



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



Facultad de Biología

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Área: Biología Evolutiva

**ECOLOGÍA DE LA CLEISTOGAMIA EN UNA ESPECIE
CARNÍVORA: *Pinguicula crenatiloba*, D.C. (*Lentibulariaceae*)**

Proyecto de tesis que presenta:

Biól. Sandra Penélope Barrón Villanueva

Como requisito para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Biológicas

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Eduardo Cuevas García

Morelia, Michoacán, mayo, 2024.



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El presente documento es producto del trabajo original de investigación de Sandra Penélope Barrón Villanueva, estudiante del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas y respetando siempre los más altos estándares éticos solicitados por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Todos los datos de la investigación reportada en el presente documento de tesis (excepto los indicados explícitamente en el texto), fueron obtenidos por Sandra Penélope Barrón Villanueva durante el periodo que fue estudiante de la Maestría en Ciencias Biológicas, bajo la Dirección de la Dr. Eduardo Cuevas García.

Morelia, Mich., a 27 de mayo de 2024



Biol. Sandra Penélope Barrón Villanueva _____



Dr. Eduardo Cuevas García _____

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, UMSNH

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el apoyo otorgado para financiar la presente investigación.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por brindarme las herramientas para continuar con mi formación académica.

Con profunda estima y agradecimiento, extendiendo mi más sincera gratitud a mi director de tesis, el Dr. Eduardo Cuevas García, ya que su asesoría y educación docente han sido esenciales en la dirección de esta investigación.

A mi comité sinodal, por compartir sus conocimientos y guiarme, sus aportaciones fueron esenciales para el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. María de los Ángeles Beltrán Nambo y a la Dra. Sandra Estefanía García Rueda, por su valioso tiempo y enseñanzas en laboratorio.

A mis colegas del laboratorio de Evolución de Sistemas Reproductivos en Plantas por toda su ayuda, enseñanzas y retroalimentación.

A mis padres y hermana, por estar dispuestos a acompañarme, apoyarme y alentarme. Gracias por ser ejemplo y pilar de fortaleza, su apoyo es invaluable. Este logro es también suyo, es nuestro.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	36
RECOMENDACIONES	42

CONCLUSIONES	43
LITERATURA CITADA	44
APÉNDICE	54

RESUMEN

El presente trabajo aborda el estudio de la biología reproductiva de *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae), una especie anual, carnívora con tamaño diminuto (~ 2 cm) distribuida ampliamente en el occidente de México. Esta especie presenta cleistogamia dimórfica, en la que se producen flores abiertas (Casmógamas o CH) y flores cerradas (Cleistógamas o CL) que se autopolinizan y se convierten directamente en fruto. La producción de ambos tipos de flores ocurre de manera simultánea y se pueden presentar en el mismo individuo. Los objetivos se centraron en evaluar en tres poblaciones la producción y proporción de ambos tipos de flores y su variación temporal. Se evaluó la proporción de flores CH y CL que se convierten en fruto, el número de semillas por fruto CH, CL y de autofecundación autónoma en flores CH y su tasa de germinación, así como analizar si existe relación entre el tamaño de la planta y la producción de ambos tipos de flores e identificar a los visitantes florales los cuales permanecen desconocidos para esta especie. El pico máximo de floración ocurrió entre septiembre y noviembre, se encontró una gran variación en el porcentaje de cleistogamia entre poblaciones y años de estudio, el cual osciló entre 23% y 99%. Se encontró correlación positiva significativa entre el tamaño de la planta y el número total de flores producidas por individuo, además se registró una correlación positiva significativa entre el tamaño de la planta y la producción de flores CH por individuo en las poblaciones de estudio. Se documentó una alta proporción de flores que se convierten en fruto (~90%) tanto de flores CH como CL durante los dos años de estudio. Se registró que las flores CH pueden autofecundarse de manera autónoma en ausencia de polinizadores. Las semillas de flores CH y CL en esta especie mostraron porcentajes de germinación variables entre años, con valores menores al 20%. Se reporta por primera vez tres visitantes florales para la especie. Los resultados obtenidos ponen en evidencia que la cleistogamia confiere ventaja en ciertas poblaciones ya que asegura el éxito reproductivo a pesar de la variación en las condiciones ambientales y de polinización. Son necesarios estudios futuros que evalúen poblaciones a lo largo de toda la distribución de la especie, para comprender cómo las condiciones bióticas y abióticas modifican la asignación de recursos en sistemas reproductivos mixtos como en el caso de la cleistogamia.

Palabras clave: Sistema reproductivo, dimorfismo floral, éxito reproductivo, cleistogamia.

SUMMARY

The present work addresses the study of the reproductive biology of *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae), an annual, carnivorous species with a tiny size (~ 2 cm) distributed widely in western Mexico. This species presents dimorphic cleistogamy, in which open flowers (Casmogamous or CH) and closed flowers that self-pollinate (Cleistogamous or CL) are produced. The production of both types of flowers occurs simultaneously and can occur on the same individual. The objectives focused on evaluating the production and proportion of both types of flowers and their temporal variation in three populations. The proportion of CH and CL flowers that become fruit were evaluated, in addition to the number of seeds per fruit (CH, CL and autonomous self-fertilization in CH flowers) and their germination rate, as well as analyzing whether there is a relationship between the size of the plant and the production of both types of flowers and identify floral visitors which remain unknown for this species. The maximum flowering peak occurred between September and November, a great variation was found in the percentage of cleistogamy between populations and years of study, which ranged between 23% and 99%. A significant positive correlation was found between the size of the plant and the total number of flowers produced per individual, in addition, a significant positive correlation was recorded between the size of the plant and the production of CH flowers per individual in the study populations. A high proportion of flowers turning into fruit (~90%) was documented for both CH and CL flowers during the two years of the study. It was recorded that CH flowers can self-fertilize autonomously in the absence of pollinators. CH and CL flower seeds in this species showed variable germination percentages between years (<20%). Three floral visitors are reported for the species. The results obtained show that cleistogamy confers an advantage in certain populations since it ensures reproductive success despite the variation in environmental and pollination conditions. Future studies are necessary that evaluate populations throughout the entire distribution of the species, to understand how biotic and abiotic conditions modify the allocation of resources in mixed reproductive systems as in the case of cleistogamy.

Keywords: Reproductive system, floral dimorphism, reproductive success, cleistogamy.

INTRODUCCIÓN

Diversidad en angiospermas y su relación con los sistemas reproductivos y de apareamiento

Las angiospermas constituyen un grupo que ha experimentado una impresionante radiación ecológica en el medio terrestre. La mayoría de los sucesos de divergencia en el grupo ocurrieron rápidamente en el periodo Cretácico a lo largo de ~5 millones de años, produciendo eventos de diversificación que dieron origen a la mayoría de las especies en el grupo (cerca de 400,000 especies) (Soltis *et al.* 2008; Sauquet, 2021). Las angiospermas han predominado en el medio terrestre desde el comienzo del Terciario (Magallón y Sanderson, 2001).

La diversificación en forma y función de las estructuras florales se encuentra asociada a la variedad de estrategias reproductivas y sistemas sexuales presentes en angiospermas (Barrett, 2009), así mismo, la complejidad y variación de las estructuras reproductivas está fuertemente relacionada con las características biológicas y ecológicas del grupo: inmovilidad, crecimiento modular, hermafroditismo y formación de carpelos cerrados (Barrett, 1998; 2009). Debido a su inmovilidad, las plantas con flor dependen de vectores para garantizar la polinización cruzada y, en consecuencia, la polinización biótica, la simetría floral y espolones con néctar contribuyen en la polinización especializada, y han sido propuestas como innovaciones claves en la diversificación del grupo (Crepet, 1984; Crane *et al.* 1995; Barrett, 2009; Van der Niet y Johnson, 2012; Serrano-Serrano *et al.* 2017).

La mayoría de las especies de angiospermas producen en la misma flor órganos reproductivos tanto femeninos (carpelos), como masculinos (estambres), los cuales están rodeados de estructuras estériles (perianto), y en general se encuentran próximos entre sí (Silva y Goring, 2001; Christopher *et al.* 2019). Esta conformación ha sido clave para explicar el gran éxito reproductivo en términos de dominancia ecológica en hábitats terrestres en angiospermas, porque ha facilitado la evolución de distintas estrategias de polinización que involucran vectores bióticos (Silva y Goring, 2001; Franklin-Tong, 2008).

Las características presentes en flores hermafroditas posibilitan la autofecundación (Hiscock y McInnis, 2003), por lo que algunas especies de plantas con flor han desarrollado numerosas estrategias de incompatibilidad para evitar la autofecundación sin perder el hermafroditismo, como en el caso de la dicogamia (separación de sexos en el tiempo), la hercogamia (separación de sexos en el espacio) y autoincompatibilidad genética (Sauquet, 2021). No obstante, la

autofecundación puede ser ventajosa en algunos casos, como cuando los polinizadores son escasos, por ejemplo, ya que proveen aseguramiento reproductivo además de facilitar la adaptación local (Kalisz y Vogler, 2003; Shivanna, 2015). Es probable que la forma más inusual de incrementar la posibilidad de autofecundación en flores hermafroditas es que las flores nunca abran (Sauquet, 2021).

Cleistogamia

La cleistogamia es uno de los polimorfismos más comúnmente presentes en plantas con flor, donde se originan fenotipos diferentes a partir de la misma composición genética, y es más probable que aparezcan en especies de ciclo de vida corto cuyo hábitat es variable en tiempo y espacio (Yang y Kim, 2016; Joly y Schoen, 2021). La cleistogamia, constituye un sistema de apareamiento el cual presenta flores que no abren y se autopolinizan (cleistógamas o CL). En la mayoría de las especies cleistógamas también se producen flores que abren y que pueden ser polinizadas por visitantes florales (casmógamas o CH; Culley y Klooster, 2007; Sauquet, 2021). Este sistema de apareamiento se ha descrito en al menos 50 familias, 228 géneros y 693 especies (Sauquet, 2021; Joly y Schoen, 2021; Culley y Klooster, 2007), ha llamado la atención de distintos botánicos desde el siglo XIX y el número de estudios que involucran especies cleistógamas se ha elevado drásticamente desde 1960 (Culley y Klooster, 2007). Sin embargo, en comparación con otros sistemas de apareamiento que han sido ampliamente estudiados, establecer conclusiones generales sobre el papel de los factores bióticos y abióticos sobre los rasgos reproductivos en especies cleistógamas puede resultar problemático, no solo porque la variación en el dimorfismo floral depende, hasta cierto punto, de factores bióticos y abióticos, sino también, porque esta variación ocurre dentro de poblaciones y entre individuos (Lord, 1981; Culley y Klooster, 2007; Oakley *et al.* 2007; Ansaldi *et al.* 2018; Ammarellou *et al.* 2021).

Las flores cleistógamas a menudo presentan una corola y androceo reducido, con un número menor de anteras y/o de menor tamaño, en comparación con las flores CH. Las flores CL son menos costosas debido a la disminución de órganos florales como la corola y el cáliz (Lord, 1981; Yang y Kim, 2016). En algunas especies, este tipo de flores puede carecer de atractivos florales como néctar y olor. Darwin propuso que este tipo de flores podrían ser capaces de producir muchas semillas a bajo costo en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de polinizadores (Lord, 1981). La fertilización en flores cleistógamas se realiza por transferencia directa de los granos de polen hasta el estigma sin intervención de polinizadores. De esta forma,

la cleistogamia se diferencia de sistemas asexuales como la apomixis, donde no se requiere doble fertilización para la formación de semillas (Culley y Klooster, 2007).

Las flores casmógamas a menudo son llamativas y más costosas debido a la inversión de energía en la producción de órganos florales, por ejemplo, pétalos para la atracción de polinizadores (Manivannan, 2020). Se asume que estas flores presentan polinización cruzada, además se producen cuando hay abundante disponibilidad de recursos y bajo condiciones de alta disponibilidad lumínica cuando los polinizadores tienen mayor actividad (Culley, 2002). La variación genética aumenta como resultado de los eventos de entrecruzamiento y, por lo tanto, hay mayor probabilidad de adquirir vigor híbrido y heterosis (Manivannan, 2020), aunque también se han reportado especies donde las flores CH se autopolinizan tardíamente de forma ocasional (Culley y Klooster, 2007).

La cleistogamia puede clasificarse en tres tipos diferentes dependiendo de la naturaleza reproductiva de las flores: i) Cleistogamia completa, ii) Cleistogamia dimórfica y iii) Cleistogamia inducida (Culley y Klooster, 2007; Manivannan, 2020).

- i) *Cleistogamia completa*: Se producen únicamente flores cleistógamas. Se ha reportado en diversas especies, particularmente en Poaceae y Orchidaceae. Para verificar que los individuos presentan cleistogamia completa se debe monitorear la fenología floral de múltiples individuos en condiciones silvestres para asegurarse que en ningún momento se forma una flor CH (Lord, 1981; Culley y Klooster, 2007).
- ii) *Cleistogamia dimórfica*: Se producen flores CL, así como flores CH en el mismo individuo. Las flores cleistógamas se caracterizan por presentar una reducción en el tamaño de la corola y/o estambres en comparación con las flores casmógamas. Esta categoría es la más comúnmente asociada a la cleistogamia en general (por ejemplo, en diversas especies del género *Impatiens* y *Viola*, ver Apéndice A) y la mayoría de los trabajos relacionados a la cleistogamia, hasta 1981, se han enfocado en especies con CL dimórfica (Lord, 1981; Culley y Klooster, 2007). Las flores cleistógamas y casmógamas pueden producirse secuencialmente en la misma temporada o pueden aparecer al mismo tiempo, pero en distintas posiciones de la inflorescencia o de la planta, como sucede en *Vigna minima* y *Amphicarpaea bracteata* las cuales producen flores casmógamas y cleistógamas aéreas, pero también flores cleistógamas subterráneas (Culley y Klooster, 2007). La capacidad para producir

flores CH y CL tiene una base genética que puede verse afectada por factores bióticos y abióticos, tales como la disponibilidad lumínica y de nutrientes, polinizadores y herbívoros (Culley y Klooster, 2007, Apéndice A.).

- iii) *Cleistogamia inducida*: También es conocida como cleistogamia ecológica o pseudocleistogamia. En este caso, el ambiente detiene el desarrollo de las flores CH previo a la antesis y provoca una falla mecánica de la flor al abrirse, lo que resulta en la producción de una flor CL, por lo que no existe diferencia morfológica entre flores CL y CH. En esta categoría, las condiciones desfavorables como bajas temperaturas y sequía promueven la producción de flores CL. Por ejemplo, en especies de *Portulaca* se producen flores CL en condiciones de bajas temperaturas y luminosidad. En diferentes especies de *Festuca* se producen flores CL en condiciones de baja temperatura y alta humedad relativa (Manivannan, 2020; Culley y Klooster, 2007).

La variación en la producción de flores, frutos y semillas durante todo el ciclo de vida en especies cleistógamas se ha asociado a factores bióticos y abióticos (Campbell *et al.* 1983; Jasieniuk, 1985; Le Corff, 1993, Apéndice A.). Estas investigaciones se han centrado en pocos taxones como en los casos particulares de *Impatiens capensis* (Simpson *et al.* 1985), *Oxalis acetosella* (Berg y Redbo-Torstensson, 1998) *Viola pubescens* (Culley, 2002), *Danthonia spicata* (25% de las flores en 40 poblaciones de estudio fueron CL), en *Danthonia compressa* (50% de CL en 2 poblaciones) (Clay, 1983), en *Triplasis purpurea* (70% de CL) (Cheplick, 1996), *Triodanis perfoliata* (entre el 45% a 98% de CL en 14 poblaciones) (Ansaldi *et al.* 2018), *Impatiens noli-tangere* (en 5 poblaciones de estudio el % CL varió entre 10-100%) (Masuda y Yahara, 1994).

Frutos y semillas

Los frutos y semillas provenientes de flores CL pueden diferir de los frutos y semillas de flores CH en tamaño, biomasa, forma, cantidad, viabilidad, número de óvulos, entre otros (Schoen y Lloyd, 1984; Redbo-Tortensson y Berg, 1995; Berg, 2000; Berg, 2003; Lerner *et al.* 2008). En consecuencia, la producción de flores CH y CL en especies cleistógamas podría tener un impacto variable en la adecuación de la progenie. Así, por ejemplo, las flores CL presentan un menor gasto energético en comparación con las flores CH, ya que carecen de atractivos y recompensas para la polinización, como polen, néctar y pétalos, por lo que estos recursos pueden

reassignarse a la producción de mayor cantidad de semillas, semillas más grandes o con una alta viabilidad (Schoen y Lloyd, 1984; Waller, 1984; Sun, 1999; Culley y Klooster, 2007).

A pesar de que teóricamente se predice que la progenie que proviene de eventos de entrecruzamiento (CH) tiene mayor vigor, en comparación con la progenie de flores CL, debido a que se evita la depresión por endogamia, se han reportado importantes ventajas en el desempeño de frutos y semillas de flores CL (Redbo-Torstensson y Berg, 1995; Lerner *et al.* 2008), tales como menor costo energético o una mayor cantidad de semillas (Waller, 1984). Por ejemplo, en *Oxalis acetosella*, la proporción de frutos producidos de flores CH fue menor y más variable entre sitios de estudio en comparación con el de flores CL. En *Lithospermum carolinense*, los frutos de flores CL producen en promedio 3.4 veces más semillas, en comparación con los frutos de flores CH (Levin, 1972), al igual que en *Collomia grandiflora* (Ellstrand *et al.* 1984), *Viola hirta* (Redbo-Torstensson y Berg, 1995), *Oxalis montana* (Jasieniuk y Lechowicz, 1987) y *Oxalis acetosella* (Berg y Redbo-Torstensson, 1998).

Germinación en especies cleistógamas

En 252 estudios de germinación de semillas de flores CH y CL realizados en 29 especies, 21 géneros y 11 familias de angiospermas, se encontró que las semillas CL tienen porcentajes más altos de germinación, en comparación con las semillas CH, lo cual podría indicar que la producción de estructuras CL resulta ventajosa en estas especies (Baskin y Baskin, 2017). En el caso particular de *Lespedeza cuneata* y *Dichanthelium clandestinum*, se registró que la viabilidad fue igual en los dos tipos de semillas, no obstante, las semillas CL presentaron tasas más altas de germinación (Bell y Quinn, 1983; Schutzenhofer *et al.* 2007). De manera similar en *Danthonia spicata*, en condiciones experimentales, las semillas CL germinaron en menor tiempo que las semillas CH, mientras que, en poblaciones naturales ambos tipos de semillas germinaron rápidamente y las semillas CH presentaron un porcentaje alto de germinación (Clay, 1983). En contraste, en algunas especies de los trabajos publicados a la fecha, se han observado resultados opuestos, donde las semillas CL presentan una baja tasa de germinación en comparación con semillas CH. Este es el caso de *Viola mirabilis*, *V. riviniana* (Berg y Redbo-Torstensson, 1999) y *Microstegium vimineum* donde las semillas CL no solo presentaron menores tasas de germinación, lo cual fue variable entre años, sino una menor viabilidad en comparación con semillas CH (Huebner, 2011).

Factores bióticos y abióticos asociados a la cleistogamia

La cleistogamia es un mecanismo complejo influenciado no solo por las características genéticas de los individuos sino por factores bióticos y abióticos (Campbell *et al.* 1983; Le Corff, 1993, Apéndice A). Diversos estudios han demostrado que la proporción de flores producidas por un individuo puede modificarse por factores como el fotoperiodo (Le Corff, 1993; Mattila y Salonen, 1995; Imaizumi *et al.* 2008; Munguía-Rosas *et al.* 2012; Colbert, 2015; Park *et al.* 2022), la temperatura (Morinaga *et al.* 2008; Jones *et al.* 2013; Koike *et al.* 2015), la humedad del suelo (Harlan, 1945; Brown, 1952; Ranua y Weinig, 2010; Sternberger *et al.* 2020), el tamaño de la planta (Diaz y MacNair, 1998; Wilken, 1982), la densidad de individuos (Schmitt *et al.* 1987; Levin, 1972; Benenati, 2000), la disponibilidad de nutrientes (Le Corff, 1993; Park *et al.* 2022), las condiciones de polinización (Munguía-Rosas, *et al.* 2015; Ansaldi *et al.* 2018), la herbivoría (Munguía-Rosas, *et al.* 2015), entre otros. Establecer patrones generales sobre el papel que juegan los factores que influyen en la variación de rasgos reproductivos en especies CL puede resultar problemático. Por ejemplo, la humedad en el suelo puede interactuar con otros factores que influyen en la cleistogamia, como las abundancias de los polinizadores (Ansaldi *et al.* 2018). En el caso de *Calathea micans* la producción de flores CH está ambientalmente determinada por la luz y la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de la planta, ya que al presentar un mayor tamaño pueden invertir en estructuras más costosas (ej. pétalos más grandes o llamativos) para el entrecruzamiento (Le Corff, 1993). Los estudios que se han centrado en la variación de la asignación de recursos en especies cleistógamas, apoyan la hipótesis de que los sistemas reproductivos en plantas presentan gran plasticidad y pueden verse afectados por las condiciones ambientales. Sin embargo, estos estudios cubren un rango geográfico limitado y siguen existiendo grandes interrogantes sobre la variación de rasgos reproductivos entre poblaciones de especies cleistógamas y los factores bióticos y abióticos que impulsan esta variación (Ansaldi *et al.* 2018).

En la presente investigación se abordó el estudio de la biología reproductiva en una especie anual, carnívora con cleistogamia dimórfica del género *Pinguicula*. Se siguió detalladamente el ciclo de vida durante dos años consecutivos en donde se documentó la producción y proporción de flores CH y CL, la proporción de frutos de cada tipo de flor, su número de semillas y su tasa de germinación. Finalmente, se analizó la relación del tamaño de la planta con la producción de flores, además de identificar a los visitantes florales, los cuales permanecen desconocidos para esta especie.

JUSTIFICACIÓN

La cleistogamia proporciona un sistema comparativo único para comprender los procesos de desarrollo que conducen a distintas morfologías florales en los sistemas reproductivos en plantas con flor. *Pinguicula crenatiloba* es un excelente sistema de estudio para comprender el fenómeno de la cleistogamia, al ser una especie anual, por lo que es posible evaluar todo el ciclo de vida de las plantas en condiciones naturales, ya que hasta la fecha se han publicado pocos estudios que examinen detalladamente la producción de ambos tipos de flores, frutos y semillas, lo cual es esencial para la comprensión de la variación de rasgos reproductivos en especies cleistógamas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar y comparar la producción de flores cleistógamas y casmógamas a lo largo de todo el ciclo reproductivo de *Pinguicula crenatiloba* entre distintas poblaciones y años, así como la producción de frutos y semillas de cada tipo de flor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Estimar la producción de flores (CH y CL) durante todo el ciclo de vida de *Pinguicula crenatiloba* en tres poblaciones durante dos años y determinar la relación entre el tamaño de la planta y la producción de flores.
- ii. Determinar el éxito reproductivo estimado como la proporción de flores que se convierten en fruto, número de semillas por fruto y tasa de germinación de semillas provenientes de frutos producidos a partir de flores CH, CL, así como de flores CH producto de autofecundación autónoma.
- iii. Identificar a los visitantes florales y potenciales polinizadores de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de estudio

El género Pinguicula

Pinguicula crenatiloba, pertenece a la familia Lentibulariaceae, la cual está conformada por tres géneros: *Genlisea*, *Utricularia* y *Pinguicula* (Zamudio, 2006). El género *Pinguicula* está conformado por poco más de 119 especies distribuidas en Eurasia, América del Norte y del Sur, el Caribe y Marruecos. En México se encuentran poco más de 45 especies, de las cuales el 90% son endémicas (Legendre, 2000; Shimai *et al.* 2021; Domínguez *et al.* 2024).

Las especies del género son plantas carnívoras, capaces de atraer, atrapar, digerir y absorber nutrientes de presas como pequeños dípteros y áfidos (Apéndice B) (Fleischmann, 2021; Legendre, 2000; Zamudio, 2005). La carnivoría en *Pinguicula* se basa en la presencia de dos tipos de glándulas: sésiles y pedunculadas. El número de glándulas varía dependiendo de la especie, también se pueden encontrar en los pedúnculos florales, en la flor o los sépalos (Legendre, 2000). Las glándulas pedunculadas secretan un mucílago pegajoso que es responsable de atrapar a las presas, solo juegan un papel menor en la digestión, que se lleva a cabo principalmente por las glándulas sésiles, en las cuales se sintetizan enzimas hidrolíticas que se almacenan hasta la captura de la presa (Vassilyev y Muravnik, 1988).

Las especies del género son terrestres, litófitas o raramente epífitas (Shimai *et al.* 2021), presentan un tallo corto que da lugar a una roseta de hojas ovadas que yacen planas en el suelo u oblicuamente hacia arriba, las cuales varían en tamaño desde un par de centímetros hasta 30 cm de diámetro (Grob *et al.* 2007; Legendre, 2000). Algunas especies del género son anuales, mientras la mayoría de ellas son perennes y dependiendo de su ciclo de crecimiento se pueden clasificar en especies tropicales y templadas, sólo se diferencian por la presencia o ausencia de un brote llamado hibernáculo, el cual es subterráneo y permite la supervivencia durante las condiciones invernales (Domínguez *et al.* 2024). Para ambos tipos de crecimiento, las hojas de las rosetas pueden ser similares (homófilas) o diferentes (heterófilas) definiendo así cuatro grupos distintos de especies (Homófilas de crecimiento templado y tropical, heterófilas de crecimiento templado y tropical) (Legendre, 2000).

El tamaño de población en cada microhábitat suele ser pequeño y disperso, la temperatura media mensual es uno de los factores que restringe la distribución de las especies del género (Shimai *et al.* 2021). Se ha reportado que son autocompatibles y pueden ser autógamas o xenógamas, es

decir que solo se polinizan entre plantas distintas, en su mayoría polinizadas por dípteros e himenópteros (Molano-Flores *et al.* 2018). Las especies del género de Centroamérica y México se caracterizan por una enorme diversidad en el tamaño y color de las flores y son polinizadas por mariposas, moscas, abejas y colibríes. Los tricomas florales juegan un papel clave en la interacción planta-polinizador (Lustofin *et al.* 2023). Se conoce poco sobre la fenología reproductiva y ecología del género *Pinguicula* y en la actualidad se siguen reportando descripciones de nuevas especies a nivel mundial, la mayoría distribuidas en Europa, México y Cuba (Benavente-Romo y Sandoval-Ortega, 2021; Shimai *et al.* 2021).

Pinguicula crenatiloba presenta un ciclo de vida anual con un solo tipo de hojas (homófilas), de hábito carnívoro (Fig. 1 E, F) (Zamudio, 2005). Se distribuye ampliamente en la parte occidental de la República Mexicana (desde Sonora hasta Chiapas) y en Centroamérica hasta Panamá (Zamudio, 2005). Se ha reportado que la floración ocurre de agosto a febrero, y el pico máximo de floración se presenta entre septiembre y octubre. Crece sobre taludes rocosos húmedos y suelos arcillosos rojizos o café-rojizos, derivados de rocas ígneas extrusivas en altitudes de 700 a 1700 m (Hernández y Zamudio, 2017; Espinosa-Matías *et al.*, 2005).

La especie presenta una roseta laxa conformada por 4 (6-8) hojas membranáceas de 5-14 mm de largo por 3-8 mm de ancho (Zamudio, 2005). Las flores de *P. crenatiloba* se caracterizan por presentar una corola blanca bilabiada, con el labio inferior más corto que el superior, con paladar y una mancha amarilla en la base del labio inferior, miden de 3-7 mm de largo incluyendo el espolón con forma cilíndrica (Fig. 1 B, C). Los pedúnculos florales miden de 15-75 mm de largo. El fruto es una cápsula globosa, de 1.5 a 2.5 mm de diámetro con semillas ovoides verrugosas, de 0.3 a 0.5 mm de largo, por 0.12 a 0.15 mm de ancho. En *P. crenatiloba*, las semillas maduras miden 0.33-0.50 mm de largo, por 0.12-0.15 mm de ancho (Zamudio, 2005). Recientemente se reportó la presencia de cleistogamia dimórfica en dos poblaciones de *Pinguicula crenatiloba*, siendo el primer reporte de este fenómeno en el género. Se registró que una sola planta puede producir simultáneamente flores CH y CL, y durante todo el ciclo de vida se producen de 1 a 6 flores por individuo. En la actualidad se desconocen los polinizadores o visitantes florales de *P. crenatiloba* (Barrón, 2021).

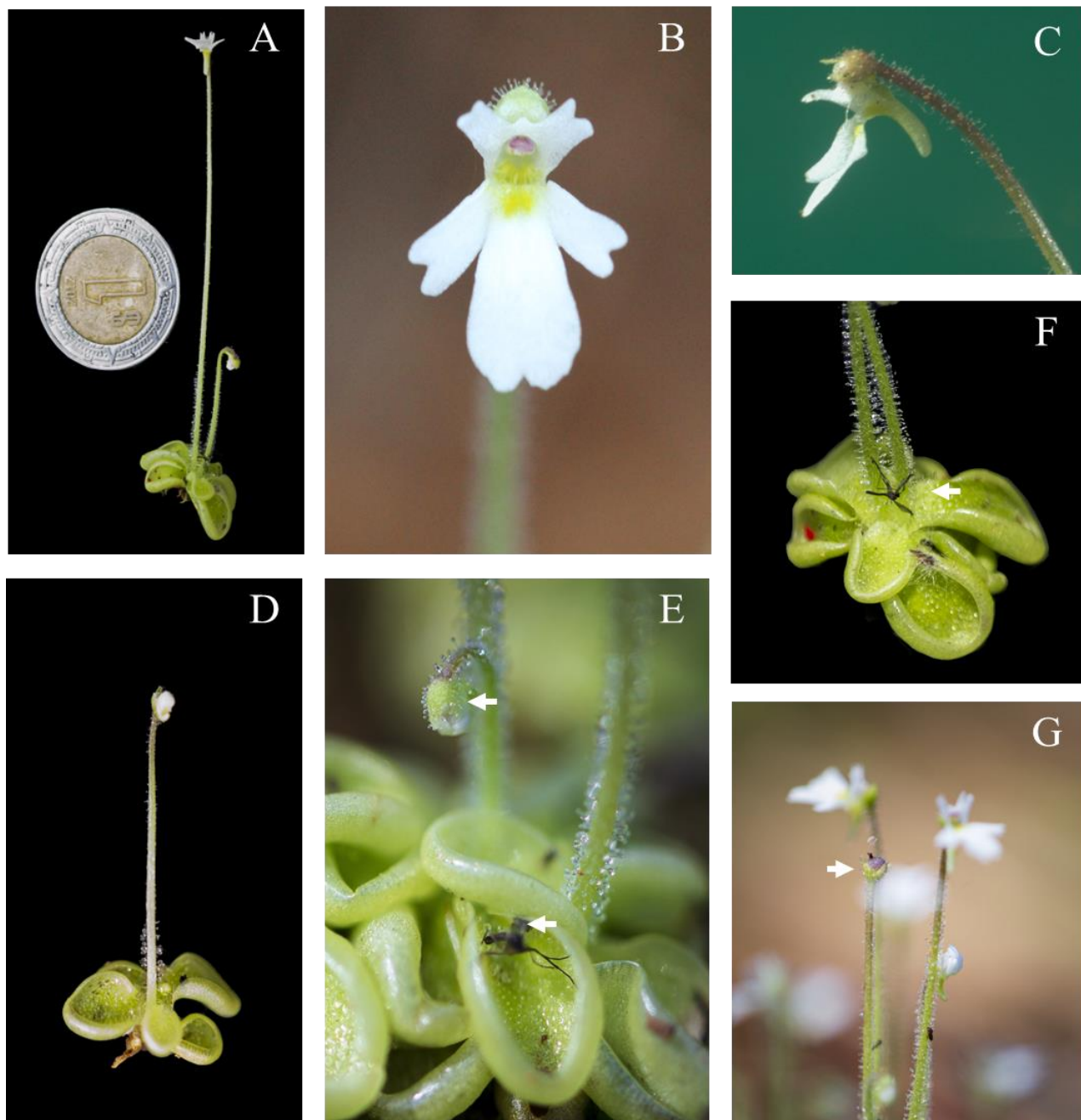


Figura 1. *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae). **A.** Flor casmógama (CH). **B.** Vista frontal de flor casmógama con corola bilabiada. **C.** Pedúnculo y espolón de flor CH. **D.** Flor cleistógama (CL). **E.** Vista lateral de flor CL emergiendo, se observa una presa capturada en las hojas de la roseta. **F.** Captura de presa en hojas de la roseta, se observan glándulas pedunculadas en la superficie de las hojas y el pedúnculo floral. **G.** Fruto. **Fotografías por:** Arturo Tavera y Sandra Barrón.

Sitios de estudio

Se seleccionaron tres poblaciones de estudio ubicadas en el estado de Michoacán, las cuales se encuentran en zonas perturbadas por causas antrópicas como aprovechamiento forestal maderable, extracción de musgo y heno, pastoreo, senderismo, actividades físicas y recreativas, entre otras. La primera población está situada en Morelia, se caracteriza por un clima templado subhúmedo y tipo de suelo franco; la segunda en Pátzcuaro con clima templado húmedo con lluvias todo el año y suelo franco arcilloso, y la tercera en Uruapan con clima templado húmedo y subhúmedo con lluvias en verano y suelo arcilloso (Tabla 1, Apéndice D). La distancia entre las poblaciones es de 50 a 100 kilómetros entre sí.

Tabla 1. Poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> consideradas en el estudio					
Población	Estado	Altitud	Coordenadas	Tipo de vegetación	Clima
Morelia	Michoacán	2,049 msnm	19°38'8"N, 101°15'23"OE	Bosque de encino	Templado subhúmedo
Pátzcuaro		2,300 msnm	19°31'55.5"N 101°36'07.2"OE	Bosque reforestado de pino	Templado húmedo con lluvias todo el año
Uruapan		1,748msnm	19° 27' 13"N, 102° 2' 30" O	Bosque reforestado de pino	Templado húmedo y subhúmedo con lluvias en verano
Fuente: Huerto y Vargas (2014). IMPLAN (2020).					

Producción de flores y su relación con el tamaño de la planta

Se marcaron 30 individuos al azar en cada población de estudio durante 2022 y 2023. Puesto que el tamaño de las plantas, y por lo tanto de las flores, es muy pequeño, la estimación de la producción y proporción de flores, así como la variación temporal en la producción de los diferentes tipos de flor por año de estudio, se realizó mediante una secuencia fotográfica (Cámara Sony Alpha 200 con un lente DT 50 mm F1,8 SAM). Las fotos se tomaron a cada individuo durante visitas semanales en cada sitio a lo largo de todo el periodo reproductivo (agosto-febrero), posteriormente se agruparon en una carpeta por individuo en orden cronológico, teniendo así una secuencia detallada de todo el ciclo de vida de donde se obtuvo el número total de flores de cada tipo, las cuales se diferencian por el tamaño de la corola, y se registró el momento en que emergían, evitando contar dos veces la misma flor en cada individuo. Se obtuvo el número total de flores a nivel individual/ poblacional, además de la proporción de cada tipo de flor y la producción promedio por individuo en cada año de estudio. Se estimó el promedio de flores por individuo en cada fecha de muestreo para conocer la variación temporal de éstas entre poblaciones y entre años. Se estimó el tamaño de la planta como un promedio del diámetro del ancho de la roseta de cada individuo marcado en las diferentes poblaciones y años de estudio usando un vernier digital.

La producción de flores CH se comparó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar los efectos de las variables categóricas de la población y año de estudio usando el tamaño de la planta y el número de flores como variables numéricas. Los datos de conteo de flores fueron transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad. Al explorar los datos del tamaño de la planta con la producción de flores CL no se encontró una correlación significativa, por lo que se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). El modelo incluye el efecto de las variables categóricas de la población, año de estudio y la interacción población-año. Los datos de conteo de flores fueron transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad.

El tamaño de la planta se comparó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). El modelo incluye el efecto de las variables categóricas de la población, el año y la interacción población-año. Posteriormente se llevó a cabo una comparación múltiple de medias (Tukey). El análisis se realizó en R versión 4.1.3, (R Core Team, 2022).

Se analizó la relación entre el tamaño de la planta y la producción de flores por individuo (CH, CL y No. Total de flores), el número de flores se obtuvo a partir del registro fotográfico antes

mencionado. Se realizó un análisis de correlación de Pearson con los datos de la producción de flores de cada tipo de ambos años de estudio de las tres poblaciones de la especie. Los datos de conteo de cada tipo de flor fueron transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad.

Éxito reproductivo

A partir de la secuencia fotográfica en orden cronológico antes mencionada, se siguió la proporción de flores que se convierten en fruto (Fruit Set), dividiendo el número de frutos por individuo entre el número de flores totales producidas por individuo, además, se estimó la proporción de frutos de cada tipo de flor (CH, CL). Posteriormente se calculó el promedio de los frutos provenientes de cada tipo de flor y por año de estudio. La producción de frutos provenientes de flores CH se comparó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar los efectos de las variables categóricas de la población y año de estudio usando el tamaño de la planta, y número de frutos (transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad) como variables numéricas. Al explorar los datos del tamaño de la planta con la producción de frutos de flores CL no se encontró una correlación significativa, por lo que se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). El modelo incluye el efecto de las variables categóricas de la población, año de estudio y la interacción población-año. El análisis se realizó en R versión 4.1.3, (R Core Team, 2022). Los datos de conteo del número de frutos fueron transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad .

Se evaluó el número promedio de semillas que producen las flores casmógamas (CH), cleistógamas (CL) y flores CH de autofecundación autónoma (AA). Con este fin, se seleccionaron al azar 20 botones florales en desarrollo de cada tipo durante 2022 y 2023, únicamente en Uruapan, la población que presenta una mayor cantidad de flores CH y un mayor tamaño poblacional. Los botones florales CH se distinguen de los CL por la presencia de pétalos y espolón bien diferenciado antes de la apertura de la flor. En el caso de las flores CL, los pétalos presentan un tamaño muy reducido y únicamente el cáliz es visible.

Las flores CH y CL de polinización natural se marcaron con un cordón de color distintivo y se siguió el desarrollo en campo hasta la maduración del fruto, posteriormente se colectaron individualmente en una bolsa de papel de estraza y se almacenaron en una bolsa plástica resellable con gel de sílice. Para las flores CH de autofecundación autónoma (AA), se seleccionaron flores CH en proceso de apertura y se marcaron con un cordón de color distintivo para después colocar una red de tergal francés de 4 cm de ancho por 6 cm de largo anclada al

suelo con ayuda de pequeños alambres en forma de “V” para cubrir toda la planta e impedir el paso de posibles polinizadores o visitantes florales. Se siguió el desarrollo en campo hasta la maduración del fruto, posteriormente se colectaron individualmente en una bolsa de papel de estraza y se almacenaron en una bolsa plástica resellable con gel de sílice, hasta su análisis en laboratorio. Las semillas de los distintos tratamientos se contabilizaron bajo microscopio estereoscópico con ayuda de una aguja de disección, una pinza de disección curva y un contador de mano, se almacenaron por tratamiento en cajas de Petri selladas con papel Parafilm.

La producción de semillas provenientes de flores CH, CL y AA se comparó mediante un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), el modelo incluyó el efecto de las variables categóricas del año, el origen de la semilla y la interacción entre ambos. Los datos de número de semillas fueron transformados a raíz cuadrada para alcanzar la normalidad. Posteriormente se llevó a cabo una comparación múltiple de medias (Tukey). Los análisis se realizaron en R versión 4.1.3, (R Core Team, 2022) .

Se llevaron a cabo pruebas de germinación *in vitro* con semillas de flores casmógamas (CH), cleistógamas (CL) y de tratamientos de autofecundación autónoma (AA) durante el 2023; en el año 2022 únicamente se realizaron pruebas con semillas CH y CL. Las semillas se esterilizaron por inmersión en tubos Eppendorf en una solución de etanol al 96% en agitación por vórtex por 5 minutos, en seguida se transfieren con ayuda de una micropipeta de 200 µl a una solución de hipoclorito de sodio comercial al 20% en agitación por vórtex durante 7 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada esterilizada tres veces, conservando el líquido del último lavado para facilitar la siembra debido al reducido tamaño de las semillas (Martínez, 2017; Gonçalves *et al.* 2008). Las pruebas se realizaron en cajas de Petri con 30 ml de medio de cultivo MS comercial (Murashige y Skoog, ver Apéndice C) reducido a 1/4 de concentración (Annis, 2013; Pérez-Sánchez, 2017; Grevenstuk y Romano, 2012), el cual se esterilizó previamente a 120°C por 20 minutos, con un pH ajustado a 5.7 (Gonçalves *et al.* 2008). La siembra se realizó con una micropipeta de 200 µl, en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Se preparó una caja de Petri por cada tipo de semilla, y se colocaron 100 semillas por caja. Después de la siembra se contaron las semillas depositadas en el medio de cultivo con un microscopio estereoscópico y un contador de mano. Las cajas de Petri se incubaron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad, a 22°C y con 80% de humedad. Se

monitorearon cada tres días durante 30 días para evaluar el porcentaje de germinación de cada tipo de semilla.

Visitantes florales

Se seleccionó la población con mayor proporción de flores CH (Uruapan) para llevar a cabo observaciones directas por un periodo de 2 a 3 horas por visita, entre las 9:00 y 14:00 horas de septiembre a diciembre durante los años 2022 y 2023.

Se realizaron filmaciones para identificar los posibles polinizadores en la población con mayor proporción de flores CH (Uruapan) con cámaras Sony (Handycam DCR-SR20) entre las 9:00 y 14:00 horas. Las cámaras se colocaron de tal forma que se incluyera la mayor cantidad de flores posibles. Las grabaciones se llevaron a cabo por un total de 9 horas divididas en 4 visitas de septiembre a noviembre durante 2022 y un total de 3 horas divididas en dos visitas en septiembre y octubre para el año 2023.

Se examinó material complementario correspondiente a 32 horas de filmación de flores casmógamas grabadas a finales del mes de septiembre de 2021 en Uruapan, Michoacán. Las filmaciones se realizaron en dos visitas a la población de estudio.

RESULTADOS

Producción de flores

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la producción de flores CH y CL entre poblaciones, entre años, y en la interacción población-año (Tabla 2,3), lo cual indica que dentro de las poblaciones la producción de los diferentes tipos de flor fue distinta entre años de estudio. Se encontraron diferencias significativas en la producción de flores CH y el tamaño de la planta entre poblaciones (Tabla 2), en comparación con las flores CL en las cuales no se detectó un efecto del tamaño de la planta en la producción de este tipo de flor (Tabla 3).

Tabla 2. Resultados de la comparación del número de flores casmógamas (CH) entre años en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) mediante un Análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando el tamaño de la planta como covariables					
Flores CH					
	Suma de cuadrados	Media cuadrada	G.L.	F	Prob>F
Población	34.57	17.28	2	59.978	<0.000
Año	6.51	6.506	1	22.576	<0.000
Tamaño planta	10.91	10.915	1	37.875	<0.000
Población *Año	5.32	2.659	2	9.227	<0.000
Población*Tamaño planta	2.88	1.441	2	5.001	<0.001
Residuales	49.28	0.288	171		

Tabla 3. Resultados de la comparación del número de flores cleistógamas (CL) entre años en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) mediante un Análisis de varianza (ANOVA)					
Flores CL					
	Suma de cuadrados	Media cuadrada	G.L.	F	Prob>F
Población	10.72	5.361	2	23.902	<0.000
Año	0.96	0.963	1	4.293	<0.01
Población*Año	6.37	3.186	2	14.207	<0.000
Residuales	39.02	0.224	174		

La producción de flores CH fue más variable entre años en Uruapan y Pátzcuaro, con respecto a las flores CL, su producción fue muy similar entre poblaciones y años de estudio. En Morelia se observaron valores de cleistogamia por arriba del 90% en los dos años de estudio (Fig. 2 A). En Uruapan se encontró la menor proporción de flores CL con valores por debajo del 60% y se registró la producción promedio más alta de flores CH por individuo en los dos años de estudio, en comparación con Morelia y Pátzcuaro, en las cuales se observaron valores promedio por debajo de 1 para ambos años (Fig. 2 B). En contraste, la producción promedio de flores CL por individuo fue superior a dos en todas las poblaciones y años de estudio, exceptuando la población de Uruapan durante 2023.

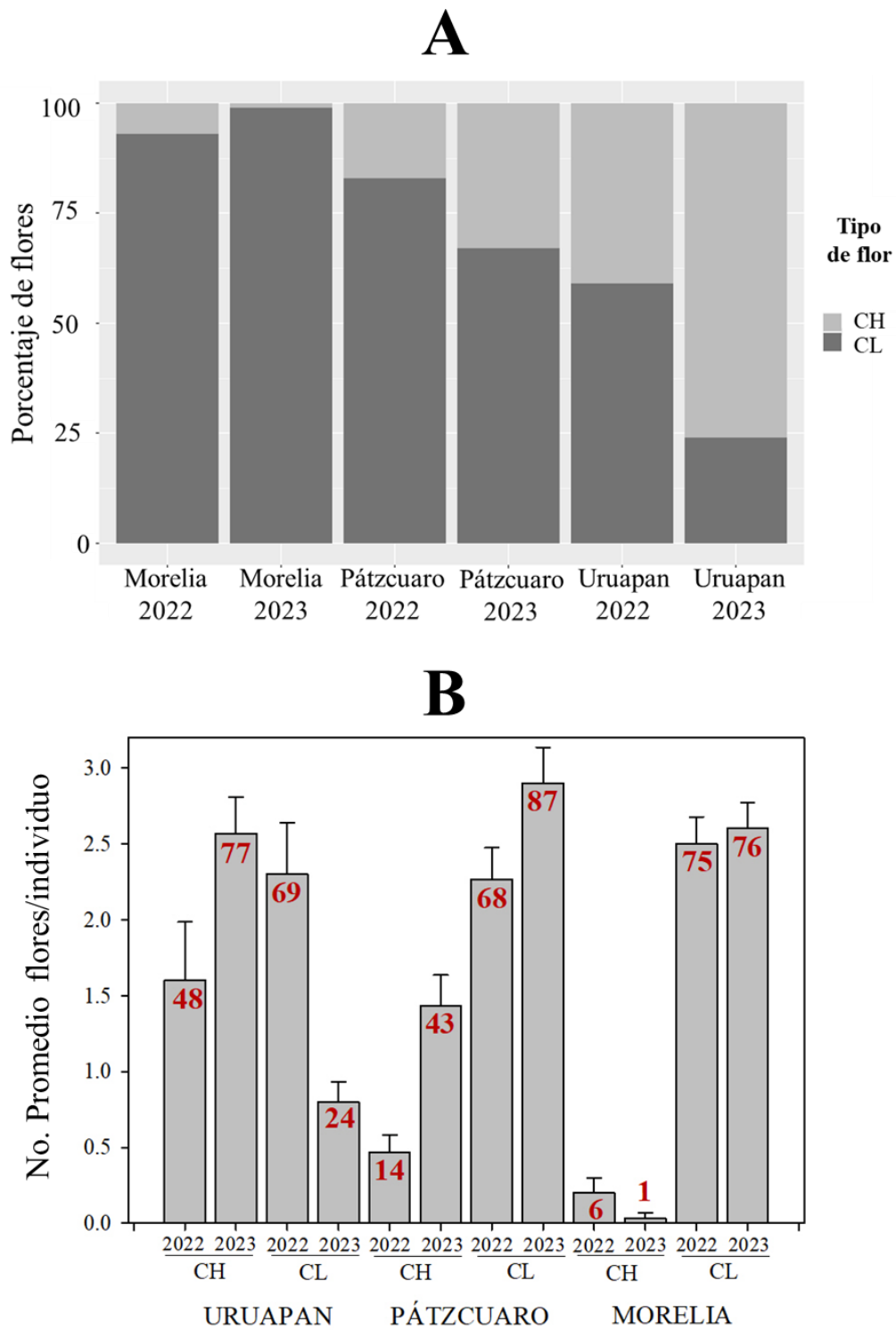


Figura 2. Producción de flores cleistógamas y casmógamas en tres poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae) durante dos años de estudio. **A.** Porcentaje de flores. **B.** Promedio de flores producidas por individuo. En rojo se muestra el total de flores producido a nivel poblacional.

El periodo de vida de las plantas, de manera general, ocurrió de septiembre a diciembre donde se registró una producción simultánea de flores CH y CL en todas las poblaciones y años de estudio, el periodo reproductivo culminó con flores CL en todos los casos. El pico máximo de floración se registró entre septiembre y octubre en ambos años de estudio (Fig. 3). Se documentó un ligero desfase en el pico de floración entre años y poblaciones, debido a que en 2022 comenzó alrededor de septiembre y octubre, mientras que para 2023 ocurrió entre octubre y noviembre. Durante 2022 la producción de flores CH fue más evidente a finales de septiembre y principios de octubre en todas las poblaciones, mientras que en 2023 ocurrió a mediados de octubre y principios de noviembre. En contraste, los picos máximos de floración CL se registraron en el transcurso del mes de octubre para todas las poblaciones y años.

Uruapan presentó el periodo reproductivo más prolongado de todas las poblaciones de estudio, donde la floración concluyó a mediados de diciembre, a diferencia de Pátzcuaro donde terminó a finales de noviembre y en Morelia, a finales de octubre para 2022 y finales de noviembre para 2023. En Morelia, el área de estudio que presentó un menor tamaño de población (30 a 50 individuos, Obs. Pers.) en comparación con Uruapan y Pátzcuaro, se produjeron muy pocas flores abiertas por individuo (CH) (Fig. 3 C). Los picos de floración CL en esta población fueron muy similares entre los dos años de estudio, y se centraron entre septiembre (2022) y octubre (2023).

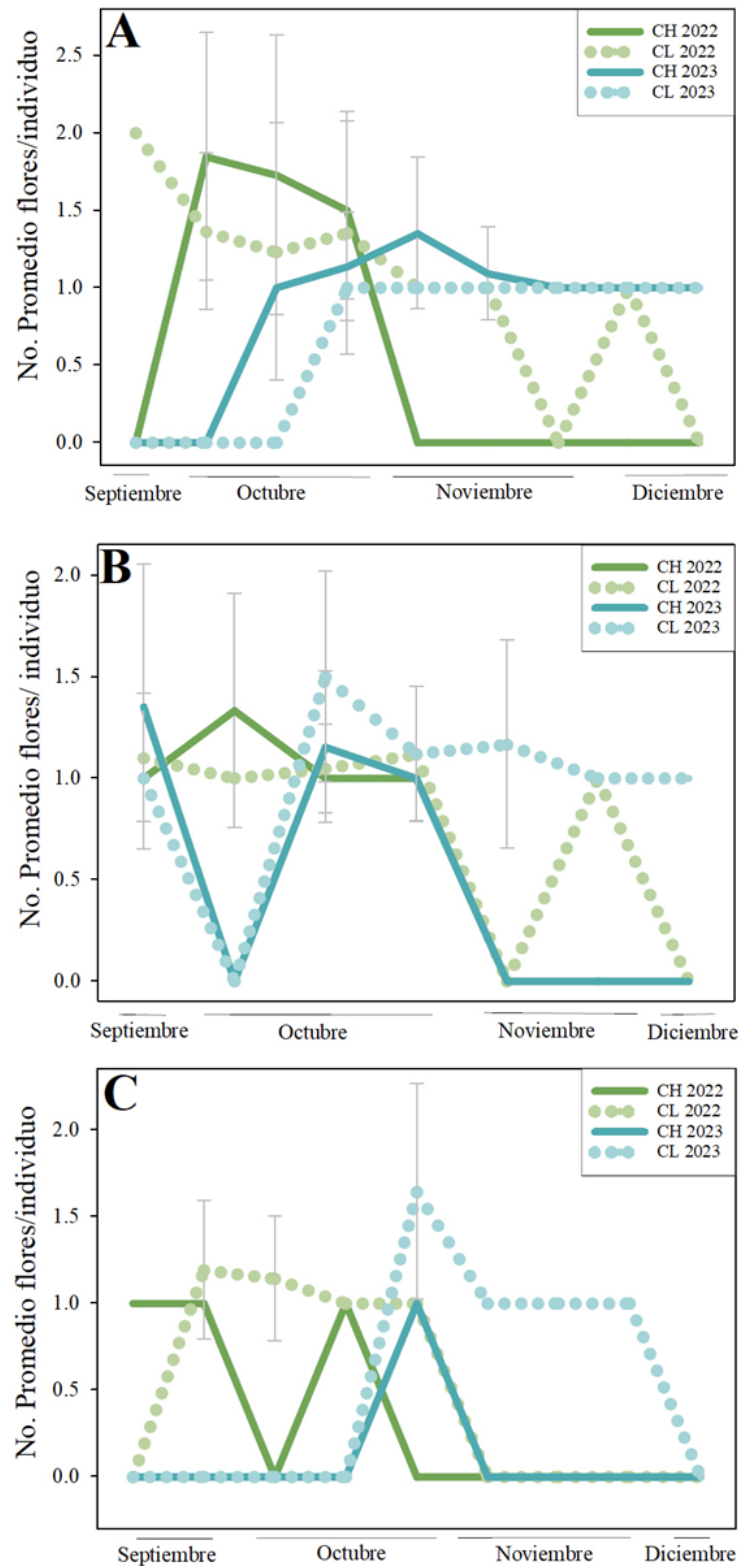


Figura 3. Variación temporal en la producción de flores cleistógamas y casmógamas por individuo en tres poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae) durante dos años de estudio. **A.** Uruapan. **B.** Pátzcuaro. **C.** Morelia. Las fechas de muestreo pueden cambiar debido a que no se realizaron en los mismos días entre poblaciones. Se muestran únicamente individuos que produjeron flores.

El diámetro promedio de la planta fue significativamente menor en Morelia, la población con mayor porcentaje de cleistogamia, respecto a Pátzcuaro y Uruapan (Fig. 4). Además, en la población de Pátzcuaro hubo diferencias entre años (Fig. 4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la planta entre poblaciones, entre años y entre años dentro de poblaciones (Tabla 4).

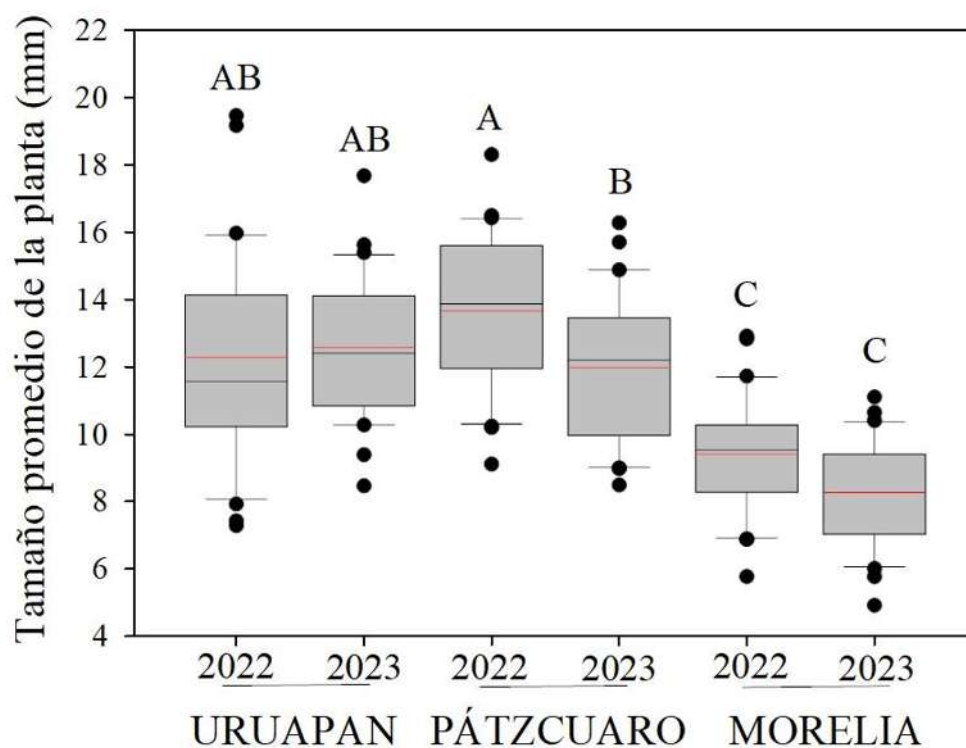


Figura 4. Tamaño promedio de la planta en poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae). El promedio se muestra como una línea roja y la media como una línea negra. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

Tabla 4. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Comparación del tamaño de la planta en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) durante dos años de estudio					
	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	G.L.	F	Prob>F
Año	32.0	32.03	1	6.871	<0.001
Población	578.0	288.98	2	61.999	<0.000
Población*Año	31.1	15.57	2	3.340	<0.01
Residuales	811.0	4.66	174		

Los análisis de correlación de Pearson entre el tamaño de la planta y el número de flores totales (CH+CL) por individuo mostraron una relación positiva significativa en Pátzcuaro (2022), Morelia (2022 y 2023) y en Uruapan durante 2022 (Fig. 5), lo cual pone en evidencia que conforme incrementa el tamaño de la planta aumenta el número de flores producidas por individuo.

Con respecto a las flores casmógamas (CH), únicamente se encontró una correlación positiva significativa entre el tamaño de la planta y este tipo de flor en la población de Uruapan durante 2022 ($R^2=0.43$, $P<0.001$, Fig. 5). Finalmente, se encontró correlación positiva significativa entre el tamaño de la planta y el número de flores cleistógamas (CL) por individuo en la población de Morelia durante 2023 ($R^2=0.17$, $P<0.01$, Fig. 5).

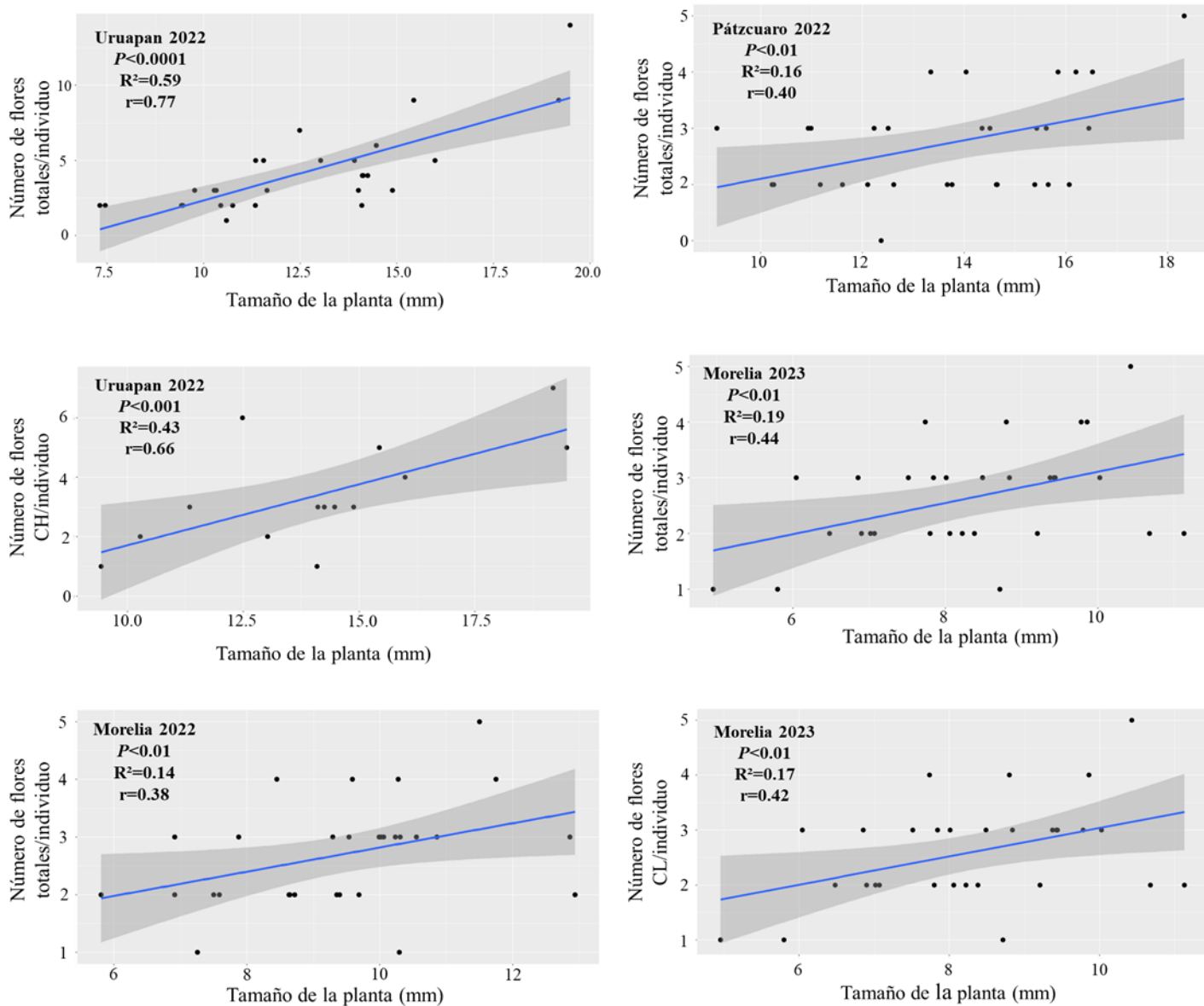


Figura 5. Análisis de correlación de Pearson entre el tamaño de la planta y el número de flores totales, CH y CL producidas por individuo en tres poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* durante 2022 y 2023. Se muestran intervalos de confianza del 95%. Se presentan solo resultados estadísticamente significativos. Los datos del número de flores por individuo se presentan sin transformar a raíz cuadrada.

Éxito reproductivo

Se encontraron diferencias significativas en la producción de frutos de flores CH entre poblaciones, entre años, y la interacción población por año (Tabla 5), se encontró un efecto significativo del tamaño de la planta en la producción de flores de este tipo. Respecto a la producción de flores CL únicamente se encontraron diferencias significativas entre poblaciones y entre años dentro de poblaciones, no se encontró un efecto del tamaño de la planta en la producción de flores CL (Tabla 6). El promedio de producción de frutos de flores CL por planta en *P. crenatiloba* fue similar entre poblaciones y años de estudio, el cual osciló entre 1 y 3 para todas las poblaciones y años de estudio (Fig. 6 A). En cambio, la producción de frutos de flores CH fue más variable entre poblaciones de estudio, en Uruapan se registró el promedio más alto, lo cual no se registró en ninguna de las otras dos poblaciones.

Se registró una alta proporción de flores que se convierten en fruto en las poblaciones de estudio, el cual fue superior a 0.9 en todos los años y en ambos tipos de flor (Fig. 6 B).

Tabla 5. Resultados de la comparación del número de frutos provenientes de flores casmógamas (CH) entre años en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) mediante un Análisis de covarianza (ANCOVA) utilizando el tamaño de la planta como covariable					
Frutos de flores CH					
	Suma de cuadrados	Media cuadrada	G.L.	F	Prob>F
Población	33.01	16.505	2	59.729	<0.000
Año	6.23	6.234	1	22.562	<0.000
Tamaño de la planta	11.27	11.274	1	40.799	<0.000
Población *Año	5.06	2.529	2	9.154	<0.000
Población*Tamaño de la planta	2.69	1.345	2	4.869	<0.001
Residuales	47.25	0.276	171		

Tabla 6. Resultados de la comparación del número de flores cleistógamas (CL) entre años en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) mediante un Análisis de varianza (ANOVA)					
Frutos de flores CL					
	Suma de cuadrados	Media cuadrada	G.L.	F	Prob>F
Población	10.46	5.23	2	21.357	<0.000
Año	0.39	0.390	1	1.592	NS
Población*Año	7.69	3.845	2	15.699	<0.000
Residuales	42.62	0.245	174		

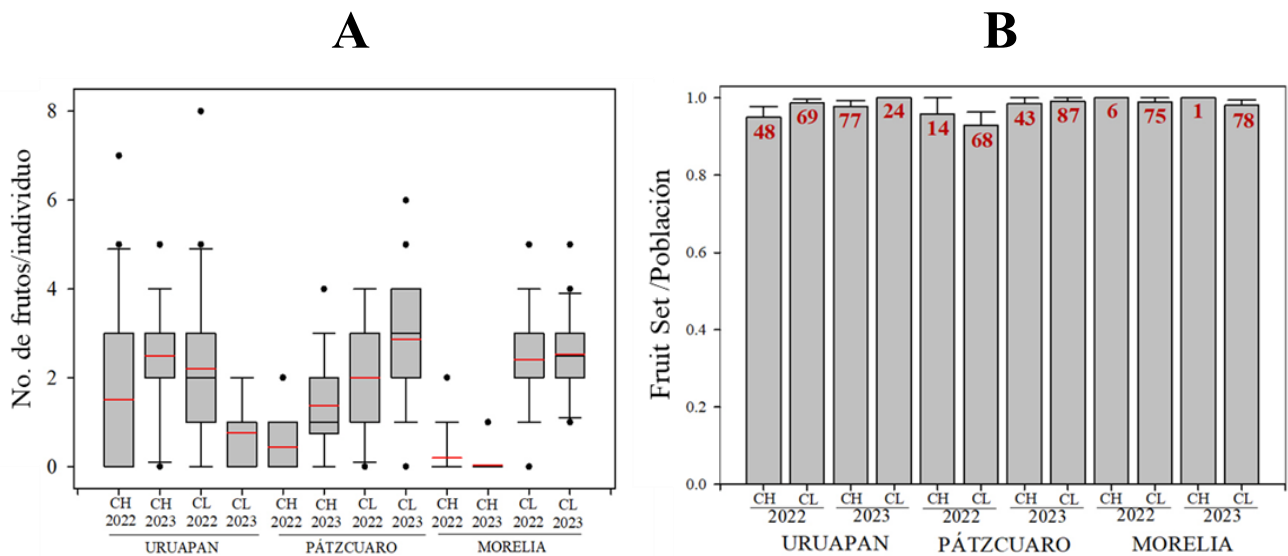


Figura 6. Producción de frutos en poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* durante dos años de estudio. **A.** Promedio de frutos de flores CH y CL por individuo, el promedio se muestra como una línea roja y la media como una línea negra. **B.** Proporción de flores CH y CL que se convierten en fruto (Fruit set). En rojo se muestran el número total de frutos producido a nivel poblacional.

Los tratamientos experimentales en poblaciones naturales mostraron que se producen frutos y semillas producto de la autofecundación autónoma en flores abiertas (CH) de *P. crenatiloba*. Sin embargo, en el 15% de los casos se registró la producción de frutos sin semillas, específicamente durante año 2022. El ANOVA de dos vías mostró diferencias estadísticamente significativas entre el número de semillas de los distintos tipos de flores (CH, CL y AA) y entre años de estudio. La diferencia en la producción de semillas entre el mismo tipo de flor no fue significativa entre años (Tabla 7). El promedio de producción de semillas por fruto fue menor en flores CL en ambos años de estudio, mientras que los frutos de flores CH y de AA presentaron en promedio un mayor número de semillas en comparación con los CL (Fig. 7).

Las pruebas de germinación in vitro mostraron que las semillas CH en el año 2022 no germinaron, mientras que las semillas provenientes de flores CL tuvieron un porcentaje de germinación del 16%, las cuales germinaron 23 días posteriores a la siembra. Las plántulas comenzaron a producir pedicelos florales en el día 65. En las pruebas realizadas en 2023 se encontró que las semillas CL y de tratamientos de autofecundación autónoma (AA) no germinaron, en cambio, las semillas CH presentaron un porcentaje bajo de germinación (10%), donde el proceso de germinación sucedió 15 días posteriores a la siembra.

<p>Tabla 7. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Comparación del número de semillas casmógamas (CH), cleistógamas (CL) y de autofecundación autónoma en flores CH (AA) en <i>Pinguicula crenatiloba</i> (Lentibulariaceae) durante dos años de estudio</p>					
	Suma de cuadrados	Media cuadrada	G.L.	F	Prob>F
Año	72.1	72.08	1	8.824	<0.001
Tipo de flor	170.8	85.39	2	10.454	<0.000

Año*Tipo de flor	11.9	5.96	2	0.730	NS
Residuales	767.8	8.17	94		

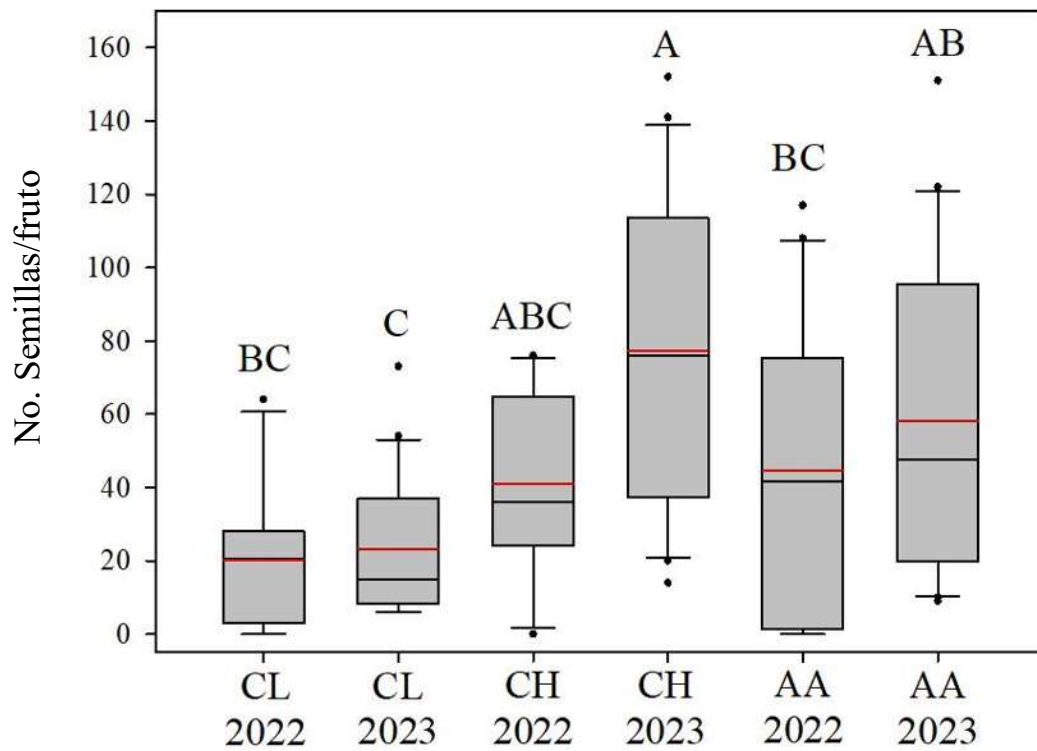


Figura 7. Producción de semillas en flores CH (Casmógamas), CL (Cleistógamas) y de autofecundación autónoma en flores CH (AA) de *Pinguicula crenatiloba* en Uruapan, Michoacán. La media se muestra como una línea negra dentro de la caja y en color rojo se observa el promedio para cada tipo de flor. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

Visitantes florales

El único visitante floral registrado se colectó el 29 de septiembre del 2022 a las 12:15 p.m y se identificó como una abeja del género *Lasioglossum* (Ayala, R., Com. Pers) (Fig. 8). En las filmaciones correspondientes a 2022 (9 horas) no se registró ninguna visita floral. En el año 2023 (3 horas) únicamente se registró un visitante identificado hasta ahora como un individuo de la clase Arachnida.

En el material complementario correspondiente a 32 horas de filmaciones del año 2021 se registraron dos visitantes en flores de *P. crenatiloba*, el primero fue identificado como una abeja del género *Lasioglossum* y el segundo un díptero de la familia Bombyliidae.



Figura 8. Abeja del género *Lasioglossum* (Halictidae) observada visitando flores de *Pinguicula crenatiloba* en Uruapan, Michoacán en el mes de septiembre de 2022. **A.** Habito dorsal **B.** Vista lateral. **C.** Cabeza. Escala en micrómetros (0,01 mm). **Fotografías por:** Arturo Tavera.

DISCUSIÓN

El presente estudio constituye uno de los pocos trabajos que evalúa detalladamente la producción de flores, frutos y semillas durante todo el ciclo de vida de una especie cleistógama y carnívora en distintas poblaciones y en distintos años de estudio.

La variación en los rasgos reproductivos en *P. crenatiloba* está asociada al sitio de estudio y el año de muestreo, puesto que se registraron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de flores CH y CL entre poblaciones, entre años de estudio y entre años dentro de poblaciones. La reproducción CL mostró mayor estabilidad entre años y poblaciones en comparación con la reproducción CH, por lo que la cleistogamia provee aseguramiento reproductivo a pesar de las fluctuaciones ambientales anuales. Se observó mayor variación entre años en la proporción de flores y frutos en Uruapan y Pátzcuaro, lo cual podría estar relacionado con las características de las poblaciones como un mayor número de individuos (>50) y plantas de mayor tamaño. En Morelia, la población está ubicada cerca de zonas de pastoreo, presentó el menor número de individuos (<50) (Barron S. Obs. Pers.) y menor tamaño promedio de la planta, se documentaron niveles de cleistogamia superiores al 90 % durante los dos años de estudio. En poblaciones más perturbadas, con poca cobertura y alto pastoreo se han registrado altos porcentajes de cleistogamia (Clay, 1983), además, dichas condiciones pueden disminuir la captura de presas en algunas especies (Primer *et al.* 2018). No obstante, en este estudio no se consideró ninguna clasificación o índice para conocer el grado de perturbación del hábitat, ni el número de presas capturadas. Es probable que las semillas de flores CL sean importantes para el establecimiento de plántulas dentro del hábitat materno para mantener las poblaciones locales (Cheplick, 2023). En especies anuales es más probable que evolucionen estrategias que maximicen la reproducción dentro de una temporada, ya que no pueden reasignar recursos para la reproducción futura (Albert *et al.* 2011), por lo tanto, la inversión de recursos a estructuras CL en ambientes con pocos polinizadores puede ser esencial para el mantenimiento de poblaciones en especies anuales, como es el caso de *P. crenatiloba*. Debido a lo anterior, es posible que el conjunto de características que presentó la población de Morelia favoreció los altos porcentajes de cleistogamia durante el periodo de estudio.

A diferencia de Morelia, en Uruapan se encontró una alta producción promedio de flores CH por individuo lo cual podría estar asociado a las condiciones locales como presencia de polinizadores y tipo de suelo arcilloso (ver Apéndice D), el cual provee una mayor

disponibilidad hídrica. El porcentaje de cleistogamia fue más variable entre años en Uruapan, no obstante, contrario a lo esperado, se encontró una mayor producción de flores CH en 2023, el año de estudio menor precipitación anual (2022: 1332.4 mm, 2023: 424.2 mm; Uruapan, Michoacán, APEAM). Es posible que la textura del suelo, la disponibilidad hídrica y la temperatura sean factores determinantes en la variación en el porcentaje de cleistogamia entre poblaciones de *P. crenatiloba*, como se documentó en *Triodanis perfoliata*, una especie anual con cleistogamia dimórfica (Ansaldi *et al.* 2018).

La variación temporal en la producción de flores CH y CL en especies cleistógamas es altamente variable entre taxones y se ha sugerido que las especies anuales y perennes difieren en fenología reproductiva (Oakley *et al.* 2007; Munguía-Rosas *et al.* 2012). En 2007, Oakley y colaboradores registraron que en 13 especies anuales pertenecientes a 11 géneros se producían simultáneamente ambos tipos de flores, iniciando en todos los casos con flores CL, seguida de flores CH y CL producidas simultáneamente y en algunos casos un segundo periodo de producción de flores CL (Oakley *et al.* 2007). Se sugiere que la producción de los dos tipos de flor al mismo tiempo maximiza la probabilidad de tener éxito reproductivo en estas especies (Soto, 2022). Por otro lado, en aproximadamente la mitad de las especies perennes evaluadas (17 especies, 10 géneros), se produjeron los dos tipos de flores secuencialmente en distintas estaciones y a diferencia de las especies anuales, la mayoría de las plantas perennes iniciaron la producción de flores CL ya sea simultáneamente, o después de la producción de flores CH (Oakley *et al.* 2007). La producción simultánea de flores CH y CL también se ha registrado en especies perennes como *Ruellia humilis* (Soto, 2022), *Microlaena polynoda* y *Calathea micans* (Oakley *et al.* 2007). Aunque, en algunas especies, el patrón de producción de ambos tipos de flor podría estar fuertemente influenciado por la variación ambiental, como en el caso particular de *Viola caspia*, una especie perenne, la cual en condiciones naturales produce secuencialmente flores CH y CL sin que exista un traslape entre estas, mientras que en condiciones experimentales de invernadero, la producción de flores ocurre de manera simultánea (Ammarellou *et al.* 2021).

Se encontró un desfase en el periodo de vida de *P. crenatiloba* en comparación con lo reportado en la literatura, la cual indica que ocurre de agosto a febrero (Zamudio, 2005), los resultados de este estudio indican que el periodo de vida en tres poblaciones de la especie es de septiembre a diciembre, con los picos máximos de floración entre septiembre a noviembre, el cual puede

variar ligeramente entre años. En las tres poblaciones de estudio, la producción de flores CH y CL ocurrió simultáneamente, en algunos casos en el mismo individuo, lo cual concuerda con los resultados reportados para especies anuales (Oakley *et al.* 2007), pero con la diferencia de que en esta especie la producción simultánea de flores ocurre desde el inicio de la temporada reproductiva y culminó con flores CL en todas las poblaciones y años de estudio, quizá como estrategia de aseguramiento reproductivo o una disminución de la actividad de polinizadores.

Por otra parte, se ha propuesto que al incrementarse la disponibilidad de recursos aumenta el tamaño de la planta y con ello una mayor producción de flores casmógamas, las cuales suelen ser más costosas en comparación con las cleistógamas (Wilken, 1982; Waller, 1980; Diaz y Macnair, 1998). Esta relación se ha observado en *Impatiens capensis*, *Emex spinosa*, *Collomia grandiflora*, *Amphicarpaea bracteata* (Le corff, 1993) y *Mimulus nasutus* (Diaz y Macnair, 1998). En *Pinguicula crenatiloba* se encontró una correlación positiva significativa entre el tamaño de la planta y la producción de flores totales (CH+CL) por individuo en todas las poblaciones de estudio, a excepción de Uruapan, donde se documentó un efecto significativo del tamaño de la planta y la producción de flores CH y flores totales, lo cual indica que conforme aumenta el tamaño de la planta, incrementa la producción de flores. Los resultados de este estudio sugieren que en *P. crenatiloba* el tamaño de la planta está relacionado con la asignación de recursos a una mayor cantidad de flores o a flores más costosas (CH), como se ha observado en otras especies cleistógamas (Forrest y Thomson, 2008; Diaz y MacNair, 1998; Wilken, 1982). Es posible que en *Pinguicula crenatiloba* la variación de rasgos reproductivos esté asociada también a otras condiciones como disponibilidad de polinizadores, disponibilidad hídrica y de nutrientes y/o captura de presas.

En especies del género *Pinguicula* se han reportado valores altos en la proporción de flores que se convierten en fruto como en el caso de *Pinguicula moranensis* (90% a 100%; Villegas y Alcalá, 2017; Villegas *et al.* 2020), en *P. vallisneriifolia* (81.5% por autogamia y 95.8% en polinización cruzada) (Zamora, 1999) y en *P. longifolia* subsp. *longifolia* (81.4%-93.8%) (García *et al.* 1994). Por otro lado, en *P. ionantha* y *P. lutea* se ha registrado mayor variación en la proporción de flores que se convierten en fruto entre años y poblaciones (40% a 90%) y (50% a 100%) respectivamente, así como en *P. planifolia* (40% a 100%; Molano-Flores *et al.* 2018) y *P. lutea* (55% a 78%) (Primer *et al.* 2018). En *P. crenatiloba* se encontró una alta proporción de flores CH y CL que se convierten en fruto en distintas poblaciones y años, en

todos los casos superiores a 90%, por lo que la heterogeneidad ambiental entre poblaciones y años no parece tener un efecto en términos del éxito reproductivo.

En el caso particular de *Impatiens capensis* (Lu, 2000), *Viola canadensis* (Culley, 2000) y *Viola pubescens* (Culley, 2002), se ha reportado que puede ocurrir autofecundación en flores CH excluidas de polinizadores. En el género *Pinguicula* se ha reconocido que, en especies con flores pequeñas, no hercógamas y poco visitadas, frecuentemente son autocompatibles (Alcalá y Domínguez, 2011), tal como se ha observado en *P. vallisnerifolia* (Zamora, 1999), *P. vulgaris*, *P. villosa* (Molau, 1993); aunque algunas no se autofecundan como *P. longifolia* (García *et al.* 1994), *P. alpina* (Molau, 1993) y *P. moranensis* (Villegas y Alcalá, 2017), las cuales presentan flores coloridas con patrones ultravioleta en la corola y la presencia de espólón prominente que permanecen abiertas por periodos de tiempo prolongados, lo cual promueve la interacción con visitantes florales (García *et al.* 1994; Villegas y Alcalá, 2017). En *Pinguicula crenatiloba*, se encontró producción de frutos y semillas en flores abiertas (CH) excluidas de polinizadores, por lo que la proporción relativa de flores CH y CL producidas puede no ser un indicador confiable del nivel real de entrecruzamiento en esta especie. Por lo tanto, debido a que la exclusión de polinizadores no limitó la producción de semillas en flores CH, es posible que sea necesario un periodo más prolongado de estudio para establecer conclusiones sobre la significancia adaptativa de la cleistogamia en esta especie. Sin embargo, la cleistogamia se ha perdido en diferentes linajes de plantas, como en el caso de distintas especies del género *Viola*, lo cual sugiere que este rasgo es evolutivamente lábil (Forrest y Thomson, 2008).

Las fluctuaciones anuales en la abundancia de polinizadores podrían conducir a la selección para producir mayoritariamente flores CL o de autofecundación tardía en flores CH (Culley, 2002). También es posible que las semillas de flores CH alógamas solo contribuyan a una pequeña fracción de la producción de semillas en ciertas poblaciones, pero puede que sean esenciales en el mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones de *P. crenatiloba* como se sugiere en otras especies (Eckstein y Otte, 2005). El número promedio de semillas por fruto fue mayor en frutos de flores CH y de autofecundación autónoma en flores CH en comparación con frutos de flores CL lo cual concuerda con otras especies cleistógamas como en *Ruellia nudiflora* (CH = 11.51 ± 0.17 semillas, CL = 8.14 ± 0.07 semillas; Munguía-Rosas *et al.* 2015) y *Monochoria vaginalis* (CH = 132 ± 8 semillas, CL = 110 ± 9 semillas; Imaizumi *et al.* 2008). No obstante, en otras especies se ha registrado un mayor número promedio de

semillas en frutos de flores CL en comparación con los CH y de AA como en *Collomia grandiflora* (AA: 1.23 ± 0.64 semillas, CH: 2.23 ± 0.06 y CL: 2.35 ± 0.12 ; Wilken 1982), *Impatiens pallida*, *Impatiens biflora* (Schemske, 1978), *Danthonia spicata* (Clay, 1983) y *Dichantheium clandestinum* (Bell y Quinn, 1985).

En *P. crenatiloba* el porcentaje de germinación de semillas CL fue de 16% en pruebas realizadas en 2022, pero en 2023 se encontraron resultados contradictorios debido a que únicamente germinaron las semillas CH (10%). Es importante tener en cuenta el posible sesgo en estas respuestas debido a que las pruebas únicamente se realizaron con 100 semillas de cada tipo por año debido al tamaño reducido de las poblaciones de estudio. Los experimentos de germinación en *P. crenatiloba* en medio MS $\frac{1}{4}$ concuerdan con lo reportado para *P. ionantha*, en la cual se encontró un porcentaje de germinación de 10% en el mismo medio de cultivo, sin embargo, se reportaron porcentajes más altos de germinación (20%) en los tratamientos control con agar al 1% en comparación con tratamientos en medio de cultivo MS $\frac{1}{2}$ y MS $\frac{1}{4}$ (Annis, 2013). En otras especies del género se han reportado porcentajes de germinación más altos en medio MS $\frac{1}{4}$ como en el caso particular de *P. vulgaris* con un 24% (Grevenstuck y Romano 2012) y *P. lusitanica* con un 40% (Gonçalves *et al.*, 2008).

En el género *Pinguicula* se ha reportado que son polinizadas principalmente por Hymenoptera y Diptera (García *et al.* 1994; Molano *et al.* 2018). En *Pinguicula crenatiloba* se reportaron por primera vez tres visitantes florales distintos, una abeja solitaria del género *Lasioglossum*, un díptero de la familia Bombyliidae y un Arachnido. Aparentemente las especies de *Pinguicula* polinizadas por insectos presentan bajas tasas de visitas (Molano-Flores *et al.* 2018), lo cual concuerda con lo registrado para *P. crenatiloba*. La baja tasa de visitas sugiere una gran escasez de polinizadores, por lo que la cleistogamia posibilita la reproducción a expensas de la falta de interacción con vectores bióticos.

El porcentaje de flores CL en *P. crenatiloba* fue más constante entre poblaciones y años, en comparación con la reproducción CH; por lo que es posible que las semillas provenientes de flores CL permitan el establecimiento en ambientes locales y las semillas de flores CH sean importantes para ciertos años. Se ha propuesto que la cleistogamia ha persistido en ciertas especies debido a una estrategia conocida como “Cobertura de apuestas” o “Bet- hedging”, donde los organismos presentan adaptaciones para lidiar con ambientes cambiantes, disminuyendo su adecuación promedio para reducir la variación en adecuación entre diferentes

hábitats, por lo que es posible que sea el caso de *P. crenatiloba* debido a que se registró la producción de ambos tipos de flor en las poblaciones de estudio y la proporción de flores menos costosas (CL) fue constante entre poblaciones y años de estudio.

RECOMENDACIONES

Futuros estudios deben considerar un mayor número de poblaciones naturales y evaluar factores abióticos, lo cual podría estar relacionado con la variación en este sistema reproductivo único, además de estimar el grado de perturbación del hábitat ya que podría estar asociado a las características poblacionales estructurales como número de individuos, distribución, dispersión. La estructura del hábitat también podría influir en el mecanismo de captura de presas en especies carnívoras, debido a que las condiciones abióticas podrían contribuir a la viscosidad y volumen de mucílago, el cual promueve la adhesión de las presas en las hojas. En este estudio no se consideró el número de presas capturadas por individuo, por lo que estudios futuros deben evaluar si existe una relación entre el sistema reproductivo con los patrones de captura y abundancia/proporción de presas en poblaciones contrastantes para conocer su impacto en la asignación de recursos a estructuras reproductivas.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sobre el porcentaje de germinación de los diferentes tipos de semillas deben ser interpretados con cautela debido a que no se pudieron realizar réplicas por el reducido tamaño de las poblaciones, por lo que futuros estudios deben evaluar el comportamiento de germinación bajo distintas concentraciones de medio de cultivo y en agar-agar (1%), donde se han observado porcentajes de germinación mayor al 10%.

CONCLUSIONES

Se encontraron porcentajes contrastantes de cleistogamia entre poblaciones y años de estudio, lo que sugiere que la cleistogamia puede resultar ventajosa en ambientes heterogéneos y con una baja abundancia de polinizadores, ya que únicamente se registraron 3 visitantes florales durante el periodo de estudio. Contrario a lo esperado, en el año con menor precipitación se registró una mayor abundancia de flores CH en una de las poblaciones de estudio. Se encontró una alta proporción de flores que se convierten en fruto, tanto de flores CH como CL por lo que hasta ahora no es claro cuál podría ser la ventaja de la cleistogamia en términos de éxito reproductivo. Se encontró producción de frutos en flores CH excluidas de polinizadores, por lo que proporción relativa de flores CH y CL producidas puede no ser un indicador confiable del nivel real de entrecruzamiento en las poblaciones. El presente estudio pone en evidencia la importancia de comprender el papel de los factores bióticos y abióticos en la variación de rasgos reproductivos en sistemas de apareamiento en angiospermas ya que estos factores pueden tener un gran impacto a nivel poblacional, lo cual es esencial para entender la respuesta de las plantas frente al cambio climático.

LITERATURA CITADA

- Albert, L. P., Campbell, L. G., y Whitney, K. D. 2011. Beyond Simple Reproductive Assurance: Cleistogamy Allows Adaptive Plastic Responses to Pollen Limitation. *International Journal of Plant Sciences*, 172(7), 862–869. doi:10.1086/660883
- Alcalá, R. E., y Domínguez, C. A. 2011. Genetic Structure of the Carnivorous Plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) on the Transvolcanic Mexican Belt. *Biochemical Genetics*, 50(5-6), 416–427. doi:10.1007/s10528-011-9485-x
- Annis, J. 2013. Seed Ecology of Federally Threatened *Pinguicula ionantha* (Godfrey's Butterwort). Undergraduate Honors Theses. 79. https://thekeep.eiu.edu/honors_theses/79
- Ansaldi, B. H., Weber, J. J., y Franks, S. J. 2018. The role of phenotypic plasticity and pollination environment in the cleistogamous, mixed-mating breeding system of *Triodanis perfoliata*. *Plant Biology*. doi:10.1111/plb.12877
- Ammarellou, A., J. Żabicka, A. Słomka, J. Bohdanowicz, T. Marcussen, and E. Kuta. 2021. "Seasonal and Simultaneous Cleistogamy in Rostrate Violets (*Viola*, subsect. Rostratae, Violaceae)" *Plants* 10, no. 10: 2147. <https://doi.org/10.3390/plants10102147>
- Asociación de Productores y Empacadores Exportadores de Aguacate de México (APEAM). <https://apeamac.com>
- Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science*, 3(9), 335–341. doi:10.1016/s1360-1385(98)01299-0
- Barrett, S. C. H. 2009. Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537), 99–109. doi:10.1098/rstb.2009.0199
- Barrón, S.P. 2021. Evaluación de la cleistogamia en dos poblaciones de *Pinguicula crenatiloba* (Lentibulariaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Baskin, J. M., y Baskin, C. C. 2017. Seed germination in cleistogamous species: theoretical considerations and a literature survey of experimental results. *Seed Science Research*, 27(02), 84–98. doi:10.1017/s0960258517000058
- Bell, T. y Quinn, J. 1985. Relative Importance of Chasmogamously and Cleistogamously Derived Seeds of *Dichanthelium clandestinum* (L.) Gould. *Botanical Gazette*: 146. DOI: 10.1086/337521

- Benavente-Romo, C. y M. Sandoval-Ortega. 2021. Contribución al conocimiento de *Pinguicula oblongiloba* (Lentibulariaceae) en Aguascalientes, México: distribución, morfología y visitantes florales. IBCIENCIAS 4 (1): 1-8.
- Benenati, T. 2000. Effects of plant density on chasmogamy and cleistogamy in *Lespedeza cuneata* (Fabaceae). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad pública de Emporia, Kansas.
- Berg, H. 2000. Differential seed dispersal in *Oxalis acetosella*, a cleistogamous perennial herb. *Acta Oecologica*, 21(2), 109–118. doi:10.1016/s1146-609x(00)00118-1
- Berg, H. 2003. Factors Influencing Seed: Ovule Ratios and Reproductive Success in Four Cleistogamous Species: A Comparison between Two Flower Types. *Plant Biology*, 5(2), 194–202. doi:10.1055/s-2003.
- Berg, H., y Redbo-torstensson, P. 1998. Cleistogamy as a bet-hedging strategy in *Oxalis acetosella*, a perennial herb. *Journal of Ecology*, 86(3), 491–500. doi:10.1046/j.1365-2745.1998.00272.x
- Berg, H., y Redbo-Torstensson, P. 1999. Offspring performance in three cleistogamous *Viola* species. *Plant Ecology*, 145(1), 49–58. doi:10.1023/a:1009848318794
- Brown WV. 1952. The relation of soil moisture to cleistogamy in *Stipa leucotricha*. *Botanical Gazette* 113:438–444.
- Campbell, C.S., J.A. Quinn, G.P. Cheplick y T.J. Bell. 1983. Cleistogamy in grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14, 411–441.
- Casper, J. S. 1966. Monographie der gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica* 31: 1-209.
- Cheplick, G.P. 2023. Spatiotemporal variation of chasmogamy and cleistogamy in a native perennial grass: fecundity, reproductive allocation and allometry, *AoB PLANTS*, Volume 15, Issue 3, June 2023, <https://doi.org/10.1093/aobpla/plad020>
- Christopher, D. A., Mitchell, R. J., Trapnell, D. W., Smallwood, P. A., Semski, W. R., y Karron, J. D. 2019. Hermaphroditism promotes mate diversity in flowering plants. *American Journal of Botany*. doi:10.1002/ajb2.1336
- Clay, K. 1983. Variation in the degree of cleistogamy within and among species of the Grass *Danthonia*. *American Journal of Botany*, 70(6), 835–843. doi:10.1002/j.1537-2197.1983.tb06421.x

- Colbert, L.I. 2015. Reproductive Plasticity in Two Subspecies of a Cleistogamous Plant, *Triodanis perfoliata*. Thesis for the Degree Master of Science in Biology. East Carolina University.
- Crane, P. R., Friis, E. M., y Pedersen, K. R. 1995. The origin and early diversification of angiosperms. *Nature*, 374(6517), 27–33. doi:10.1038/374027a0
- Crepet, W. L. 1984. Advanced (Constant) Insect Pollination Mechanisms: Pattern of Evolution and Implications Vis-a-Vis Angiosperm Diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71(2), 607. doi:10.2307/2399041
- Culley, T. M. 2000. Inbreeding depression and floral type fitness differences in *Viola canadensis* (Violaceae), a species with chasmogamous and cleistogamous flowers. *Canadian Journal of Botany*, 78(11), 1420–1429.
- Culley, T. M. 2002. Reproductive Biology and Delayed Selfing in *Viola pubescens* (Violaceae), an Understory Herb with Chasmogamous and Cleistogamous Flowers. *International Journal of Plant Sciences*, 163(1), 113–122. doi:10.1086/324180
- Culley, T.M. y M.R. Klooster. 2007. The Cleistogamous Breeding System: A Review of Its Frequency, Evolution, and Ecology in Angiosperms. *The Botanical Review* 73 (1): 1-30.
- Diaz, A. y Macnair, M. R. 1998. The effect of plant size on the expression of cleistogamy in *Mimulus nasutus*. *Functional Ecology*, 12(1), 92–98. doi:10.1046/j.1365-2435.1998.00170.x
- Domínguez, Y., P, Temple, I. Pančo y V.F.O, Miranda. 2024. Biogeographical patterns of *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae) in the Americas revealed by endemism and habitat suitability analyses, *Flora*, 313. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2024.152484>.
- Eckstein, R. L., y Otte, A. 2005. Effects of cleistogamy and pollen source on seed production and offspring performance in three endangered violets. *Basic and Applied Ecology*, 6(4), 339–350. doi:10.1016/j.baae.2004.12.002
- Ellstrand, N. C., Lord, E. M., y Eckard, K. J. 1984. The Inflorescence as a Metapopulation of Flowers: Position-Dependent Differences in Function and Form in the Cleistogamous Species *Collomia grandiflora* Dougl. Ex Lindl. (Polemoniaceae). *Botanical Gazette*, 145(3), 329–333.

- Espinosa-Matías, S., S. Zamudio y J. Márquez-Guzmán. 2005. Embriología de las estructuras reproductoras masculinas del género *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae). Boletín de la Sociedad Botánica de México. 76:43-52.
- Fleischmann, A. 2021. On the infrageneric classification of *Pinguicula*. Carnivorous Plant Newsletter. Vol 50: 174-188. DOI: 10.55360/cpn504.af487
- Fleischmann, A. 2011. Phylogenetic relationships, systematics, and biology of carnivorous Lamiales, with special focus on the genus *Genlisea* (Lentibulariaceae). Dissertation zur Erlangung des Doktorsgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Franklin-Tong, V.E. 2008. Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, diversity and mechanisms. Springer. Alemania. DOI 10.1007/978-3-540-68486-2
- Forrest, J., y Thomson, J. D. 2008. Pollen limitation and cleistogamy in subalpine *Viola praemorsa*. Botany, 86(5), 511–519. doi:10.1139/b08-020
- García, M. B., Antor, R. J., y Villar, L. 1994. Phenomorphology and reproductive biology of *Pinguicula longifolia* Ramond ex DC. *subsp. longifolia* (Lentibulariaceae), a carnivorous endemic plant of the Pyrenees. Acta Botanica Gallica, 141(3), 343–349
- Gonçalves, S., Escapa, A. L., Grevenstuk, T., y Romano, A. 2008. An efficient in vitro propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95(2), 239–243. doi:10.1007/s11240-008-9423-8
- Grevenstuk, T., y Romano, A. 2012. *In vitro* plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. Open Life Sciences, 7(1). doi:10.2478/s11535-011-0103-z
- Grob, V., Pfeifer, E., y Rutishauser, R. 2007. Sympodial Construction of Fibonacci-type Leaf Rosettes in *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). Annals of Botany, 100(4), 857–863. doi:10.1093/aob/mcm184
- Harlan, R. 1945. Cleistogamy and chasmogamy in *Bromus carinatus* Hook, and Arn. Amer. J. Bot. 32: 66-72.
- Hernández, J. y S. Zamudio. 2017. Flora de Guerrero. (No. 77 Lentibulariaceae). UNAM.
- Hiscock, S. J., y McInnis, S. M. 2003. The Diversity of Self-Incompatibility Systems in Flowering Plants. Plant Biology, 5(1), 23–32. doi:10.1055/s-2003-37981
- Huerto, R. y S. Vargas. 2014. Estudio ecosistémico del lago de Pátzcuaro: aportes en gestión ambiental para el fomento del desarrollo sustentable. Instituto Mexicano de Tecnología

- del Agua, Comisión Nacional del Agua, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 210 pp.
- Huebner, C. D. 2011. Seed Mass, Viability, and Germination of Japanese Stiltgrass (*Microstegium vimineum*) under Variable Light and Moisture Conditions. *Invasive Plant Science and Management*, 4(03), 274–283. doi:10.1614/ipsm-d-10-00090.1
- Imaizumi, T., Wang, g.-X., y Tominaga, T. 2008. Pollination of chasmogamous flowers and the effects of light and emergence time on chasmogamy and cleistogamy in *Monochoria vaginalis*. *Weed Biology and Management*, 8(4), 260–266. doi:10.1111/j.1445-6664.2008.00302.x
- IMPLAN (Instituto Municipal de Planeación). 2020. D3. 303. Clima, Medio ambiente y territorio. implanuruapan.gob.mx (Consultado 05 octubre 2022).
- Jasieniuk, M. 1985. Cleistogamy in *Oxalis montana* Raf. Ph.D. dissertation, Department of Biology, McGill University, Montreal, Quebec.
- Jasieniuk, M., y Lechowicz, M. J. 1987. Spatial and Temporal Variation in Chasmogamy and Cleistogamy in *Oxalis montana* (Oxalidaceae). *American Journal of Botany*, 74(11), 1672–1680. <https://doi.org/10.2307/2444136>
- Joly, S., y Schoen, D. J. 2021. Repeated evolution of a reproductive polyphenism in plants is strongly associated with bilateral flower symmetry. *Current Biology*, 31(7), 1515–1520.e3. Doi: 10.1016/j.cub.2021.01.00
- Jones, N. T., Husband, B. C., y MacDougall, A. S. 2013. Reproductive system of a mixed-mating plant responds to climate perturbation by increased selfing. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1766), 20131336–20131336. doi:10.1098/rspb.2013.1336
- Kalisz, S., y Vogler, D. W. 2003. Benefits of autonomous Selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology*, 84(11), 2928–2942. doi:10.1890/02-0519
- Kawano, S., Hara, T., Hiratsuka, A., Matsuo, K., y Hirota, I. 1990. Reproductive Biology of an Amphicarpic Annual, *Polygonum thunbergii* (Polygonaceae): Spatio-temporal Changes in Growth, Structure and Reproductive Components of a Population over an Environmental Gradient. *Plant Species Biology*, 5(1), 97–120.

- Koike, S., Yamaguchi, T., Ohmori, S., Hayashi, T., Yatou, O., y Yoshida, H. 2015. Cleistogamy Decreases the Effect of High Temperature Stress at Flowering in Rice. *Plant Production Science*, 18(2), 111–117.
- Langer, R.H. y Wilson. 1965. Environmental control of cleistogamy in praire grass (*Bromus unioloides* H.B.K.). *New Phytol* 64: 8085.
- Le Corff, J. 1993. Effects of light and nutrient availability on chasmogamy and cleistogamy in an understory tropical herb, *Calathea micans* (Marantaceae). *Americal Journal of Botany* 80(12): 1392-1399.
- Legendre, L. 2000. The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botanica Gallica*, 147(1), 77–95. doi:10.1080/12538078.2000.10515837
- Lerner, P. D.; Bai, Yuguang; Morici, E. F.A. 2008. Does seed heteromorphism have different roles in the fitness of species with contrasting life history strategies? *Botany*, 86(12), 1404–1415. doi:10.1139/b08-106
- Levin, D. A. 1972. Plant density, cleistogamy, and self-fertilization in natural populations of *Lithospermum caroliniense*. *American Journal of Botany*, 59(1), 71–77. doi:10.1002/j.1537-2197.1972.tb10063.x
- Lord, E. M. 1981. Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *The Botanical Review*, 47(4), 421–449. doi:10.1007/bf02860538
- Lu, Y. 2000. Effects of Density on Mixed Mating Systems and Reproduction in Natural Populations of *Impatiens capensis*. *International Journal of Plant Sciences*, 161(4), 671–681. doi:10.1086/314282
- Lustofin, K.; Swiatek, P., Miranda, V.F.O.; Plachno, B.J. 2023. Phylogenetical Position versus Pollination Syndromes: Floral Trichomes of Central American and Mexican *Pinguicula*. *Int. J. Mol. Sci*, 24, 8423. <https://doi.org/10.3390/ijms24098423>
- Macedo, M.M., J.V. Mauricio de Jesús, H. Soares, M.A. Santos, M. Soares y C. Ferreira. 2020. Tissue culture applied to carnivorous species. *Scientia Agraria Paranaensis*. p. 312-320, DOI: <https://doi.org/10.18188/sap.v19i4.22193>
- Magallón, S., y Sanderson, M. J. 2001. Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution*, 55(9), 1762–1780. doi:10.1111/j.0014-3820.2001.tb00826.x
- Manivannan, A. 2020. Prospects of Cleistogamy in Plant Breeding. *Research Biotica*, 2(3), 102-104. <https://doi.org/10.54083/ResBio/2.3.2020.102-104>

- Martínez, J.D. 2017. Propagación in vitro de *Pinguicula moctezumae* Zamudio et R. Z. Ortega. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mattila, T., y Salonen, V. 1995. Reproduction of *Viola mirabilis* in relation to light and nutrient availability. *Canadian Journal of Botany*, 73(12), 1917–1924. doi:10.1139/b95-204
- Masuda, M., y Yahara, T. 1994. Reproductive ecology of a cleistogamous annual *Impatiens nolitangere* L., occurring under different environmental conditions. *Ecological Research*, 9(1), 67–75. doi:10.1007/bf02347243
- Molano-Flores, B., Primer, S., Annis, J., Feist, M. A., Coons, J., y Digges, R. 2018. Reproductive ecology of three rare North American *Pinguicula* species. *Plant Species Biology*, 33(2), 129–139. doi:10.1111/1442-1984.12204
- Molau, U. 1993. Reproductive ecology of the three Nordic *Pinguicula* species (Lentibulariaceae). *Nordic Journal of Botany*, 13(2), 149–157. doi:10.1111/j.1756-1051.1993.tb00025.x
- Morinaga, S.-I., Nagano, A. J., Miyazaki, S., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H., y Hasebe, M. 2008. Ecogenomics of cleistogamous and chasmogamous flowering: genome-wide gene expression patterns from cross-species microarray analysis in *Cardamine kokaiensis* (Brassicaceae). *Journal of Ecology*, 96(5), 1086–1097. doi:10.1111/j.1365-2745.2008.01392.x
- Munguía-Rosas, M. A., Arias, L. M., Jurado-Dzib, S. G., Mezeta-Cob, C. R., y Parra-Tabla, V. 2015. Effects of herbivores and pollinators on fruit yield and survival in a cleistogamous herb. *Plant Ecology*, 216(4), 517–525.
- Munguía-Rosas, M. A., Parra-Tabla, V., Ollerton, J., y Cervera, J. C. 2012. Environmental control of reproductive phenology and the effect of pollen supplementation on resource allocation in the cleistogamous weed, *Ruellia nudiflora* (Acanthaceae). *Annals of Botany*, 109(2), 343–350. doi:10.1093/aob/mcr284
- Oakley, C. G., Moriuchi, K. S., y Winn, A. A. 2007. The Maintenance of Outcrossing in Predominantly Selfing Species: Ideas and Evidence from Cleistogamous Species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 437–457.
- Park H, Son G, Kim JG. 2022. Effects of light and nutrient on flower formation and vegetative growth of *Viola collina*. *Journal of Ecology and Environment*. 46:23-. <https://doi.org/10.5141/jee.22.050>

- Pérez-Sánchez, J., Reyero-Saavedra, R., Pozos-Ruiz, Y., Verastegui-Vidal, M. and Ortiz-Montiel, J. G. 2017. *In vitro* propagation of *Pinguicula moranensis* H.B.K., var. Neovolcánica. *Z. Revista Bio Ciencias* 4(3): 179-188. <http://editorial.uan.edu.mx/BIOCIENCIAS/article/view/232/266>
- Phillips, G. C., y Garda, M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. doi:10.1007/s11627-019-09983-5
- Primer, S., Molano-Flores, B., Zaya, D. N., Helm, C., y Coons, J. 2018. Effect of habitat structure on reproduction and prey capture of a rare carnivorous plant, *Pinguicula lutea*. *Arthropod-Plant Interactions*. doi:10.1007/s11829-018-9632-y
- Ranua VA, Weinig C. 2010. Mixed-mating strategies and their sensitivity to abiotic variation in *Viola lanceolata* L. (Violaceae). *Open Ecology Journal* 3:83–94.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Redbo-Torstensson, P. y Berg, H. 1995. Seasonal cleistogamy: a conditional strategy to provide reproductive assurance. *Acta Botanica Neerlandica*, 44(3), 247–256. doi:10.1111/j.1438-8677.1995.tb00783.x
- Sauquet, H. 2021. Evolution: Cleistogamy to the rescue of zygomorphic flowers. *Current Biology*, 31(7), R332–R335. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.01.054>
- Schemske, D. W. 1978. Evolution of Reproductive Characteristics in *Impatiens* (Balsaminaceae): The Significance of Cleistogamy and Chasmogamy. *Ecology*, 59(3), 596–613. doi:10.2307/1936588
- Schmitt, J., Eccleston, J., y Ehrhardt, D. W. 1987. Density-Dependent Flowering Phenology, Outcrossing, and Reproduction in *Impatiens capensis*. *Oecologia*, 72(3), 341–347. <http://www.jstor.org/stable/4218273>
- Schoen, D.J. y Lloyd, D.G. 1984. The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. *Biological Journal of the Linnean Society*, 23(4), 303–322. doi:10.1111/j.1095-8312.1984.tb00147.x
- Schutzenhofer, Michele R.; Knight, Tiffany M. 2007. Population-level effects of augmented herbivory on *Lespedeza cuneata*: implications for biological control. *Ecological Applications*, 17(4), 965–971. doi:10.1890/06-1282

- Serrano-Serrano, M. L., Rolland, J., Clark, J. L., Salamin, N., y Perret, M. 2017. Hummingbird pollination and the diversification of angiosperms: an old and successful association in Gesneriaceae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1852), 20162816. doi:10.1098/rspb.2016.2816
- Shimai H, Setoguchi H, Roberts DL, Sun M.2021. Biogeographical patterns and speciation of the genus *Pinguicula* (Lentibulariaceae) inferred by phylogenetic analyses. *PLOS ONE* 16(12): e0261600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261600>
- Shivanna, K. R. 2015. Reproductive assurance through autogamous self-pollination across diverse sexual and breeding systems. *Current Science*, 109(7), 1255–1263. <http://www.jstor.org/stable/24905889>
- Simpson, R. L., Leck, M. A., y Parker, V. T. 1985. The Comparative Ecology of *Impatiens capensis* Meerb. (Balsaminaceae) in Central New Jersey. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 112(3), 295. doi:10.2307/2996545
- Silva, N. F., y Goring, D. R. 2001. Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(14), 1988–2007. doi:10.1007/pl00000832
- Soltis, D. E., Bell, C. D., Kim, S., y Soltis, P. S. 2008. Origin and Early Evolution of Angiosperms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1133(1), 3–25. doi:10.1196/annals.1438.005
- Soto, T. 2022. costs and benefits of self-fertilization in the cleistogamous perennial *Ruellia humilis*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Purdue.
- Sternberger, A. L., Ruhil, A. V. S., Rosenthal, D. M., Ballard, H. E., & Wyatt, S. E. 2020. Environmental impact on the temporal production of chasmogamous and cleistogamous flowers in the mixed breeding system of *Viola pubescens*. *PLOS ONE*, 15(3), e0229726. doi:10.1371/journal.pone.0229726
- Sun, M. 1999. Cleistogamy in *Scutellaria indica* (Labiatae): effective mating system and population genetic structure. *Molecular Ecology*, 8(8), 1285–1295. doi:10.1046/j.1365-294x.1999.00691.x
- Van der Niet, T. y Johnson, S. D. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(6), 353–361. doi:10.1016/j.tree.2012.02.002

- Vassilyev, A.E. y Muravnik, L.E. 1988. The Ultrastructure of the Digestive Glands in *Pinguicula vulgaris* L. (Lentibulariaceae) Relative to their Function. I. The Changes During Maturation. *Annals of Botany*, 62(4), 329–341. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a087665
- Villegas, S. G., y Alcalá, R. E. 2017. Reproductive ecology of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 20(2), 205–212. doi:10.1111/plb.12652
- Villegas, S.G., Ospina-Garcés, S.M., Fornoni, J., Domínguez, C.A. y Alcalá, R.E. 2020. Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Species Biology*. doi:10.1111/1442-1984.12271
- Waller, D. M. 1980. Environmental determinants of outcrossing in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *Evolution* 34: 747-761.
- Waller, D. M. 1984. Differences in Fitness Between Seedlings Derived from Cleistogamous and Chasmogamous Flowers in *Impatiens capensis*. *Evolution*, 38(2), 427. doi:10.2307/2408501
- Wilken, D. H. 1982. The balance between chasmogamy and cleistogamy in *Collomia grandiflora* (POLEMONIACEAE). *American Journal of Botany*, 69(8), 1326–1333. doi:10.1002/j.1537-2197.1982.tb13379.x
- Yang, Y. Y., y Kim, J. G. 2016. The optimal balance between sexual and asexual reproduction in variable environments: a systematic review. *Journal of Ecology and Environment*, 40(1). doi:10.1186/s41610-016-0013-0
- Zamora, R. 1999. Conditional outcomes of interactions: the pollinator–prey conflict of an insectivorous plant. *Ecology*, 80(3), 786–795. doi:10.1890/0012-9658(1999)080[0786:cooitp]2.0.co;
- Zamudio-Ruiz, S. 2006. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 45. LENTIBULARIACEAE. UNAM. PP 1
- Zamudio, S. 2005. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 136. Lentibulariaceae. INECOL. México.

APÉNDICE

A. Factores bióticos y abióticos asociados a la cleistogamia

La cleistogamia es un mecanismo complejo influenciado por el ambiente y las características genéticas de los individuos. Diversos estudios han explorado empíricamente la asignación de recursos en especies que producen flores CH y CL, y han demostrado que la proporción de flores producidas por un individuo puede modificarse por factores ambientales como la humedad del suelo, temperatura, la fertilidad del suelo, la intensidad lumínica, la densidad de individuos, las condiciones de polinización, la disponibilidad hídrica, entre otros (Ver Tabla A) (Campbell *et al.* 1983; Le Corff, 1993).

En la siguiente tabla se presentan casos de especies cleistógamas, donde se han evaluado los factores que promueven la producción de ambos tipos florales ya sea en condiciones experimentales o de campo.

Tabla A. Factores comúnmente asociados a la cleistogamia					
Factor	Descripción	Ciclo de vida	Especie	Familia	Cita
Luz (light quantity)	Reducción en la cantidad de luz, disminución en la producción de flores CH	Perenne	<i>Viola pubescens</i>	Violaceae	Stemberger <i>et al.</i> 2020
	La proporción de flores CL es menor en áreas sombreadas	Perenne	<i>Viola mirabilis</i>	Violaceae	Mattila y Salonen, 1995
	En alta luminosidad la especie produce flores CH, y con mayor tasa de cruzamiento en comparación con sitios sombreados	Anual	<i>Monochoria vaginalis</i>	Pontederiaceae	Imaizumi <i>et al.</i> 2008
	Bajo condiciones de sombra, la producción de flores CH se da por un periodo corto y una producción temprana de flores CL	Perenne	<i>Ruellia nudiflora</i>	Acanthaceae	Munguía-Rosas <i>et al.</i> 2012
	Aumento en disponibilidad lumínica produce mayor cantidad de inflorescencias con flores CH	Perenne	<i>Calathea micans</i>	Marantaceae	Le Corff, 1993
	En ambientes de alta disponibilidad lumínica se producen mayoritariamente flores CH	Anual	<i>Triodanis perfoliata</i>	Campanulaceae	Colbert, 2015

	En fotoperiodos cortos y con humedad alta, se producen mayoritariamente flores CH	Perenne	<i>Bromus unioloides</i>	Poaceae	Langer y Wilson, 1965
	En diferentes poblaciones de un gradiente ambiental las semillas de flores CH presentaron una reducción en tamaño conforme la disponibilidad de luz disminuía, mientras que el tamaño de las semillas de flores CL se mantuvo constante a lo largo del gradiente	Anual	<i>Polygonum thunbergii</i>	Polygonaceae	Kawano, <i>et al.</i> 1990.
	En condiciones experimentales de alta luminosidad y nutrientes se presenta gran crecimiento vegetativo. Se observó que en esta especie las condiciones de baja luminosidad son necesarias para la producción de flores CH.	Perenne	<i>Viola collina</i>	Violaceae	Park <i>et al.</i> 2022
Temperatura	En bajas temperaturas aumento en la producción de flores CL	Anual	<i>Ceratocarpus heterocarpa</i>	Papaveraceae	Stemberger <i>et al.</i> 2020
	Temperatura elevada y sequía dan como resultado flores CL	Perenne	<i>Viola praemorsa</i>	Violaceae	Jones <i>et al.</i> 2013
	Una mutante de arroz produce flores cerradas bajo condiciones de altas temperaturas.	Anual	<i>Oriza sativa</i>	Poaceae	Koike <i>et al.</i> 2015
	Periodos largos de frío inducen mayor producción de flores CL	Anual o bianual	<i>Cardamine kokainensis</i>	Brassicaceae	Stemberger <i>et al.</i> 2020
	Se puede inducir la cleistogamia con tratamiento de frío en cámaras de cultivo. Temperaturas bajas producen flores CL y flores intermedias. En tratamientos sin frío se producen mayoritariamente flores CH				Morinaga <i>et al.</i> 2008
Disponibilidad hídrica/ Humedad en el suelo	Poca humedad en el suelo, alto porcentaje de flores CL	Perenne	<i>Stipa leucotricha</i>	Poaceae	Stemberger <i>et al.</i> 2020
	Alta humedad en el suelo produce flores CH	Perenne	<i>Bromus carinatus</i>	Poaceae	Harlan, 1945
	Baja disponibilidad de agua en el suelo produce mayoritariamente flores CL	Perenne	<i>Stipa leucotricha</i>	Gramineae	Brown, 1952

	La producción de flores CL está ligada al porcentaje de humedad en el suelo. Humedad del 8-20% se producían en su mayoría flores CL	Perenne	<i>Viola lanceolata</i>	Violaceae	Ranua y Weinig, 2010
Tamaño de la planta	Conforme incrementa el tamaño de la planta, el porcentaje de casmogamia incrementa de igual forma	Anual	<i>Mimulus nasutus</i>	Phrymaceae	Diaz y MacNair, 1998
	En condiciones que favorecían un máximo crecimiento se observaron mayoritariamente inflorescencias CH, y en condiciones limitantes del crecimiento, las plantas producían solo una inflorescencia CL	Anual	<i>Collomia grandiflora</i>	Polemoniaceae	Wilken, 1982
Disponibilidad de nutrientes	Aumento en la disponibilidad de nutrientes produce una alta proporción de flores CH	Perenne	<i>Calathea micans</i>	Marantaceae	Le Corff, 1993
	La producción de flores (CH/CL) aumenta significativamente cuando se aplica fertilizante en condiciones experimentales	Perenne	<i>Viola collina</i>	Violaceae	Park <i>et al.</i> 2022
Densidad de individuos	Las poblaciones en condiciones silvestres presentan flores CL. Experimentalmente se redujo la densidad de individuos en comparación con poblaciones naturales y se produjeron flores CH tempranamente y un incremento en el número de plantas que producen flores CH. La duración y la producción de flores CL y CH fue mejor en densidades reducidas	Anual	<i>Impatiens capensis</i>	Balsaminaceae	Schmitt <i>et al.</i> 1987
	Las flores CL se presentan en poblaciones con densidad relativamente alta	Perenne	<i>Lithospermum caroliniense</i>	Boraginaceae	Levin, 1972
	En condiciones de densidad baja se producen mayoritariamente flores CH, en comparación con tratamientos experimentales de alta densidad	Perenne	<i>Lespedeza cuneata</i>	Fabaceae	Benenati, 2000
Condiciones de polinización	Las plantas que recibieron suplementación de polen presentaron una frecuencia más baja de flores CH en comparación con las que no recibieron suplementación	Anual	<i>Triodanis perfoliata</i>	Campanulaceae	Ansaldi <i>et al.</i> 2018

	Suplementación de polen dio como resultado una mejor supervivencia de las plantas, pero no tuvo efecto en la producción de flores CH.	Perenne	<i>Ruellia nudiflora</i>	Acanthaceae	Munguía-Rosas, <i>et al.</i> 2015
Herbivoría	Defoliación experimental causó efecto negativo en producción de frutos CH asociado al costo de producción de estas estructuras y a la reducción en la tasa fotosintética por la defoliación	Perenne	<i>Ruellia nudiflora</i>	Acanthaceae	Munguía-Rosas, <i>et al.</i> 2015

B. El género *Pinguicula*, L.

La familia Lentibulariaceae (Orden Lamiales), está conformada por tres géneros: *Genlisea*, *Utricularia* y *Pinguicula*. Todos los individuos de la familia Lentibulariaceae, cerca de 300 especies, son plantas carnívoras pequeñas, herbáceas, anuales o perennes, que pueden ser terrestres, acuáticas o epífitas (Fleischmann, 2011; Espinosa-Matías *et al.* 2005).

Las especies del género *Pinguicula* (Latin “Pinguis” = grasoso, pegajoso) se caracterizan por presentar una roseta compacta con hojas ovadas que puede ir desde los pocos centímetros hasta aproximadamente 30 centímetros de diámetro. Algunas especies son anuales, pero la mayoría de los integrantes del género son perennes. Todas las especies del género presentan raíces adventicias fibrosas (Legendre, 2000).

Las especies del género *Pinguicula* son plantas carnívoras, capaces de atraer, atrapar, digerir y absorber nutrientes de presas como pequeños dípteros y áfidos (Fleischmann, 2021; Legendre, 2000; Zamudio, 2005). La carnivoría en *Pinguicula* se basa en la presencia de dos tipos de glándulas: sésiles y pedunculadas. El número de glándulas varía dependiendo de la especie, en la mayoría de las especies se encuentran en la parte superior o adaxial de la hoja, en algunas especies también se encuentran en los pedúnculos florales, en la flor o los sépalos. Las glándulas pedunculadas secretan un mucílago pegajoso que es responsable de atrapar a las presas. Solo juegan un papel menor en la digestión, que se lleva a cabo principalmente por las glándulas sésiles. (Vassilyev y Muravnik, 1988; Legendre, 2000).

Las hojas de los individuos del género constituyen un sistema altamente eficiente para la captura de presas, además las hojas exhiben movimientos, una propiedad poco común dentro de las plantas carnívoras. Estos movimientos suceden lentamente y pueden tardar horas o días para completarse, es probable que estos ayuden a mantener las secreciones de las glándulas en

contacto con la presa. Estos movimientos se dan en diferentes fases: i) Cuando la presa se adhiere a la hoja, las células pedunculares cercanas pierden turgor para mantener a la presa en mayor contacto con la hoja. ii) Las células pedunculares forman un pequeño cuenco donde se pueden acumular las secreciones para envolver a la presa. Si la presa se encuentra cercana a los márgenes de la hoja, esta se plegará para cubrir por completo a la presa (Legendre, 2000).

Todas las especies exhiben flores solitarias muy llamativas (a excepción de *P. ramosa* que produce de 2 a 3 flores por pedicelo). Las flores aparecen con la primera roseta de hojas del año en las especies que crecen en clima templado y pueden aparecer con el segundo conjunto de hojas en las especies que crecen en regiones tropicales. La corola puede ser blanca, rosa, morada, lavanda, violeta, amarilla o una combinación de estos con vetas más o menos pronunciadas. El cáliz está formado por cinco sépalos que son a menudo verde o morado y más pequeño que los pétalos. En muchos casos el piso de la garganta desarrolla un paladar peludo. Se producen vainas de semillas redondas, elipsoides o puntiagudas. Las semillas rara vez superan el doble del tamaño de los sépalos y albergan de 20 a 100 semillas (Legendre, 2000).

Las flores de *Pinguicula* se polinizan principalmente por insectos. Los insectos pequeños llegan al labio inferior de la corola, que tiene en el punto de llegada algunas marcas específicas o paladares coloreados. Los insectos tocan primero con su trompa el estigma que más o menos cubre las anteras, y después las anteras. En el espolón de la flor se encuentra con frecuencia una sustancia mucosa libre de azúcar, excretada de las células de la epidermis interior. Los insectos se alimentan del polen que cuelga sobre las estructuras glandulares, los cuales sirven de alimento también (Casper, 1966). Las especies del género de Centroamérica y México se caracterizan por una enorme divergencia en el tamaño y color de las flores y son polinizadas por mariposas, moscas, abejas y colibríes. Los tricomas florales juegan un papel clave en la interacción planta-polinizador (Lustofin *et al.* 2023).

C. Medio de cultivo, esterilización y siembra de semillas

El medio MS (Tabla B) simula las condiciones de suelo y es uno de los medios más comúnmente usados en cultivo *in vitro* (Phillips y Garda, 2019), debido a que cubre las necesidades nutricionales de muchas especies de plantas, incluyendo las plantas carnívoras. Se puede mejorar la eficiencia de este medio de cultivo ajustando las concentraciones y la suplementación de hormonas dependiendo de la especie (Macedo *et al.* 2020).

La esterilización de semillas se realizará en tubos eppendorf con ayuda de una micropipeta de 200 µl: hipoclorito de sodio al 20% (Cloro comercial) (Vórtex: 15 minutos). Enjuagar con agua destilada estéril tres veces. Se retira el cloro y se enjuaga con agua destilada estéril tres veces, y se conserva en el tubo el agua del último lavado. La semilla se siembra en el medio con el residuo del último lavado de agua destilada (Grevenstuk y Romano, 2012; Martínez, 2017; Gonçalves *et al.* 2008).

La siembra de semillas se realiza en medio MS reducido a ¼ (Annis, 2013; Pérez-Sánchez, 2017; Grevenstuk y Romano, 2012), en campana de flujo laminar en condiciones asépticas, se realiza con ayuda de una micropipeta, absorbiendo líquido con semillas y colocándolo en toda la superficie de la caja gota a gota. Posteriormente se cierra cada caja con plástico Parafilm y se etiquetan con el tipo de semilla y la fecha. Para corroborar que se hayan depositado las semillas en el medio, se realizará un segundo conteo de semillas bajo microscopio estereoscópico debido al reducido tamaño de las semillas.

Tabla B. Ingredientes de Medio MS comercial PhytoTech Labs al 100%: 4.36 gramos de sales/lit	
Ingredientes	Porcentaje
Nitrato de amonio	37.41%
Nitrato de potasio	43.18%
EDDHA férrico sódico	2.2%
Cloruro de cobalto, hexahidrato	0.0006%
Sulfato de cobre, Pentahidrato	0.0006%
Molibdato de sodio (VI), Dihidrato	0.0057%
Sulfato de manganeso, Monohidrato	0.38%
Yoduro de potasio	0.019%
Ácido bórico	0.14%
Extraído de: https://phytotechlab.com/murashige-skoog-modified-basal-salt-mixture-m407.html	

D. Análisis de suelo en poblaciones de estudio

Tabla D. Análisis de suelo en poblaciones de <i>Pinguicula crenatiloba</i> en el estado de Michoacán									
	URUAPAN			MORELIA			PÁTZCUARO		
Análisis físicos									
Clase textural	Arcilloso (Suelo pesado)			Franco (Suelo medio)			Franco arcilloso (Suelo medio)		
Análisis químicos									
	ppm	kg/ha	Interpretación	ppm	kg/ha	Interpretación	ppm	kg/ha	Interpretación
Fósforo	24	45	Bajo	79	176	Alto	48	95	Adecuado
Potasio	144	270	Adecuado	64	143	Bajo	144	206	Adecuado
Calcio	200	375	Deficiente	250	556	Deficiente	650	1300	Bajo
Magnesio	1080	2025	Alto	270	600	Adecuado	1410	2820	Alto
Carbonatos	1100	2063	Alto	1900	4222	Alto	5	11	Alto
Nitrógeno mineral	76	143	Adecuado	26	57	Bajo	50	101	Adecuado
pH en agua	5.6 (Lig. Ácido)			4.8 (Muy ácido)			5.6 (Lig. Ácido)		
Cationes intercambiables									
	meq/100g	%	Interpretación	meq/100g	%	Interpretación	meq/100g	%	Interpretación
Potasio	0.4	3.5	Insuficiente	0.2	4.4	Suficiente	0.4	2.4	Insuficiente
Calcio	1	9.5	Insuficiente	1.3	33	Insuficiente	3.3	21	Insuficiente
Magnesio	9	85.9	Insuficiente	2.3	60	Insuficiente	11.8	75.9	Insuficiente
C.I.C	10.5		Media	3.8		Baja	15.5		Media
Análisis realizados en el Instituto Tecnológico del Valle de Morelia									