres con *P. ehlersiae*, lo cual sugiere una mayor introgresión (retrocruzas), con *P. ehlersiae*.

En resumen, ambos análisis sustentan que los individuos de los posibles híbridos naturales y artificiales se encuentran más cercanos a *P. ehlersiae* que a *P. debbertiana*, lo cual es congruente con los caracteres morfológicos principalmente con la forma y tamaño del tubo de la corola, así como la forma de la corola; mientras que el único carácter morfológico que comparten los híbridos con *P. debbertiana* es la presencia del paladar a nivel de la corola, así como el tipo de tricomas que lo conforman. En este trabajo también se encontró, a nivel molecular, que existe un polimorfismo alto entre los taxa, lo que indica que comparten muchos loci (caracteres) y además, los híbridos poseen menos caracteres propios (bandas monomórficas) que sus posibles progenitores, lo que estaría indicando una semejanza entre el genoma de los híbridos naturales y los híbridos artificiales con sus posibles progenitores.

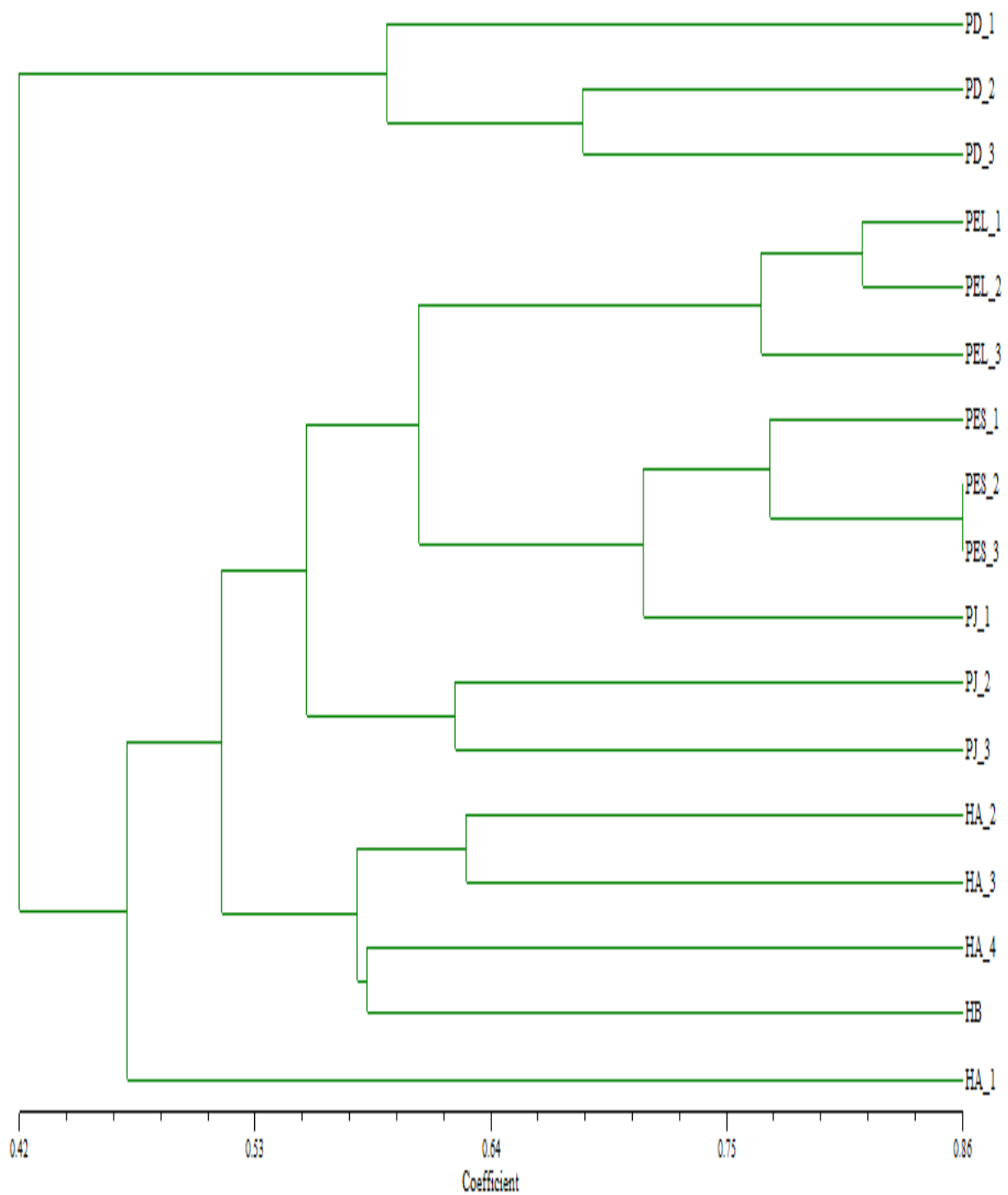


Figura 16. Fenograma resultante del análisis UPGMA, usando el coeficiente de Jaccard y el programa NTSYS 2.0. HA, *P. debbertiana* x *P. ehlersiae*; HB, *P. ehlersiae* x *P. debbertiana*; PD, *P. debbertiana*; PEL, *P. ehlersiae*; PES, *P. esseriana*; PJ, *P. jaumavensis*.

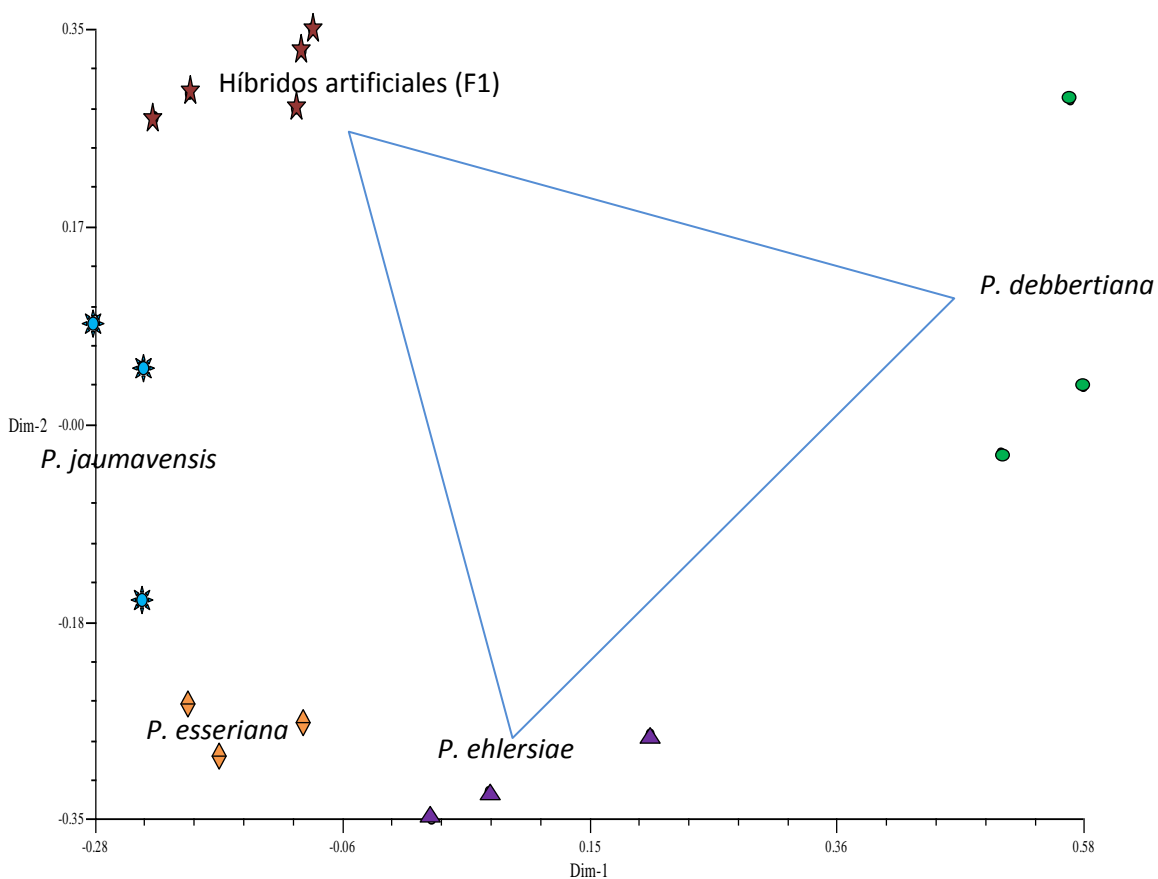


Figura 17. Proyección de los individuos mediante el análisis de componentes principales.

Los resultados de las polinizaciones manuales realizadas en este trabajo, junto con el poco frecuente desarrollo de barreras reproductivas reportado para este grupo de pinguículas (Castillo, 2007), así como los resultados de la caracterización morfológica y el análisis molecular posibilitan la idea de que los híbridos naturales sean el producto de la cruce de *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*. Su historia podría ser la siguiente: el primer híbrido debió haber sido producto de la cruce de las especies propuestas como progenitores debido a que tuvieron una distribución simpátrica, además, ambas especies tienen la capacidad de hibridar, como fue demostrado en el presente estudio con las polinizaciones artificiales. Posteriormente, algunos de los individuos pudieron haberse retrocruzado una o varias veces con sus progenitores, creando una serie de combinaciones genéticas con las mismas probabilidades de éxito. Los individuos que se encuentran en el presente podrían ser derivados de una o varias retrocruzas con *P. ehlersiae*. Esto explicaría la relación más cercana a nivel morfológico y molecular de los posibles híbridos naturales así como de los híbridos artificiales con *P. ehlersiae*.

La explicación anterior, se basa en los resultados obtenidos en este trabajo, en el que se observaron: 1) la cruce artificial recíproca entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae* produce prole, 2) cuando *P. debbertiana* funciona como madre es capaz de formar un mayor número de semillas viables, lo cual se vio reflejado en un mayor porcentaje de germinación, en cambio cuando *P. ehlersiae* funciona como madre el número de semillas viables y el

porcentaje de germinación son menores, 3) los híbridos naturales aceptan polen de ambos progenitores, permitiendo la introgresión en ambas direcciones (Castillo, 2007), 4) los posibles híbridos naturales son fértiles por que dejan descendencia.

De acuerdo con los criterios de Hughes y Harris (1994) para el estudio sobre hibridación, las plantas que se incluyen en este trabajo pueden considerarse como híbridos naturales, puesto que reúnen cuatro de los cinco puntos que se enumeran como requisitos para ser híbridos; estas plantas presentan un fenotipo intermedio entre los padre putativos, su fertilidad es reducida, existe un solapamiento de la distribución entre los padres, e incluso de los híbridos con al menos uno de los padres, comparten periodos de floración y por último, se pueden formar híbridos artificiales entre los progenitores. El trabajo que aquí se llevó a cabo, confirma la hipótesis del origen híbrido de las poblaciones de *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, como producto de la cruce de *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*; sin embargo, queda pendiente realizar más estudios dentro de los cuales se encuentran la caracterización morfológica y viabilidad gamética de los híbridos artificiales. Los resultados que se obtengan esclarecerán las relaciones genéticas de la F1 de los híbridos artificiales con los naturales.

El uso simultáneo de marcadores nucleares y citoplásmicos permite detectar posibles asimetrías en la dirección en que ocurre la hibridación (e.g. cuando una de las "formas" actúa con mayor frecuencia como progenitor materno o paterno que la otra). De la misma manera, cuando existe introgresión se puede evaluar la medida relativa en que la dispersión de semillas y de polen contribuye al flujo génico entre ambos taxa. Debido a la poca producción de frutos y semillas de las especies híbridas no se pueden detectar la dirección en que ocurrió la hibridación, aunque de acuerdo al porcentaje de germinación, tiene mayor éxito la cruce de *P. debbertiana* x *P. ehlersiae* que la inversa, lo que sugiere la presencia de barreras reproductivas que evitan la formación de un alto número de semillas viables en ese sentido. Pero para poder sustentar esta aseveración se necesitan hacer más análisis.

VII. Conclusiones

- La gran variación morfológica de las flores en *Pinguicula esseriana* y *P. jaumavensis*, la presencia de un alto porcentaje de granos de polen abortivos (*P. esseriana*, 55.5%), la poca o nula producción de semillas viables y el bajo porcentaje de germinación, son razones que refuerzan la hipótesis que señala a estas especies como entidades de origen híbrido.
- Existe un mayor porcentaje de germinación en la cruce de *P. debbertiana* con *P. ehlersiae* que en su recíproco, lo que sustenta la dirección del proceso de hibridación.
- Los híbridos naturales presentan un alto grado de similitud con las especies progenitoras, en especial con *P. ehlersiae*, por lo que se considera que ha ocurrido cierto grado de introgresión con este progenitor.
- Los individuos provenientes de la generación F1, obtenidos por polinización artificial entre *P. debbertiana* y *P. ehlersiae*, se agrupan con individuos de *P. esseriana* y *P. jaumavensis*, lo que apoya la hipótesis de su origen a partir de estos parentales.

Literatura citada

- Abbot, R. 1992. Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 401- 405.
- Aggarwal,R., Brar, D., Nandi, S., Huang, N. and G. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1320-1328.
- Alcalá, R. y C. Domínguez. 1997. Biología de las plantas carnívoras: aspectos ecológicos y evolutivos. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60: 59- 69.
- Alexander, M. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technol.* 55:13-18.
- Arnold, M.L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, Nueva York.
- 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.
- Bottini, M., De Bustos, A., Jouve, N. y L. Poggio. 2002. AFLP characterization of natural population of *Berberis* (Berberidaceae) in Patagonia, Argentina. *Plant Systematics and Evolution* 231: 133-142.
- Brown, C.L. y M. Lomolino. 1998. *Biogeography*. Sinauer Associates Inc, Massachusetts.
- Bush, G.L. 2001. Process of speciation. Pp. 371-381. En Levin, S.A. (Ed). *Encyclopedia of Biodiversity*, Vol 5. Academic Press.
- Cabrero, J. y J. Camacho. 2003. Capítulo 6: Fundamentos de genética de poblaciones. Pp. 83-126. En: Soler, M. (Ed). *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones.
- Caputo, P., S. Aceto, S. Coccolino y R. Nazzarro. 1997. Morphological and Molecular characterization of a natural hybrid between *Orchis laxiflora* and *O. morio* (Orchidaceae). *Plant Syst. and Evolution* 205: 147- 155.
- Casper, J. 1966. Monographie der Gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica*. 31: 1- 29.
- Castillo, N. 2007. Micromorfología floral y embriología de un supuesto híbrido dentro del género *Pinguicula* (Lentibulariaceae, L. C. Richard). Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cieslak, T., Santosh, J., White, A., Müller, K., Borsch, T., Barthlott, W., Steiger, J., Marchant, A. and L. Legendre. 2005. Phylogenetic Analysis of *Pinguicula*

- (Lentibulariaceae): Chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. *American Journal of Botany* 92(10): 1723–1736.
- Contreras, R., S. Milla-Lewis y G. Craig 2007. Investigating parentage and hybridity of three *Azaleodendrons* using Amplified Fragment length Polymorphism Analysis. *Hort Science* 42 (3): 740- 743.
- Cracraft, J. 2000. Species concepts in theoretical and applied biology: a systematic debate with consequences PP. 3-14. En: *Species Concepts: A Debate*. Wheeler, Q., Meier, R. (Eds.) Columbia university Press, New York.
- Cruz, Y. 2002. Caracterización Morfológica y Molecular de un posible híbrido entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* (Cactaceae). Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Debbert, P. 1991. Einige neue Arten der Gattungen *Drosera* (Droseraceae) and *Pinguicula* (Lentibulariaceae). *Munchen* 30: 372 -380.
- Dobzhansky, T. 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- Dobzhansky, T. 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *American Naturalist* 74:312-321.
- Dowling, T.E. y C.L. Secor. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:593-619.
- Ellstrand, A. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review Ecological Systematics* 30: 359-363.
- 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 Siddiqui S. A. 1967. Studies in the Lentibulariaceae 6. The embryology of *Utricularia stellaris* Linn. *Journal of the Indian Botanical Society*. 46: 31-44.

- García de Santana, D. y M. Ranal (2000). Análise estatística na germinação. Mini curso ministrado durante o 51º Congresso Nacional de Botânica, Brasília-DF.
- 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.
- Gobert, V., Moja, S., Colson, M. and P. Taberlet. 2002. Hybridization in the section *mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany* 89(12): 2017-2023.
- Godfrey, R. y H. Stripling. 1961. A synopsis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in the Southeastern United States. *The American Midland Naturalist.* 66 (2): 395- 409.
- Goldman, D., Jansen, R., Van Den Berg, C., Leitch, I., Fay, M. y M. Chase. 2004. Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. *Amer. J. Bot.* 91: 707-723.
- Grant, V. 1981. Plant speciation. Columbia University Press, New York
- Harrison, R.G. 1990. Hybrid zones: windows on evolutionary process. En: D. Futuyma y J. Antonovics [eds.]. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 7:69-128.
- Harrison, R.G. 1993. Hybrids and hybrid zones: Historical Perspective. En: R.G. Harrison, (ed.). *Hybrid zones and the Evolutionary Process.* Oxford University Press.
- Heslop, Y. 2004. *Pinguicula* L. In: Biological floral of the British isles. *Journal of Ecology* 92: 1071- 1118.
- Hey, J. 2001. The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution.* 16:326-329.
- Hey, J. 2006. On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology and Evolution.* 21: 447-50.
- Hong- Guang, Z., R. Milne y Hang Sun. 2008. Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. *Botanical Journal of the Linnean Society* 156: 119- 129.
- 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 and Evolution* 192: 177- 197.
- Hollocher, H. 2000. Theories of speciation. Vol. 5. Pp. 383-396. En: The Encyclopedia of Biodiversity. Editet by S. A. Levin. Academic Press, NY.
- Howard, D.J. 1993. Reinforcement: origin, dynamics and fate of an evolutionary hypothesis. En: R.G. Harrison [ed.]. *Hybrid zones and the evolutionary process.* Oxford University Press.
- 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.
- Jones, S. B. 1988. *Sistemática Vegetal*. McGraw-Hill.
- Juniper, B., Robins, J. y D. Joel. 1989. *The carnivorous plants*. Academic Press. London.
- Kaplan, Z. y J. Fehrer. 2007. Molecular evidence for a natural primary triple hybrid in plant revealed from direct sequencing. *Annals of Botany*. 99: 1213-1222.
- 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.
- Kameyama Y. y M. Ohara, 2006. Genetic structure in aquatic Bladderworts: Clonal propagation and hybrid perpetuation. *Annals of Botany*. 98: 1017-1024.
- 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. 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.
- Kiew, R., Teo, L. y Y. Gan. 2003. Assessment of the hybrid status of some Malesian plants using Amplified fragment length polymorphism. *Telopea* 10(1): 225-233.
- Kirchner, B. 1981. *Pinguicula esseriana* (Lentibulariaceae)- eine neue Art aus Mexiko. *Willdenowia* 11: 317 -319.
- Lester, R. y J. Kang. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany* 82: 445-453.
- Liscum, E. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism: Studies on Plant development. In: *PCR Applications*. Academic Press.
- Liscum, E. y P. W. Oeller. 1999. AFLP: DNA fingerprinting to positional cloning. In: *Analytical Biotechnology: Genome Analysis* (P. Oefner, Ed.). CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Liu, Z.J. and F. Cordes, 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37
- 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.
- Mallet, J. 1995. A species definition for the modern synthesis. *Trends Ecol. Evol.* 10:294–299.

- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20:229-237.
- Marhold, A., Lihovaâ, J., Perny, M. and W. Bleeker. 2004. Comparative ITS and AFLP Analysis of Diploid Cardamine (Brassicaceae) Taxa from Closely Related Polyploid Complexes. *Annals of Botany* 93: 507-520.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. New York: Columbia University Press.
- McKinnon, G., Vaillancourt, R., Steane, D. and B. Potts. 2008. An AFLP Marker Approach to Lower-Level Systematics in *Eucalyptus* (Myrtaceae). *American Journal of Botany* 95(3): 368-380.
- Meudt, H. y A. Clarke. 2007. Almost Forgotten or Latest Practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in plant Science.* 12 (3): 106-117.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- 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.
- Nei, M. y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001- 1007.
- Niklas, K. 1997. The evolutionary biology of plants. The University of Chicago Press.
- Olvera, G. y E. Martinez. 2002. Primer registro de Genlisea (Lentibulariaceae) para México. *Acta Botánica Mexicana* 59: 71-73.
- Parrish, T., Koelewijn, H., Van Dijk, P. y M. Kruijt. 2003. Genetic evidence for natural hybridization between species of Dioecious *Ficus* on island populations. *Biotropica* 35 (3): 333-343.
- Perfectti, F. 2003. Especiación: modos y mecanismos. Pp. 307-321. En: Soler, M. (Ed.). *Evolución. La base de la biología.* Proyecto Sur de Ediciones, S. L.
- Powell et al, 1999 Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RADP, AFLP y SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225- 238.
- Radu, A., Courbot, M., Bourgis, F., Salis, P., Saumitou-Laprade, P. and N. Verbruggen. 2006. Comparative cDNA AFLP analysis of Cd-tolerant and -sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 12.
- Rhymer, J. y D. Simberloff. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83- 109.
- Rieseberg, L. y N. Ellstrand. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization?. *Critical Review in the Plant Sciences* 12: 213-241.

- Rieseberg, L. 1995. The role of hybridation 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.
- Rieseberg, L., B. Sinervo, C. Linder, M. Ureger y D. Arias. 1996. Role of gene interactions in hybrid speciation: Evidence from ancient and experimental hybrids. *Science* 272: 471- 475.
- Rohlf, F. 2000. NTSyspc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (version 2.1 f). Exeter Software Publishers Ltd., setannket, New York.
- Rosabelles, S. 1999. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (Fagaceae): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the Got-z locus. *Plant Systematics and Evolution*. 217: 137- 146.
- Ruzin, S.E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Oxford, Oxford University Press.
- Salomon, M. 2001. Evolutionary biogeography and speciation: essay on a synthesis. *Journal of the biogeography*. 28: 13- 27.
- Sang, T., Crawford, D., y T. Stuessy. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 6813 – 6817.
- Schluter, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*. 16:372-380.
- Schnell, D. 1976. Carnivorous Plants of the United States and Canada. J. Blair Publisher. Winston Salem, North California.
- Shan, F., Clarke, H., Plummer, J., Yan, G. y K. Siddique. 2005. Geographical patters of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* Characterized by amplified fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 110: 381- 391.
- Shasany, A., Darokar, A., Dhawan, S., Gupta, A., Gupta, S., Shukla, A., Patra, N. and S. Khanuja. 2005. Use of RAPD and AFLP Markers to Identify Inter- and Intraspecific Hybrids of *Mentha*. *Journal of Heredity*. 96(5):542-549.
- Siddiqui S. A. 1978. Studies in the Lentibulariaceae 9. Pollinitation, fertilization, endosperm, embryo and seed in *Utricularia dechotoma* Labill. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. 100:237-245.
- 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.
- Sneath, P. y R. Sokal, 1973. Numerical taxonomy – the principles and practice of numerical classification. (W. H. Freeman: San Francisco.)

- Sokal, R. y F. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y Métodos estadísticos a la investigación biológica*. Universidad del Estado de Nueva York, Story Brook. H. Blume Ediciones.
- Sokal, R. y C. Michener. 1958. Statistic method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans Sci. Bull.* 28: 1409- 1438.
- Soler, J. 2003. Selección natural y adaptación. Pp. 127- 157. En: Soler, M. (Ed.) *Evolución. La base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, S. L.
- 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.
- Steinbruck, G., M. Schlegel, I. Dahlstrom y B. Rottger. 1986. Characterization of interspecific hybrids between *Orchis mascula* and *O. pallens* (Orchidaceae) by enzyme electrophoresis. *Plant Syst. and Evolution* 153: 229- 241.
- 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.
- Templeton, A. 1982. Mechanisms of speciation—a population genetic approach. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 12:23-48
- Thórsson, T., Pálsson, S., Sigurgeirsson, A. y K. Anamthawat- Jónsson. 2007. Morphological Variation among *Betula nana* (diploid), *B. pubescens* (tetraploid) and their Triploid Hybrids in Iceland. *Annals of Botany.* 99: 1133-1193.
- van Raamsdonk, L., Ginkel, M. y C. Kik. 2000. Phylogeny reconstruction and hybrid analysis in *Allium* subgenus *Rhizirideum*. *Theoretical and Applied Genetics.* 100: 1000-1009.
- Vos, P., R. Hogers, M. Beeker, M. Reijans, T. Hornes, A. Freijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y Zabu. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407- 4414.
- Vriesendorp, B. y F. Bakker. 2005. Reconstructing of reticulate evolution in angiosperms: what can we do?. *Taxon* 54 (3): 593- 604.
- Wendel, J. Stewart, J. y J. Rettig. 1991. Molecular evidence for homoploid reticulate evolution among Australian species of *Gossypium*. *Evolution.* 45:694-711.
- Wheeler, Q. y R. Meier. 2000. *Species Concepts: A Debate*. Columbia University Press, New York.
- Wiley, E.O. 1981. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology.* 27:17-26.
- 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. 2000. The genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) in Mexico and Central América. 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. y B. Ludlow- Wincher. 1993. No. 4. Lentibularieaceae, *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. y M. Olvera. 2009. A new species of *Utricularia* (Lentibulariaceae) from Guerrero, Mexico. *Brittonia* 61(2):119-125. FI .241

Apéndice I

Pinguicula debbertiana Speta et Fuchs, Linzer Biol.Beitr. 24(1): 375.1992.

Plantas perennes con tallo corto, simple y raíces delgadas, blanquecinas, no ramificadas. La roseta invernal, es compacta y está formada por 45-48 hojas, cuyo borde delantero está doblado hacia arriba, las hojas tienen cerca de 8 mm de largo, 5 mm de ancho y 1.25 mm de grueso. Las 24- 30 hojas estivales están presentes de abril hasta octubre (noviembre), tienen 13 mm de largo, 8 mm de ancho y 1.5 mm de grueso. Los dos tipos de hojas son de color verde bronceado pálido con un lado superior piloso glandular. Cortes transversales demuestran que los lados inferiores son más convexos y los lados superiores menos. No está formada una yema invernal. La florescencia dura de febrero hasta abril, esporádicamente hasta junio. Se forman 2-3 pedúnculos florales por periodo vegetativo, que tienen 6-7 cm de largo y son +/- desnudos. Los sépalos son truncados, tienen 2.25 mm de largo, 1.25-2 mm de ancho, los dos ventrales están unidos por 1.3 mm. La corola es bilabiada, los labios superior e inferior forman un ángulo de 90°. Su lado superior es de un "Phlox Purple" (Ridgway XI/61b) con una nervadura de "Mathew's Purple" (XXV/65'-) con una garganta amarillenta blanca. En el labio inferior se extiende en dirección al labio central un abombamiento blanco un poco levantado con un "cepillo de pelo" amarillento bilinear. Los pelos de la garganta son multicelulares y no ramificados, el tubo corto y también el espolón poco encorvado, de 8 mm de largo son amarillentos blancos y escasamente pilosos con pelos muy cortos. El ovario es globular, de un verde claro y piloso glandular. El estigma es lobulado, de color amarillento blanco, ciliado en la orilla con cilias cortas. Los dos filamentos de un amarillo claro son un poco encorvados, con pelos cortos y tienen 1 mm de largo, Las tecas y polen son de color amarillo blanquecinos. Esta especie fue ubicada por sus autores dentro de la sección *Crassifolia* junto con *P. esseriana* y *P. ehlersiae*, en función de la semejanza de sus hojas.

Pinguicula ehlersiae Speta et Fuchs, Stapfia 10: 113-114. 1982.

Tipo: México, San Luis Potosí: planta cultivada en el Jardín Botánico de Linz, herborizada el 12.I.1981, procedente de una colecta realizada por R. Ehlers s. n. en Guadalcázar, San Luis Potosí, en marzo de 1979 (holotipo herbario particular de F. Speta en Linz, Austria).

Planta herbácea perenne. Hojas basales dimórficas en rosetas subsecuentes. Pedúnculos 1 a 2 por planta, de 53 a 165 mm de largo. Flores de 30 a 45 mm de largo (incluyendo el espolón); corola morada purpúrea, el centro es blanco, casi glabro, la cara inferior es más clara, con glándulas estipitadas en la parte basal, labio superior bilobado, lóbulos obovado-cuneados, de 6 a 13 mm de largo, por 5 a 9 mm de ancho, redondeados en el ápice, labio inferior trilobado, lóbulos obovado-cuneados, de 7 a 13 mm de largo, por 4 a 11 mm de ancho, el lóbulo medio es un poco mayor que los laterales, tubo piloso en su interior con pelos multicelulares cortos, cilíndricos o claviformes, agrupados en dos líneas en la parte ventral, espolón recto o ligeramente curvo, verdoso con nervios de color púrpura, de 16 a 25 mm de largo, glandular pubescente. Polen (4)5 a 6 colorado. Número cromosómico $2n=32$. Floración de enero a abril. Se ha colectado en bosque de encinos, entre 1800 y 2000 m de altitud, en laderas de rocas calizas y metamórficas. Se conoce de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí, en la Sierra Madre Oriental.

En la descripción de Zamudio (2001), se hace una descripción detallada entre *P. ehlersiae* y *P. esseriana*, resultando que la mayoría de los caracteres estudiados en este trabajo tienen una amplia sobreposición, lo que hizo pensar a Zamudio que ambas pertenecen a una sólo especie, en la que se pueden distinguir dos variedades.

Pinguicula esseriana, Kirchner, Willdenowia 11: 317. 1981

Tipo: México. San Luis Potosí: Im Hochland von San Luis Potosí bei El Huizache, 1977, G. Köhres s.n. (holotipo BOCH, Palmengarten Frankfurt; Sammlung Weinert, Hamein).

Encontrada en 1977 por el recolector de cactáceas Gerhard Köhres; la localidad se ubica cerca del "Huizache", en el altiplano de San Luis Potosí. Fueron colectados tres ejemplares, de los cuales, una de ellas fue llevada al Jardín Botánico de la Universidad de Bochum. En dónde fue descrita por primera vez por B. Kirchner y publicada en 1981.

Descripción Zamudio (2001 y 2005)

Planta herbácea perenne. Hojas basales dimórficas en dos rosetas subsecuentes; "roseta de invierno" laxa, de (10) 15 a 30 (35) mm de diámetro, con (15)20 a 40(70) hojas carnosas, erectas o adpresas al suelo, angosta a ampliamente espatuladas, de (5)8 a 20 mm de largo, por 2 a 5.5 mm de ancho, glandular-pubescentes en el haz; roseta de verano" laxa, extendida sobre el suelo, de (13)20 a 40 mm de diámetro, con 10 a 20(35) hojas membranáceas, espatuladas a ampliamente espatuladas, de (7)10 a 25 mm de largo, por 5 a 13 mm de ancho, glandular-pilosas en el haz, con glándulas sésiles y glándulas estipitadas, ápice redondeado, con el margen involuto. Hibernáculo ausente. Pedúnculos 1 a 4(6) por planta, cilíndricos, erectos, de 50 a 165 mm de largo, espaciadamente glandular-pubescentes, con glándulas estipitadas cortas, o glabrescentes. Flores de (23)25 a 40(45) mm de largo (incluyendo el espolón), cáliz bilabiado, glandular-pubescente en ambas superficies, de color verde, labio superior dividido casi hasta su base en tres lóbulos obovados a elípticos de 2 a 4 mm de largo, por 1 a 3 mm de ancho, labio inferior bilobado 1/2 a 4/5 de su longitud, lóbulos elípticos a lanceolados, de 2 a 3 mm de largo, por 1 a 2 mm de ancho, unidos 0.5 a 1(2) mm en la base; corola profundamente bilabiada de color rosa violáceo-purpúrea, la garganta blanca, en algunas ocasiones el lóbulo medio del labio inferior tiene en su base una mancha de color amarillo-verdoso, cubierta con pelos multicelulares cilíndricos, labio superior bilobado, lóbulos angosta a ampliamente obovado-cuneados, obovado a oblatos, divergentes o más o menos sobrepuestos entre sí, de 5 a 14 mm de largo, por 3 a 12 mm de ancho, redondeados a truncados en el ápice, labio inferior trilobado, lóbulos angosta a ampliamente obovado-cuneados, obovados a oblatos, de 6 a 13 mm de largo, por 2.5 a 13 mm de ancho, el lóbulo medio es un poco mayor que los laterales, garganta densamente pilosa, con pelos retrorsos hacia el tubo, agrupados en líneas; tubos cortísimo, ampliamente infundibuliforme, de (2)3 a 4 mm de largo, piloso en su interior, con pelos cilíndrico-subulados, paladar ausente o formado por dos pequeñas protuberancias, amarillo, cubierto densamente con pelos multicelulares cilíndricos o más o menos clavados; espolón cilíndrico-subulado, poco incurvado, blanco-verdoso, teñido ligeramente de morado, con venas morado-violáceas, en ángulo obtuso con respecto al labio inferior, de (10)15 a 20(30) mm de largo. Cápsula subglobosa, de 3 a 4 mm de diámetro, glandular-pubescente. Semillas numerosas, elipsoidales, de 0.5 a 1 mm de largo, por 0.3 mm de ancho, de color café, superficie verrugosa, la región micropilar más aguda que la calaza. Número cromosómico $2n=32$.

Esta especie se distribuye en la Sierra Madre Oriental. Es un taxón polimórfico muy variable, sobre todo en las características de la flor.

Pinguicula jaumavensis, Debbert, München 30: 379. 1991.

Tipo: México. Tamaulipas. Jaumave, P. Debbert 51 (holotipo M).

Descripción Zamudio (2005)

Planta herbácea perene, hojas basales dimórficas en dos rosetas subsecuentes. Pedúnculos 1 a 4(6) por planta. Flores de (23)25 a 40 mm de largo (incluyendo el espolón); corola de color rosa a violáceo-purpúrea, con una mancha amarillo-verdosa en la base del lóbulo medio del labio inferior, labio superior bilobado, lóbulos variables en forma, de angostamente obovado-cuneados a oblatos, divergentes o más o menos sobrepuestos entre sí, de 5 a 14 mm de largo, por (2)3 a 12 mm de ancho, redondeados a truncados en el ápice, labio inferior trilobado, lóbulos variables en forma, de angostamente obovados a oblatos, de 6 a 13 mm de largo, por 2.5 a 13 mm de ancho, el lóbulo medio es un poco mayor que los laterales, garganta densamente pilosa, con pelos retrorsos hacia el tubo, agrupados en líneas, tubo piloso en su interior, con pelos cilíndrico-subulados, paladar amarillo, con dos pequeñas protuberancias, cubierto densamente con pelos multicelulares cilíndricos o más o menos clavados; espolón cilíndrico-subulado, poco incurvado, en ángulo obtuso con respecto al labio inferior, blanco-verdoso, teñido ligeramente de morado, con venas morado-violáceas, de (10)15 a 20(30) mm de largo, polen 5 a 6(7) colporado. Número cromosómico $2n=32$. La floración se presenta de enero abril. Se establece en las laderas sombreadas con poca inclinación, crece sobre suelo somero o en las grietas de las rocas, principalmente en sustrato calizo. Se distribuye en el estado de Tamaulipas en el municipio de Jaumave.

En la descripción realizada por Zamudio (2001, 2005), el autor incluye a esta especie como una variante morfológica de *P. esseriana*.

Apéndice II

Análisis Morfológico

Técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (Bozzola y Russell, 1999).

Deshidratar en:

- Alcohol etílico (50%, 50%, 70%, 85%, 96%, 100% y 100%), durante 30 min cada uno.
 - Etanol-acetona 1:1, 1:2 y acetona pura durante 15 minutos cada uno.
1. Secaran a punto crítico con CO₂.
 - Montar en porta muestras metálicos de aluminio sobre cinta conductiva de carbón y cubrir con una capa delgada de oro, utilizando una ionizadora.
 2. Tomar fotografías en un microscopio electrónico de barrido.
 - 3.

Técnicas Histológicas.

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

1. Tomar con un pincel una muestra de polen extraído de flores frescas.
2. Colocar sobre un portaobjetos.
3. Agregar una gota de la solución de Alexander y mezclar con un palillo de madera.
4. Observar 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 (citoplasma carente de coloración y pared teñida de color verde).

D. Viabilidad de semillas

Poner a germinar lotes de 100 semillas por taxa provenientes de diferentes individuos.

1. Esterilizar cajas Petri que contengan un papel filtro húmedo a la saturación.
2. Colocar utilizando un pincel las semillas sobre el papel filtro, procurando dejar un espacio considerable entre cada semilla (hacer esto en un medio esteril, para evitar la proliferación de hongos).
3. Sellar cada caja con plástico.
4. Germinar a una temperatura aproximada de 20°C, el cual ya ha sido probado como idóneo para estos taxa.

Apéndice III

AFLP's (Vos *et al.*, 1995; modificado por Liscum, 1999).

A. Purificación del DNA genómico (que servirá de templado).

Protocolo de extracción:

1. Pulverizaron 0.5 - 0.6 g de hojas en nitrógeno líquido.
2. Agregar el machacado a un tubo con 1.25 ml de buffer de extracción (1% SDS, 7M urea, 10x TE y 1% 2-mercaptoetanol) y 1.25 de PCI.
3. Centrifugar a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min
4. Transferir el sobrenadante a un tubo con 1.25 ml de PCI y se centrifugar a 5000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.
5. Vaciar el sobrenadante a un tubo con 1.25 ml de cloroformo y centrifugar a 5000 rpm, durante 10 min.
6. Colocar el sobrenadante a un tubo eppendorf y agregar un volumen de isopropanol. Incubar durante 2 horas a -20°C.
7. Centrifugar a 5000 rpm durante 30 min., a temperatura ambiente.
8. Decantar y resuspender en 490 µl de H₂O y 10 µl de RNA_{sa} (20µg/ml). Incubar a 37°C durante 30 min.
9. Extraer con 500µl de PCI y agitar ligeramente. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm a temperatura ambiente.
10. Recuperar sobrenadante y precipitar con 1/3 de volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
11. Incubar a -20°C toda la noche.
12. Centrifugar a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C.
13. Decantar y limpiar el precipitado con Etanol al 70%. Dejar evaporar.
14. Resuspender en 55µl de H₂O. Hacer tres alícuotas de 16 µl cada una y guardar a -20°C.

B. Digestión ligamiento (mediante enzimas de digestión)

Doble digestión:

1. Tomar 20 µl de DNA genómico y agregar:
 - 0.5 µl de EcoR1
 - 1 µl de Mse1
 - 2.5 µl de React. 1 (Invitrogen)
 - 1.0 µl de H₂O.
2. Mezclar con la micro pipeta e incubar toda la noche a 35°C. Para un volumen total de 25 µl por reacción.

Reacción de ligación:

1. Tomar 10 µl de la reacción de digestión y agregar:
 - 0.5 µl de adaptador de Mse1 (ML33, 5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3'; ML34, 5' TAC TCA GGA CTC AT 3')
 - 0.5 µl de adaptador de EcoR1 (ML35, 5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3'; ML36, AAT TGG TAC GCA GTC 3')

- 6 μl de Buffer T₄ DNA ligasa
 - 1 μl de ligasa
 - 2 μl de H₂O
2. Mezclar bien con la micro pipeta y dejara a temperatura ambiente durante toda la noche. Volumen total de reacción: 20 μl .

C. Preamplificación por PCR

A cada una de las muestras se le agregar:

- 2.5 μl de buffer 10x s/MgCl₂
- 1 μl MgCl₂
- 0.5 μl dNTPs 25mM
- 0.6 μl EcoR1 + Primer (ML37, GAC GAT GAG TCC TGA GTA A 3')
- 0.6 μl Mse1 + primer (ML38, 5' CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT C 3')
- 0.5 μl Taq Polimerasa.

Para un volumen total de reacción de: 25 μl . Las muestras fueron amplificadas durante 20 ciclos de :

94°C - 2 min	} 20 ciclos
94°C - 30 seg	
55°C - 1 min	
72°C - 1 min	
72°C durante 5 minutos	
4°C α .	

D. PCR-AFLP (amplificación selectiva).

Marcaje del primer:

- 10 μl EcoR1- AFLP primer 50ng/ μl
- 5 μl γ^{33} P- ATP
- 5 μl buffer Forward Reaction B
- 1 μl T₄PNK
- 4 μl H₂O.

Incubar a 37°C por 30 min y pasar a 70°C por 10 min (para inactivar PNK). Adicionar 25 μl de H₂O para tener una concentración final de 10 ng/ μl .

Mezcla de reacción para amplificación:

A 5 μl de DNA preamplificado y diluido previamente (1:10) agregar:

- 9.2 μl de H₂O
- 2 μl buffer de PCR 10x s/MgCl₂
- 0.5 μl dNTPs 10 mM
- 1 μl de primer EcoR1- AFLP γ^{33} P- ATP
- 1 μl primer Mse1
- 0.5 μl Taq polimerasa

Para un volumen total de reacción de 20 μ l. Cada reacción se amplificara:

11 ciclos	{	94°C - 4 min.
		94°C - 30 seg
		65°C - 30 seg, -0.7°C por ciclo partiendo del próximo ciclo, hasta llegar a 56°C.
25 ciclos	{	72°C - 1 min
		94°C - 30 seg
		56°C - 30 seg
		72°C - 1 min
		72°C - 5 min
		4°C - α

Soluciones:

Gel de acrilamida al 6%:

- 60 ml acrilamida para secuenciación
- 150 μ l Persulfato de amonio
- 40 μ l TEMED

Bromuro de Etdio:

Disolver 0.2 g de Bromuro de Etdio en 20 ml de agua; mezclar perfectamente y almacenar a 4° C.

Apéndice IV

Cebadores utilizados en los AFLP's

Clave	Nombre	Secuencia	Combinación de primers que brindaron más información
ML 33	MseI adapt.1	GACGATGAGTCCTGAG	47- 77
ML 35	EcoRI adapt. 1	CTCGTAGACGCGTACC	40- 80
ML 37	Mse Core + adapt	GACGATGAGTCCTGAGTAA	42- 73
ML 38	Eco Core + adapt	CTCGTAGACTGCGTACCAATTC	43- 73
ML 42	Eco + 1.1	AGACTGCGTACCAATTCA	42- 72
ML 43	Eco + 1.2	AGACTGCGTACCAATTCT	44- 74
ML 44	Eco + 1.3	AGACTGCGTACCAATTCG	43- 76
ML 45	Eco + 1.4	AGACTGCGTACCAATTCC	44- 65
ML 46	Eco + 2.1	AGACTGCGTACCAATTCAA	44- 75
ML 47	Eco + 2.2	AGACTGCGTACCAATTCAT	45- 67
ML 65	Mse + 1.4	GATGAGTCCTGAGTAAC	46- 73
ML 67	Mse + 2.2	GATGAGTCCTGAGTAAAT	
ML 72	Mse + 2.7	GATGAGTCCTGAGTAATG	
ML 73	Mse + 2.8	GATGAGTCCTGAGTAATC	
ML 74	Mse + 2.9	GATGAGTCCTGAGTAAGA	
ML 75	Mse + 2.10	GATGAGTCCTGAGTAAGT	
ML 76	Mse + 2.11	GATGAGTCCTGAGTAAGG	
ML 80	Mse + 2.15	GATGAGTCCTGAGTAACG	

Apéndice V

Matriz básica de datos de caracteres moleculares

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1
0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1
1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1
1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1
1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1
1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

PD1	PD2	PD3	PEL1	PEL2	PEL3	PES1	PES2	PES3	PJ1	PJ2	PJ3	HA1	HA2	HA3	HA4	HB
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1