

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología



NovaFlora Inc.

Compatibilidad sexual en cruces intraespecíficos e interespecíficos de
Penstemon

Informe para optar por el título de Ingeniería en Biotecnología con el
grado académico de Bachiller.

Agustín Víquez Zamora

Cartago Junio, 2010

COMPATIBILIDAD SEXUAL EN CRUCES INTRAESPECÍFICOS E INTERESPECÍFICOS DEL GÉNERO *PENSTEMON*

Agustín Víquez Zamora*

RESUMEN

La industria moderna de plantas ornamentales se describe como un negocio sofisticado, de alta inversión, que se ha llegado a posicionar como un bien de gran valor económico en el comercio mundial, desarrollándose bajo un escenario dinámico y sumamente competitivo. El presente estudio tuvo como objetivo general determinar la compatibilidad sexual de cruces intra- e inter-específicos en el género ornamental *Penstemon*. Se estudió la cronología del desarrollo floral en 3 especies de *Penstemon*, a partir de donde se construyó una guía visual para relacionar la apariencia y el tamaño de la flor con su estado de desarrollo. También se registró la cronología de dehiscencia del polen en las mismas 3 especies. Se realizaron un total de 4 cruces recíprocos, 4 cruces no recíprocos y 2 auto-polinizaciones entre 6 cultivares de 3 especies de *Penstemon*. Se encontró alto éxito unilateral en 3 cruces recíprocos, alto éxito bilateral en un cruce recíproco, bajo éxito en un cruce no recíproco y alto éxito en una auto-polinización, definiéndose éxito como el crecimiento frutal tras la polinización. Al término de este estudio, fue posible la colecta de las semillas de un fruto maduro, y se llegó a la conclusión de que se trataba de semillas inviables. También se infirió que las semillas de los frutos restantes, podrían ser también semillas inviables. Diversas causas y factores son propuestos y discutidos como los responsables del fracaso de los cruces realizados.

Palabras clave: *Penstemon*, desarrollo floral, dehiscencia, compatibilidad sexual, hibridización.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

SEXUAL COMPATIBILITY IN CROSSES WITHIN THE *PENSTEMON* GENUS

Agustín Víquez Zamora*

ABSTRACT

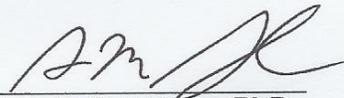
Modern ornamental horticulture and nursery industry is now described as a sophisticated, high investment business that has become an important commodity with a great economic value in the global horticultural trade, being in a very dynamic and competitive scenario. The main objective of the current study was to determine the sexual compatibility in crosses within the *Penstemon* genus. Timing of floral developmental process was studied in three *Penstemon* species, and a visual key was constructed as a basic guide to relate flower appearance and size to its developmental stage. Also, pollen dehiscence timing was recorded in those species. Four reciprocal crosses, four non-reciprocal and two self-pollinations were performed, using six cultivars from three *Penstemon* species. High unilateral fertilization success was found in 3 reciprocal crosses, high bilateral fertilization success was found in one reciprocal cross, low success was reported in a non-reciprocal cross and a single self-fertilization treatment showed high success. Success was defined as noticeable fruit growth after pollination. By the end of this study, only seeds from a single ripe fruit were collected, and it was concluded that were non-viable seeds. It was hypothesized that seeds from the remaining, unripe fruits were also non-viable. Several factors that had possibly caused cross failure are proposed and discussed.

Key words: *Penstemon*, floral developmental process, dehiscence, sexual compatibility, hybridization.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

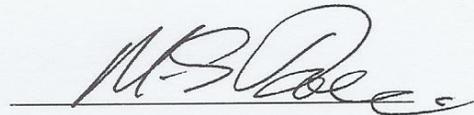
Miembros del Tribunal



**Michele Scheiber, PhD.
Project Advisor - NovaFlora Inc.**



**MSc. Giovanni Garro Monge,,
Academic Advisor - ITCR**



**Michael Dobres, PhD.
Reader - NovaFlora**

DICATORIA

A Dios y a mi familia

Agustín.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a todo el equipo NovaFlora, quienes me enseñaron una lección invaluable de ciencia y de vida. Para Mike y Michele; gracias por su paciencia, tiempo y enseñanzas, y para Jessica y Yaisa; gracias por todo los buenos momentos que pasamos, tanto en la empresa como afuera.

Gracias al MSc. Geovanni Garro, quien me ofreció esta gran oportunidad y me ayudó cada vez que lo necesitaba.

A Drew, Jordan y Hugo, por permitirme vivir junto a tan excepcionales compañeros, haciéndome sentir como en casa en un país y una cultura nueva.

Muchas gracias a Papi, Mami, Carlos, Daisy, Paquita y Tía Marta por apoyarme en cada momento durante esta exigente pero hermosa experiencia.

Sumamente agradecido con el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) del gobierno de Costa Rica, quien me apoyó económicamente para alcanzar esta meta tan importante.

DEDICATORY

Dedicated to God and my family.

Agustín.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks to all the NovaFlora team, which taught me invaluable lessons of science and life. Mike and Michele thanks for your patience, time and teachings, and Jessica and Yaisa; for all the great time we had, the unforgettable moments, inside and outside the company.

Special thanks to MSc. Giovanni Garro, who gave the opportunity to accomplish this project and helped me every time I needed.

To Drew, Jordan and Hugo, for being such an amazing housemates and made me felt comfortable in a new country and culture, as if I were in my own home.

Thanks to Dad, Mom, Daisy, Carlos, Paquita and Uncle Marta, who always encouraged me to keep going in this demanding but beautiful experience.

A special acknowledgement to the Science and Technology Ministry (MICIT) of the Costa Rican Government, who gave me the economic support to achieve such an important goal.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT.....	3
ACREDITACIÓN.....	Error! Bookmark not defined.
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE GENERAL.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
INTRODUCCIÓN	11
REVISIÓN DE LITERATURA	15
<i>Penstemon Mitchell</i>	15
Hibridización.....	20
Hibridización en <i>Penstemon</i>	27
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Material vegetal.....	30
Registro del desarrollo floral y construcción de una guía visual.....	34
Longitud de estilos.....	35
Cronología en la dehiscencia del polen.....	35
Polinizaciones	36
Fertilización exitosa	37
Crecimiento frutal.....	37
Colecta de frutos maduros y observación de las semillas obtenidas	37
RESULTADOS.....	38

DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Descripción botánica de <i>Penstemon</i>	15
2	Técnicas utilizadas para superar barreras de incompatibilidad	24
3	Nombre y características de los cultivares de <i>Penstemon</i> utilizados.	28
4	Desarrollo floral de tres cultivares de <i>Penstemon</i> .	37
5	Largo de los estilos de 4 cultivares de <i>Penstemon</i> .	42
6	Cronología de dehiscencia del polen en 3 cultivares de <i>Penstemon</i> .	43
7	Número de set, fecha de polinización, cruce realizado, tipo de cruce, cantidad de polinizaciones realizadas, cantidad de frutos en crecimiento y porcentaje de fertilizaciones exitosas.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Secuencia de paso de la fase masculina a la femenina en un flor de <i>Penstemon</i> .	18
2	Número de flores abiertas en tres cultivares de <i>Penstemon</i> a lo largo del período de observación.	38
3	Flores y brotes de tres especies de <i>Penstemon</i> en diversos estados del desarrollo floral. A) <i>P. barbatus</i> 'Rondo', B) <i>P. smallii</i> y C) <i>P. ×mexicali</i> 'Miniature Bells'.	39-41
4	Proceso de dehiscencia en las anteras de tres especies de <i>Penstemon</i> .	44
5	Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 1. A) Longitud. B) Ancho.	50
6	Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 2. A) Longitud. B) Ancho.	51
7	Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 3. A) Longitud. B) Ancho.	52
8	Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 4. A) Longitud. B) Ancho.	53
9	Comparación entre semillas obtenidas del estudio actual (A) y cruces preliminares (B, C); A) Semillas tentativas obtenidas del cruce <i>P. ×mexicali</i> 'Sunburst Ruby' × <i>P. barbatus</i> 'Rondo', B) Semillas de flores no manipuladas de <i>P. ×mexicali</i> 'Sunburst Ruby', C.1) Semillas de flores no manipuladas de <i>P. barbatus</i> 'Navigator', C.2) Semillas tentativas del cruce <i>P. barbatus</i> 'Navigator' × <i>P. smallii</i> 'Violet Dusk'.	54

INTRODUCCIÓN

Los orígenes del fitomejoramiento se remontan a miles de años con la selección de plantas y la colecta de semillas en los primeros sembradíos de los asentamientos primitivos. En términos generales, el principal objetivo del fitomejoramiento es, como su nombre lo indica, mejorar la calidad, diversidad y desempeño de los cultivos (The British Society of Plant Breeders, s.f.).

Queda claro que las primeras plantas sometidas a la domesticación y el mejoramiento fueron antiguos cultivos utilizados como fuente de alimentación y medicina natural (denominada agricultura funcional). Pero junto a estas, las plantas ornamentales conformaron los tres pilares de la agricultura tradicional. La historia del cultivo de plantas ornamentales data del siglo 16 A.C. en Egipto y el siglo 20 A.C. en China, pasando por los jardines monásticos de la edad media hasta el surgimiento del interés por las flores en Gran Bretaña a mediados del siglo 18 D.C., durante la sociedad Victoriana (Zhou, 1995).

La industria moderna de plantas ornamentales se describe como un negocio sofisticado, de alta inversión, que se ha llegado a posicionar como un bien de gran valor económico en el comercio mundial. La producción global de ornamentales ha crecido constantemente durante los últimos 20 años, pasando de \$11 billones en 1985 a un estimado de \$60 billones en el 2003. Europa es el mayor productor y comercializador, seguido por los Estados Unidos, el cual ha incrementado enormemente su participación en el mercado durante la década pasada (Van Uffelen y De Groot, 2005). En los Estados Unidos para el año 2003 las plantas ornamentales eran el cuarto cultivo en importancia (Daughtrey y Benson, 2005). Las ventas totales, tanto de invernaderos como viveros, alcanzó los \$16.9 billones, incrementando en un 33% de 1996 al 2006 (Jerardo 2007). En este mismo país, la industria ornamental se encuentra entre los 5 bienes más consumidos en 27 estados y entre los 10 bienes más consumidos de 42 estados, además de que la jardinería es considerado el hobby número uno entre los estadounidenses (Comis, 2000).

La industria ornamental se desarrolla bajo un escenario dinámico y de alta competitividad. La variedad de diseños, colores, hábitos y usos puede observarse cada vez que nuevas variedades son introducidos al mercado. Los fitomejoradores, coleccionistas de plantas y jardineros,

introducen nuevas variedades que se adapten al gusto de los clientes y tratan de incorporar plantas desconocidas en las regiones donde se comercializa (Costa *et al*, 2007). Consecuentemente, existe una carrera intensa por parte de las compañías comercializadoras y desarrolladoras para incrementar su participación en el mercado, buscando nuevos nichos donde ingresar. Importantes cantidades de dinero son invertidos por parte de dichas compañías para desarrollar plantas de jardinería únicas, al mismo tiempo que la protección en propiedad intelectual estimula esta tendencia en aumento (WIPO, 2006).

Para la obtención de nuevas variedades, los fitomejoradores tienen a su disposición los recientes avances en biotecnología, genómica vegetal y mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares (Moose y Mumm 2008). Indudablemente, tecnología novedosas como estas tienen un enorme potencial y son -y continuarán siendo- una parte complementaria al mejoramiento convencional. (Jauhar, 2006). Pero, como es mencionado por García (2002), estas herramientas representan nueva tecnología que se añade, no sustituyen, al mejoramiento convencional, y comparten los mismos objetivos a largo plazo.

El fitomejoramiento tradicional se debe hacer cruces con padres cuidadosamente seleccionados, luego seleccionar la progenie con las mejores características para ser utilizados en las etapas siguientes de selección. La tarea de un fitomejorador es combinar adecuadamente las características de interés de varias plantas en una sola, y la creación de una nueva variedad se considera un proceso complejo, difícil y costoso (The British Society of Plant Breeders, *s.f.*).

Comprender el desarrollo floral es considerado un prerrequisito muy importante para el mejoramiento genético y estudios de compatibilidad sexual entre especies de plantas. Los estudios de compatibilidad sexual se basan en el uso de estigmas receptivos y polen viable. Solo utilizando estigmas y polen que se encuentran en el estado de desarrollo adecuado se puede confiar que el fallo en las hibridaciones es causado verdaderamente por incompatibilidad sexual y no por un destiempo en la cronología del desarrollo. Incluso hibridaciones altamente compatibles no producirán semilla viable si el estigma es

polinizados en etapas no receptivas, o si el polen es inmaduro o senescente. La habilidad para identificar estigmas y polen en el estado apropiado de desarrollo es por lo tanto crucial en los programas de fitomejoramiento (Douglas, 2007)

De manera general, este trabajo se encuentra enmarcado en el ámbito del fitomejoramiento convencional. El objetivo general es determinar la compatibilidad sexual entre cruces intra- e inter-específicos en el género *Penstemon*, analizando el crecimiento frutal como una señal del éxito de las polinizaciones.

El primer registro del comercio de *Penstemon* como planta de jardinería fue en Londres, a principios del siglo 19, donde se importaban y vendían semillas traídas de Norteamérica. Es muy probable, sin embargo, que el interés por cultivar *Penstemon* se diera mucho antes de la primera descripción botánica hecha por el Dr. John Mitchell en 1748 (Way y James, 1998).

Después de su introducción al mercado, el mejoramiento por medio de la hibridización se dió ampliamente, generalmente con cruces exitosos. (Viehmeyer 1958, Straw 1955, Mackaness 1959) Además, la cruce provocó la creación de cientos de variedades híbridas en Europa, principalmente derivadas de las especies *P. hartwegii*, *P. kunthii*, *P. cobaea* y *P. gentianoides*. En Norteamérica, el mejoramiento de *Penstemon* se enfocó en combinar la persistencia y virilidad de algunas especies como *P. serrulatus* con especies de flores grandes como *P. hartwegii*. Cruces entre secciones de la misma especie dio como resultado muchas nuevas variedades. Un logro importante que debe destacarse en el mejoramiento de *Penstemon* fue el desarrollo de los híbridos denominados ‘Mexicali’, los cuales combinaban las vistosas y amplias flores de los híbridos europeos con la resistencia al frío de los previamente desarrollados híbridos ‘Mexicana’ (Way y James, 1998). A pesar del relativo éxito en el mejoramiento de *Penstemon*, existen reportes de cierto nivel de incompatibilidad en algunos intentos de hibridización (Viehmeyer 1958, Mackaness 1959, Chari y Wilson 2001).

Las barreras reproductivas que causan incompatibilidad sexual pueden darse en cualquier etapa del ciclo de vida de la planta y pueden evitar cualquier intento de producir variedades nuevas. Dos especies podrían florear en diferentes épocas del año (aislamiento fenológico) o dos poblaciones de plantas podrían tener distintos insectos o factores polinizadores

(aislamiento etológico). Puede ocurrir que el polen de una especie no pueda alcanzar el estigma de otra especie (aislamiento mecánico). El polen podría no germinar, o si lo hace, el tubo polínico podría no crecer adecuadamente en el estilo (incompatibilidad). Incluso si ocurriera la fertilización, podría haber aborto de semillas híbridas o del fruto que las contiene, o las semillas podrían presentar un desarrollo inferior (aborto del embrión o falta de desarrollo del endospermo). Si las semillas engendradas son viables podría ocurrir que la progenie híbrida no se desarrolle vigorosamente (mal desempeño de la progenie F_1). O la progenie F_1 podría tener un desarrollo adecuado pero pueden resultar estériles debido a un fallo en los procesos meióticos de sus gametos (esterilidad híbrida) Finalmente, la hibridización podría tener buenos resultados en sus primeras generaciones pero su desarrollo podría limitarse en las progenies subsiguientes cuando se da nuevas recombinaciones génicas y los complejos de genes coadaptados son alterados (mal desempeño de las progenies F_2 y subsiguientes) (Chari y Wilson, 2001).

La razón de ser de la compañía NovaFlora Inc. se encuentra en el desarrollo de nuevas variedades ornamentales, como es el caso del género *Penstemon*, entre muchos otros. Este desarrollo va acorde a la necesidad de satisfacer la elevada exigencia de los clientes con intereses en la jardinería. La compañía le brinda el servicio de investigación, desarrollo e innovación a uno de los viveros más grandes de la costa este de los Estados Unidos; The Conard-Pyle Company, con más de 100 años de participar en este complejo mercado (The Conard-Pyle Company, 2009). Este estudio va dirigido a apoyar el esfuerzo e inversión de la compañía para liberar al mercado productos novedosos que incrementarán su competitividad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Penstemon Mitchell

Taxonomía y distribución

El género *Penstemon* Mitchell, con cerca de 271 especies, es el mayor género endémico de Norteamérica. Se encuentra distribuido desde Alaska hasta Guatemala, y abarca de una costa a la otra. En los Estados Unidos, la mayoría de las especies se encuentran en la cordillera oeste (Wolfe, 2006). El centro de diversidad de *Penstemon* es el estado de Utah en los E.U.A., donde se han encontrado cerca de 70 especies. El número de especies endémicas disminuye en los estados circundantes; 35-50 especies en los estados continuos a Utah y 10-25 especies en el anillo siguiente de estados para finalmente encontrarse unos pocos ejemplares en Alaska, el este de los E.U.A y el sur de México. Por supuesto, el comercio actual de plantas ha ayudado a su expansión a nivel mundial llevando especies de *Penstemon* hasta países tan lejanos como Australia y Nueva Zelanda (Way y James, 1998).

Penstemon fue primeramente clasificado como miembro de la familia Escrofulariáceas (Straw 1966), permaneciendo en dicho taxón por un largo tiempo hasta que recientes estudios taxonómicos basados en relación genética por biología molecular ha reposicionado a *Penstemon* en la familia de las Plantaginaceas (Cuadro 1) (Albach *et al* 2005, Shehata 2006).

El género se divide en 6 subgéneros, dos de los cuales son monotípicos (es decir, solo poseen una especie. Estos son los subgéneros *Cryptostemon* y *Dissecti*). Los otros cuatro subgéneros son *Penstemon* (aprox. 182 spp.), *Habroanthus* (aprox. 50 spp.), *Saccanthera* (aprox. 28 spp.), and *Dasanthera* (aprox. 9 spp.). Existe una gran diversidad morfológica en y entre los subgéneros con distintos hábitos, diferentes tipos y formas de flores, hojas y tallos. Por ejemplo, la mayoría de las especies en el subgénero *Dasanthera* son sufrútices (arbustivos) mientras en el subgénero *Saccanthera* posee especies con un caudex leñoso y la sección *Ericopsis* subsección *Caespitosi* forman pequeños “mats” o alfombras (Wolfe, 2006).

Cuadro 1. Descripción botánica de *Penstemon*. (Basado en USDA 2009 con modificaciones de Stevens 2001-2009)

Reino	Plantae - Plantas
Subreino	Tracheobionta– Plantas vasculares
Superdivisión	Espermatófita– Plantas con semilla
División	Magnoliófito – Plantas con flores
Clase	Magnoliópsida– Dicotiledóneas
Subclase	Asteridae
Orden	Plantaginales (Lamiales)
Familia	Plantaginaceae
Género	<i>Penstemon</i> Mitchell – “Lengua vellosa”

Morfología de la planta y la flor

Las plantas del género *Penstemon* pueden tener un hábito herbáceo, arbustivo o sub-arbustivo con una altura de 10 cm hasta 3 m. Algunas especies de hábito herbáceo conforman rosetas fuertes y persistentes, otras pierden su forma de roseta con el paso de la estaciones mientras otras forman crestas o penachos sin roseta.

Los híbridos europeos se derivan de especies mexicanas con hábito arbustivo o sub-arbustivo, poseen una estructura rameal leñosa y los híbridos pueden desarrollar un hábito arbustivo si se mantienen inalterados en su hábitat natural (Way y James, 1998).

Una amplia variedad de formas, colores y texturas pueden encontrarse en sus hojas. Son comunes los bordes serrados, con gran cantidad de tipos de dientes, y diversas formas pueden encontrarse en una misma especie e incluso en una misma planta. Especies desérticas poseen hojas gruesas, parecidas a plantas suculentas o xerófitas (Way y James, 1998).

Las flores se localizan en racimos largos que comúnmente son sostenidas por un tallo con muchas hojas, aunque esta característica es menos pronunciada en especies con hábito sub-

arbustivo. Poseen un cáliz similar a una copa con 5 sépalos en forma de diente, una corola tubular con 5 pétalos unidos pero diferenciados en dos lóbulos superiores y tres inferiores, 5 estambres colocados en la parte inferior de la corola, y un ovario bilocular ubicado en la parte superior. Uno de los 5 estambres es estéril ya que no posee antera, y normalmente está cubierto largos vellos que sobresalen de la corola, característica que le da su sobrenombre de “lengua velluda” (Meyer 2008).

La forma tubular de la corola no varía, pero el largo y ancho de la flor puede variar en tamaño; desde los 8 mm en alguna especies de altura hasta 5 cm o más in los híbridos más grandes. El largo de la corola tubular en relación con el largo de los pétalos lobulares varía considerablemente dependiendo de la especie, pero existe algunos patrones morfológicos que dividen las flores según el tipo de polinizador que visita más frecuentemente dicha planta. Las flores bulbosas con corola de garganta ancha, son comúnmente polinizadas por abejas, avispas y otros insectos, mientras aquellas con flores de corola delgada y larga son visitadas frecuentemente por colibríes (Way y James, 1998). Adaptaciones evolutivos de la morfología floral en *Penstemon*, de la misma forma a como ocurre probablemente en la mayoría de plantas con flores, ha pasado por un mecanismo de especialización dirigido a llamar la atención del polinizador más efectivo. Sin embargo, a pesar de que casi todos las *Penstemon* están adaptados para ser polinizados normalmente por abejas o colibríes, también puede ser polinizados por una amplia gama de otros insectos o animales (Lara y Ornelas 2008, Castellanos *et al* 2004). En cuanto a coloración, la garganta de la corola es usualmente blanca, con múltiples especies que tienen hasta cinco venas coloreadas en los tres lóbulos inferiores. Dichas rayas son conocidas como elemento atrayente de polinizadores y una forma de guía hasta los nectarios en la base del túbulo. Los estambres pueden sobresalir más allá de la boca de la corola. El estaminoide varía de color, largo y forma de la punta entre especies, pero en cuanto a la distribución y tamaño de vellosidades sí es muy parecido (Way y James, 1998). La mayoría de especies florea en primavera o al principio del verano, mientras algunas lo hacen a mediados del verano (Meyer 2008).

Biología reproductiva de *Penstemon*

La reproducción sexual de *Penstemon* abarca desde la casi completa auto-incompatibilidad en, por ejemplo, *P. haydenii* (Tepedino *et al.* 2006), auto-incompatibilidad parcial, como en *P. barbatus* (Lange *et al.* 2000) hasta una autogamia parcial. Aunque la mayoría de especies en *Penstemon* son auto-compatibles y los estigmas son fisiológicamente receptivos a la hora de la dehiscencia del polen, las auto-polinizaciones son minimizadas por la posición superior del estigma con respecto a las anteras (Clements *et al.* 1999, Tepedino *et al.* 1999).

Las flores son protándricas, teniendo la fase masculina antes que la fase femenina. Esto quiere decir que el polen comienza a esparcirse antes de que el estigma esté en su punto más receptivo, pero es traslape de las fases en una misma planta es común. Las flores se mantienen en la planta de 5 a 6 días, sin importar si fueron o no visitadas por polinizadores. La fenología y comportamiento de la flor, estilo y estigma, durante este tiempo es descrito a continuación: en el día que ocurre la antesis, el estigma y estilo se encuentran erectos, sobre los estambres, junto a la superficie de los pétalos superiores. En este momento, el estigma no se encuentra en la mejor posición para hacer contacto con los insectos que entren a la flor. En el segundo día, los 3-4 mm ubicados en la parte distal del estilo empiezan a curvarse hacia abajo. En el tercer día el estilo completa su curvatura, habiéndose doblado en este momento casi unos 90°. La superficie del estigma se ha expandido cerca de 1 mm². En el quinto día, la corola se empieza a aflojar y suavizar, ocurriendo la abscisión de esta en quinto o sexto día. El estilo permanece sujeto al ovario durante toda la temporada (Figura 1) (Clements *et al.* 1999, Tepedino *et al.* 1999).

Receptividad del estigma

Muchos autores concuerdan con que el estigma de *Penstemon* se encuentran fisiológicamente receptivos al polen desde el principio de la antesis hasta tres días después, cuando este comienza a curvarse hacia abajo. También, se ha reportado ninguna diferencia significativa en la producción de frutos entre flores polinizadas el primer, segundo o tercer día después de la antesis. (Abruzzo y Ault, *s.f.*, Tepedino *et al.* 1999, Chari y Wilson 2001, Tepedino *et al.* 2006)

Dehiscencia del polen

Algunos aspectos temporales se han establecido con respecto al proceso de dehiscencia del polen en flores de *Penstemon*. En el día en que la flor se abre (Día 1), el par de anteras ubicados distalmente muestran signos de dehiscencia, mientras que las anteras proximales están cerradas aún. Las anteras proximales comenzarán a descargar polen en el segundo día, en conjunto con las anteras distales. Ya para el tercer día, normalmente solo las anteras proximales se encuentran descargando polen, mientras las distales han dejado de hacerlo, pudiendo o no haberse abscido sus anteras vacías. En el cuarto día, ninguno de los dos pares de anteras mostrará más polen (Figura 1) (Clements *et al* 1999).

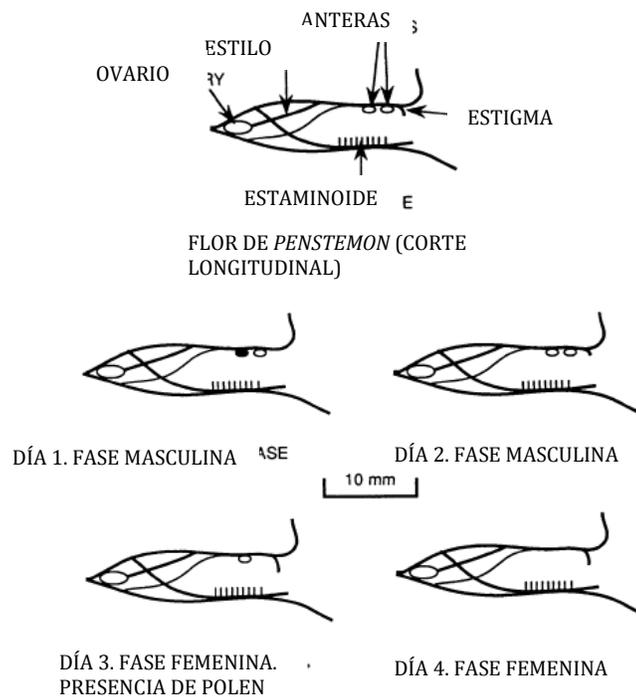


Figura 1. Secuencia de paso de la fase masculina a la femenina en un flor de *Penstemon*. Solamente una antera de cada par es mostrada; el par distal (más cercano a la boca de la corola) y el par proximal (cercano al ovario); ambos se encuentran en la parte superior de la corola. La imagen fue tomada de Clements *et al* (1999).

Desarrollo del fruto y la semilla

Los ovarios, una vez ocurrida la fertilización, desarrollan dos lóculos, y una vez maduros, se abren en la punta y algunas veces en los lados. La cápsula frutal ya entrada en madurez comienza a abrirse después de 6 a 8 semanas de ocurrida la polinización, madurando primero las que se encuentran en la base de la inflorescencia. Las semillas pueden presentar una coloración grisácea o negra, tienen forma angular y se suelen dispersar por viento (Meyer 2008).

El género *Penstemon* posee un sistema de reproducción mixto; mientras algunas semillas y frutos son engendradas por auto-polinización (ya sea autogamia o geitonogamia), se ha reportado que significativamente más semillas son producidas tras polinización cruzada (Lewinsohn y Tepedino 2007, Clements *et al* 1999).

No se encontraron reportes de agamospermia u otro tipo de reproducción asexual en los frutos y/o semillas. Por el contrario, Clements (1999) asegura que la agamospermia en *P. tenuiflorus*, *P. lemhiensis* o *P. hirsutus* se consideró sin importancia alguna.

Hibridización

Fitomejoramiento

Los primeros domesticadoras y agricultores pudieron haber notado fácilmente las diferencias radicales de propagar plantas por medios asexuales, en contraste con la propagación por semillas. Las plantas propagadas por medio de las estructuras vegetativas, como rizomas o estolones, son fenotípicamente y genéticamente idénticos entre sí y también con sus padres. Por el contrario, cuando se produce por semillas, la descendencia es una mezcla desconcertante de diferentes tipos (Allard 1999).

Los métodos de fitomejoramiento generalmente son determinados por la polinización o la biología reproductiva de la planta con la cual el mejorador está trabajando. Las plantas pueden dividirse generalmente en tres clases: de especies autógamias, de polinización libre o cruzada y apomícticas. Las semillas de las plantas apomícticas se forman a partir de un proceso asexual que se produce en el ovario sin la fusión de gametos femenino y masculino. La autofecundación (autogamia) se produce de forma natural en cultivos de especies autógamias y se puede hacer por polinizaciones manuales en los cultivos de polinización cruzada. El mejoramiento de líneas puras se asocia normalmente con los cultivos de especies autógamias, que se definen como "plantas genéticamente puras u homocigotas resultantes de la continua endogamia o autopolinización" (Baenziger *et al* 2004).

Probablemente las primeras plantas cultivadas fueron mayoritariamente las gramíneas y leguminosas de semilla grande con flores cleistógamas pequeñas, las cuales naturalmente producían buenos rendimientos de semillas alimenticias. Ya que las flores cleistógamas se autofecundan mientras que la flor se encuentra cerrada, esto promueve la homocigosidad entre los linajes seleccionados, al mismo tiempo que se creaban las primeras líneas puras, probablemente sin ningún conocimiento de los cultivadores (Allard 1999).

Hibridización

Las consecuencias de la hibridación han intrigado a los científicos durante siglos. A finales de 1700, Linneo sugirió que la hibridación puede conducir a la formación de nuevas especies, y Mendel hizo afirmaciones similares a finales de 1800. Se propuso entonces que la hibridación facilita la transferencia de rasgos entre las especies, un proceso que se conoce como hibridación introgresiva. También se sugirió que la hibridación y la introgresión podrían promover el cambio evolutivo de adaptación. La hibridación y la introgresión son características generalizadas de muchas de las poblaciones naturales de plantas y se cree que el 70% de todas las especies de plantas con flores se originaron a través de la hibridación (Orians 2000).

Los híbridos resultan del cruce entre dos plantas genéticamente distintas, ya sea de forma natural en las poblaciones de plantas silvestres o cuando los fitomejoradores y genetistas manualmente producen cruces entre progenitores seleccionados. La importancia relativa de los híbridos varía entre las especies de plantas, pero en casi todos los casos híbridos implican un mejoramiento en la población. En las plantas alógamas (las cuales normalmente se reproducen por polinización cruzada) cada nueva semilla que se produce es teóricamente un híbrido, debido a la unión de gametos entre los progenitores masculinos y femeninos, proveniente de distinto individuos. A excepción de casos específicos, la frecuencia de los híbridos es menor en las especies autógamas (las cuales se reproducen por auto-polinización). En la mayoría de los programas de fitomejoramiento, se producen híbridos entre los padres élite para desarrollar poblaciones F2 ya sea por autopolinización o por cruces entre plantas de la progenie híbrida F1. Se inicia un proceso de autopolinización y selección dentro de las poblaciones F2 para desarrollar líneas puras que pueden utilizarse como líneas puras per se si se trata de plantas autógamas o como padres para nuevos cruces, si se trata de especies alógamas. Los híbridos de especies autógamas son vehículos para desarrollar poblaciones segregantes en que luego, se seleccionarán nuevas líneas puras. Los híbridos provenientes de plantas alógamas son a menudo el punto de partida para el desarrollo de líneas puras que, en último término, servirán como padres para producir nuevos híbridos (Hallauer 2004).

Hibridización interespecífica

La mejora genética de algunas plantas cultivadas ha implicado la incorporación de genes útiles de otras especies. Se han desarrollado nuevos tipos de plantas en las cuales se considera que ha ocurrido la fusión entre los complementos cromosómicos de dos especies cultivadas. La hibridización interespecífica es considerada de gran importancia por los fitomejoradores interesados en el desarrollo de cultivares, representando nuevas oportunidades y desafíos. La mejora por transferencia de genes de una especie cultivada o no cultivada a otra especie involucra a dos factores: la obtención de semillas viables o de propágulos vegetativos en las generaciones F1 y subsiguientes, y la eliminación de características indeseables de las especies del donante (Fehr 1991).

El nivel de dificultad en desarrollar nuevos cultivares generalmente está relacionado con el número de caracteres indeseables en los padres. La primera escogencia de material parental para la mayoría de fitomejoradores corresponde a cultivares o líneas experimentales con características cuantitativas y/o cualitativas deseables. Si no se pueden encontrar las características y genes deseados en líneas cultivadas élite, el fitomejorador buscará un genotipo con la menor cantidad de características no deseadas. Los genotipos de especies cultivadas son evaluados primero, y se le denomina a este grupo “pool génico# primario, donde es muy probable que su hibridización resulte en la producción de semilla viable. Si no se encuentran un genotipo deseable, se pasará a buscar los “pooles génicos” secundarios y terciarios (Fehr 1991).

Los “pooles génicos” secundario y terciario hacen referencia a parientes silvestres, los cuales representan un reservorio importante de genes útiles y ofrecen un enorme potencial para introducir dichos genes en las especies cultivables. La hibridización interespecífica ha sido un método importante para ampliar el pool génico de los cultivos (Brar 2004).

Fracaso de cruces interespecíficos.

La hibridización interespecífica es una herramienta tradicional para combinar genes útiles de distintas especies de interés, pero existen diversas barreras que pueden limitar dichos cruces. Como se mencionó anteriormente barreras de aislamiento reproductivo pueden ocurrir en cualquier etapa del ciclo reproductivo de la planta: aislamiento ecológico (dos especies se desarrollan bajo distintos hábitats o nichos ecológicos), aislamiento fenológico, mecánico, entre otros (Chari y Wilson, 2001).

El fracaso de los cruces interespecíficos está principalmente atribuido a barreras pre- or post-fertilización. Las barreras de pre-fertilización, como su nombre lo dicen, evitan la fertilización del rudimento seminal por parte las células espermáticas y por ende, formación de semilla y embrión. Por otro, en las barreras post-fertilización sí se da fertilización del óvulo, pero las semillas híbridas se forman sin embrión o con embrión y/o endospermo abortivo y/o deficiente, además de alteraciones en las generaciones siguientes (Liu *et al* 2006). La ausencia de fertilización es el primer fallo que evita los cruces interespecíficos. Existen varios factores que pueden evitar la fertilización: polen no viable, crecimiento insuficiente del tubo polínico o incapacidad de los gametos masculinas para alcanzar el saco embrionario y fecundar las células huevo o centrales (Fehr 1991).

Un crecimiento anormal del embrión o del endospermo pueden dares tras una fertilización exitosa del óvulo. La malformación de semilla se puede dar por: A) Interacciones negativas entre los genes de las dos especies, lo cual interfiere en la división celular y diferenciación. B) Interacción desfavorable entre genes citoplasmáticos y nucleares en las células cigóticas. C) La proporción génica entre embrión, endospermo y tejido materno puede no ser el adecuado. D) El número de óvulos fertilizados puede no ser el adecuado para evitar la abscisión temprana de flor o fruto (Fehr 1991).

El emparejamiento inadecuado de cromosomas en la meiosis puede provocar que la progenie híbrida sea estéril. Cuando esto ocurre, el núcleo de los gametos puede tener un número variable de cromosomas de cada genoma. La probabilidad de que un núcleo tenga un juego completo de cada genoma es pequeña, resultando en un alto número de gametos no funcionales. Por lo tanto, se esperaría una pequeña cantidad de semillas (o ninguna semilla) tras la auto-polinización de las flores (Fehr 1991).

El fenómeno de mal desempeño de la progenie se refiere a la situación en que la progenie F_1 es fértil pero las descendientes de esta en la F_2 o generaciones posteriores son débiles o estériles (Brar 2004). Dos causas de este mal desempeño se han propuesto: A) Alelos homocigotas dominantes en distintos loci pueden favorecer el desarrollo en una especie, mientras que los alelos homocigotos recesivos en el mismo loci pueden favorecer a otras especies. La progenie F_1 de n cruce interespecífico podría romper las combinaciones favorables de alelos dominantes o recesivos. Las plantas F_2 que no tienen el alelo dominante en cada locus o que no eran homocigotas para los alelos recesivos podrían carecer de vigor y podrían ser estériles. B) Pequeñas diferencias estructurales que no afectaron el apareamiento cromosómico en los híbridos de la F_1 pueden existir en los cromosomas de las dos especies. La recombinación de segmentos cromosómicos durante la meiosis puede conllevar a la producción de deficiencias o duplicaciones cromosomales en los gametos de los híbridos de la F_1 . Así, el mal desempeño de la progenie híbrida ocurre si los gametos anormales son viables, pero dichas anomalías tienen efectos deletéreos en la generación F_2 (Fehr 1991).

Diversas técnicas pueden utilizarse en casi cada etapa del desarrollo para sobrepasar las barreras de incompatibilidad. Algunas de estas técnicas son mostradas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Técnicas utilizadas para superar barreras de incompatibilidad (Brar 2004).

Barrera	Técnicas
Prefertilización	
Polen no germina	<ul style="list-style-type: none"> • Remoción mecánica del pistilo seguido de la polinización manual en el corte del estilo. • Uso de polen mezclado (polen compatible muerto + polen incompatible)
Poco crecimiento del tubo polínico	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de polen mezclado • Fitohormonas • Fertilización <i>in vitro</i>
El tubo polínico es incapaz de alcanzar el estilo	<ul style="list-style-type: none"> • Acortamiento del estilo
Detención de crecimiento del tubo polínico en el estilo, ovario u óvulo.	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilización <i>in vitro</i>
Fallo en la obtención de híbridos	<ul style="list-style-type: none"> • Fusión de protoplastos
Diferencias de ploidía	<ul style="list-style-type: none"> • Duplicación de cromosomas • Uso de especies intermediarias
Postfertilización	
Semilla híbrida no viable o con poco vigor	<ul style="list-style-type: none"> • Rescate de embriones
Aborto de embriones	<ul style="list-style-type: none"> • Rescate de embriones
Aborto de embriones en etapas tempranas	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo de óvulo u ovario • Fertilización <i>in vitro</i>
Híbridos de la F ₁ mueren jóvenes	<ul style="list-style-type: none"> • Cruces recíprocos • Injertación de híbridos

	<ul style="list-style-type: none"> • Regeneración de plantas a partir de callo
Eliminación cromosómica	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del radio genómico de ambas especies • Inducción de intercambio cromosómico antes del inicio de la eliminación.
Híbridos estériles	<ul style="list-style-type: none"> • Duplicación de cromosomas (producción de anfiploides) • Retrocruce
Mal desempeño de la progenie híbrida	<ul style="list-style-type: none"> • Producir más progenie F₂

Hibridización en *Penstemon*

Híbridos naturales

Varios autores han reportado la hibridización natural de especies de *Penstemon* en parajes silvestres de los Estados Unidos, conformando lo que se denominan zonas híbridas (Koelling 1964, citado por Clements *et al* 1999, Wilson y Valenzuela 2002). La estructura de las zonas híbridas es el resultado de presión de selección endógena como por ejemplo las diferencias en los sistemas de reproducción y la compatibilidad genética, y selección exógena representado como los diferentes niveles de sobrevivencia de los híbridos basado en la selección según su adaptación al medio en que se desarrollan. (Lynn 2001).

Las zonas híbridas que aparecen naturalmente son de gran importancia ecológica y evolutiva debido a que las especies hibridizadas tienen diversas combinaciones de material genético con el potencial de influir en esas poblaciones. La existencia de grandes zonas híbridas indica la presencia de un aislamiento sexual débil. (Kimball *et al* 2008). La literatura en *Penstemon* es contradictoria, mencionando que los híbridos se pueden dar naturalmente pero es raro encontrarlos en su hábitat salvaje (Straw 1958). Por otro lado, Kimball *et al* (2008) reporta lugares donde los híbridos pueden hallarse incluso en mayor cantidad que sus padres. Ambos

autores se refieren a especies o estudiaron grupos de especies distintos, probablemente con diferente capacidad de hibridización.

Hibridización artificial

Los primeros trabajos de hibridización realizados en *Penstemon* fueron hechos por jardineros ingleses, quienes son los responsables de crear los híbridos europeos iniciales a partir de los cruces entre *P. hartwegii* [Subgénero *Penstemon*, Sección *Fasciculus*] x *P. cobaea* [Subgénero *Penstemon*, Sección *Aurator*], hace casi 100 años atrás. Desde entonces los híbridos en *Penstemon* han sido producidos extensamente. Más recientemente, el fitomejorador Bruce Meyers fue capaz de crear lo que podría ser el híbrido de *Penstemon* más estable. Él creó los híbridos Mexicali, a partir de cruces intersectoriales de varios híbridos europeos con híbridos producidos recientemente llamados Mexicana (estos producidos por el cruce entre *P. campalanatus* [Subgénero *Penstemon*, Sección *Fasciculus*] y otras especies mexicanas, principalmente *P. palmeri* [Subgénero *Penstemon*, Sección *Peltantera*] y *P. parryi* [Subgénero *Penstemon*, Sección *Peltantera*]) (Way y James, 1998)

Cruces interespecíficos e intrasectoriales en *Penstemon* fueron realizados o reportados también por Straw (1956), Viehmeyer (1958), Mackaness (1959) y Crosswhite (1965), y más recientemente por Chari y Wilson (2001) y Kimball *et al* (2008), todos con resultados variables en cuanto a su éxito. Viehmeyer (1958) menciona la clasificación en *Penstemon* según el tamaño de su semilla; en especies o secciones del género de semilla pequeña y semilla grande, entre los cuales el autor reporta cruces fallidos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la existencia de compatibilidad sexual en cruces intraespecíficos e interespecíficos del género *Penstemon*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un estudio de cronología de desarrollo floral en tres especies del género *Penstemon*
2. Establecer cruces intra- e inter-específicos entre seis cultivares de tres especies de *Penstemon*.
3. Evaluar compatibilidad sexual en cruces intra e interespecíficos de *Penstemon* mediante la determinación de cruces exitosos, desarrollo de frutos y producción de semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

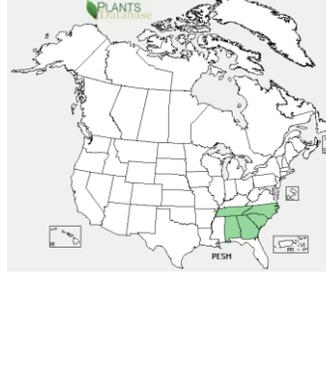
Fueron escogidas siete variedades de tres especies de *Penstemon* (*Penstemon barbatus* ‘Rondo’ y ‘Navigator’, *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ [el símbolo de multiplicar “×” junto al nombre de la especie denota su genotipo híbrido estable y reconocido], ‘Miniature Bells’ y ‘Sunburst Amethyst’, y *P. smalii* y *P. smalii* ‘Violet Dusk’) entre el banco de germoplasma de la empresa NovaFlora, para ser utilizadas en los distintos estudios. Se escogieron las plantas con mayor floración. En el mes de octubre, en el momento que empezó la estación de otoño, se colocaron las plantas sobre mats térmicos (22°C) que ayudaron a mantener las plantas a una temperatura apta para promover la floración. Se utilizaron una o dos accesiones de cada variedad, dependiendo de su disponibilidad.

Las especies utilizadas, cultivares, ilustración de las plantas y sus flores, distribución geográfica, entre otros datos son mostrados en el Cuadro 3.

Cuadro_3_Nombre y características de los cultivares de *Penstemon* utilizados.

Especies	Cultivares	Ilustración de las plantas y sus flores 1,2,3	Distribución geográfica en los Estados Unidos ⁴	Subgénero o ⁵	Sección ⁵	Descripción morfológica de la planta y la flor ⁵
<i>Penstemon barbatus</i>	Rondo			Habroanthus	Elmigera	Hábito de mat arbustivo, hojas anchas, no serradas. Flores con forma de “cabeza de tiburón”, crecen sobre panículas sin hojas de hasta 1.5 m de largo, semillas grandes ⁶ , producidas en tallos verticales ligeramente arqueados. El color varía de Rosado fuerte a coral intenso y escarlata claro.
	Navigator					

<i>P.</i> <i>×mexicali</i>	Miniature Bells		No se encuentra naturalmente.	Pens- temon	Producto de cruces interespecíficos de las secciones: Campanulati, Fasciculus, Aurator y Peltantera	Sus padres poseen un amplio rango de hábitos: desde herbáceo con flores relativamente pequeñas, influenciados por <i>P. campalanatus</i> , hasta un hábito arbustivo, ramificado leñoso, hojas y flores grandes, influenciado por los híbridos europeos.
	Sunburst Amethyst					
	Sunburst Ruby					

<i>P. smalii</i>	-					
	Violet Dusk			Pens- temon	Penstemon	Hábito herbáceo, altura de 60 cm, hojas verdes claro, algunas con bordes y venación rosada. Flores grandes color púrpura, corolas anchas con boca amplia y lóbulos inferiores prominentes.

¹Germoplasma de NovaFlora, ²www.popsignage.com, ³<http://www.wildgingerfarm.com/Penstemon.htm>, ⁴USDA, 2009, ⁵Way y James, 1998, ⁶Viehmeyer, 1958.

Registro del desarrollo floral y construcción de una guía visual

Se observaron entre 8 a 10 brotes florales inmaduros de especies de *Penstemon*: *P. barbatus* ‘Rondo’ (10 brotes), *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ (8 brotes) y *P. smalli* (9 brotes), durante un período de dos semanas, entre el 6 de octubre y 19 de octubre del año 2009, para observar su desarrollo y determinar el momento de antesis. Solamente se utilizó una planta por variedad, debido a la disponibilidad de las mismas. Conforme se avanzó en la realización del estudio, se identificaron etapas fenológicas características en las 3 especies, las cuales facilitarían el análisis del desarrollo floral. Las etapas identificadas fueron: 1) Cáliz: El cáliz encierra totalmente a la corola, 2) Apertura del cáliz: El cáliz se ha abierto y la corola posee una menor, igual o ligeramente superior longitud a la del cáliz, 3) Elongación de la corola: La corola empieza a crecer rápidamente por encima del cáliz hasta el momento de la antesis y se define la coloración de la misma, y 4) Antesis: Los pétalos se han abierto

Las mediciones se iniciaron en brotes de tamaño similar, los cuales visiblemente habían superado la etapa de Apertura del Cáliz y apenas comenzaban la etapa de Elongación de la Corola. Los brotes no fueron medidos en las etapas de Cáliz y Apertura del Cáliz, debido a razones que serán explicadas más adelante. Los brotes se midieron diariamente, entre las 8:00 a.m. y las 10:00 a.m., desde el punto de unión del pedúnculo con el cáliz hasta la punta de la corola (para medir longitud) y en el punto más ancho del brote/flor. Las mediciones se realizaban hasta el momento que ocurría la antesis. Los promedios diarios de tamaño fueron calculados con Excel (Excel 2008 para Mac, Microsoft, Redmond, WA).

Para la construcción de la guía visual, se escogieron los brotes y las flores que ilustraran a las distintas etapas de desarrollo, y fueron fotografiados con una cámara digital (Cybershot F717, Sony, Tokio, Japón). Dado que las mediciones fueron hechas primero y las fotografías se tomaron ya avanzada la época óptima de floración, no todas las etapas de desarrollo pudieron fotografiarse

Longitud de estilos

Se realizó la medición de 10 estilos en cuatro cultivares; *P. × Mexicali* ‘Miniature Bells’, *P. barbatus* ‘Rondo’, *P. smallii* y *P. smallii* ‘Violet Dusk’. Se removieron los pétalos de flores abiertas un día después de la antesis, y la medición iba desde la parte superior del ovario hasta el estigma. Los promedios fueron calculados con Excel (Excel 2008 para Mac, Microsoft, Redmond, WA).

Cronología en la dehiscencia del polen

Las flores de tres especies de *Penstemon*: *P. barbatus* ‘Rondo’, *P. ×mexicali* ‘Miniature Bells’ y *P. smallii*, fueron observados por 10 días consecutivos en el mes de octubre del 2009, para determinar el momento en que el polen comienza su dehiscencia, el número de anteras con dehiscencia y su duración entre etapas seleccionadas. Se utilizó una accesión por cultivar, debido a su disponibilidad en el germoplasma. Las flores utilizadas en este estudio provenían del estudio de desarrollo floral, dándose una continuidad entre ambos estudios por razones prácticas. Sin embargo, algunos brotes y flores se perdieron en el transcurso del estudio anterior, por lo que la cantidad de flores con las que se inició la cronología de dehiscencia varió entre especies. En *P. barbatus* ‘Rondo’ y *P. smallii* se utilizaron 10 flores, y en *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ se comenzó con 8 flores. De nuevo, algunas flores se perdieron en este estudio, por lo que los resultados presentados tiene las siguiente cantidad de repeticiones: 10 repeticiones para *P. barbatus* ‘Rondo’, 8 repeticiones para *P. smallii* y 7 repeticiones para *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’.

El registro de datos comenzó justo después que se observara la primera flor abierta (considerada esta como la hora cero), y después las anteras eran revisadas cada 3 horas para un total de 5 observaciones diarias, de 8 a.m. a 8 p.m. El registro de datos consistió en contar el número de anteras dehiscentes. Las observaciones cesaron una vez que se observaran las 4 anteras en dehiscencia. Conforme avanzaba el estudio, se asignaron algunos puntos de referencia que eran de fácil reconocimiento visual y se calcularon los tiempos promedio entre dichos puntos con

Excel (Excel 2008 para Mac, Microsoft, Redmond, WA)

Se asignaron los siguientes puntos de referencia: 1) Antesis, 2) Primera señal de dehiscencia (cuando se observaba por primera vez una o dos anteras en dehiscencia) y 3) Dehiscencia de las cuatro anteras. La duración promedio de dos períodos de tiempo, ubicados entre los puntos de vista previamente mencionados, fueron calculados; a) Tiempo transcurrido entre la antesis hasta la primera señal de dehiscencia, y b) Tiempo transcurrido entre la antesis y la dehiscencia de las cuatro anteras. Las flores escogidas fueron fotografiadas con una cámara digital (Cybershot F717, Sony, Tokio, Japón) para ilustrar las etapas de dehiscencia del polen. Para facilitar el análisis de estos tiempos, y debido a que muchas de las flores abrieron a destiempo y nunca sincronizadas como es de esperarse, la “hora cero” de todas las flores se alineó para hacer una escala de tiempo homogénea.

Polinizaciones

Se realizaron cuatro sets independientes de polinizaciones entre 6 cultivares de 3 especies de *Penstemon*, durante los meses de octubre y noviembre del 2009. Debido a la escasez de flores maduras, las polinizaciones se distribuyeron en sets, con un cierto tiempo de separación entre cada uno, a la espera del desarrollo de nuevas flores. Se realizaron de 3 a 6 polinizaciones por cruce, dependiendo de la disponibilidad de flores. Las flores fueron emasculadas y embolsadas el día previo estimado a la antesis. Las polinizaciones se realizaron el día siguiente. Las flores polinizadas fueron embolsadas con sobres de papel cristal (BioQuip Products, Rancho Dominguez, CA) y las bolsas fueron removidas dos días después.

Para la denominación de un cruce se utilizó el nombre de la especie y cultivar de ambos parientes, separados entre sí por el símbolo de multiplicar “×”. Se coloca en primer lugar (a la izquierda del lector) el nombre del pariente materno o flor receptora de polen y en segundo lugar (a la derecha del lector) al pariente paterno o donador de polen.

Fertilización exitosa

Las fertilizaciones exitosas de cada cruce son representadas por el porcentaje de los frutos que crecieron de forma visiblemente notable, a partir de todas las polinizaciones realizadas. La fórmula utilizada fue: Fertilizaciones exitosas = Número de frutos con crecimiento / Total de flores polinizadas \times 100. El cálculo fue hecho en la cuarta semana de crecimiento de los frutos, debido a que en estudios preliminares se observó que en este período de tiempo era en el que se daba el máximo crecimiento de los frutos y después de la cuarta semana, el crecimiento cesaba o disminuía. Por lo tanto, el crecimiento registrado hasta ese momento, se consideró como un buen punto de referencia para determinar si había ocurrido fertilización o no.

Crecimiento frutal.

Las mediciones en el tamaño de los frutos (ovario) comenzaron el mismo día que se realizaron las polinizaciones. El largo y ancho de los frutos fue medido con un medidor electrónico (Craftsman, Hoffman Estates, Illinois). El largo se midió desde la unión entre el ovario y el receptáculo hasta la punta del ovario, justo abajo del lado proximal del estilo. El ancho se midió en la parte más ancha del fruto u ovario. Las mediciones dejaron de realizarse el mismo día de la polinización. Debido a que la fecha inicial para cada cruce varió, el período total de medición también varió para cada set: el set 1 fue medido por 10 semanas, el set durante 8 semanas, el set 3 durante 6 semanas y el set 4 durante 5 semanas. Cada set se analizó por separado, y las diferencias entre los períodos de medición no se consideraron que afectara los objetivos por cumplir inicialmente planteados.

Colecta de frutos maduros y observación de las semillas obtenidas

Los frutos de coloración café uniforme se consideraron maduros, y fueron recolectados y disecados. Las semillas encontradas serían almacenadas en sobres de papel y refrigeradas a 4° C (Frigidaire, General Motors, Detroit, MI, USA)

RESULTADOS

Registro del desarrollo floral y construcción de una guía visual

Las flores de *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ alcanzaron la antesis antes que *P. barbatus* ‘Rondo’ y *P. smalii*, en un tiempo promedio de 8,38, 13,5 y 12 días, respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Desarrollo floral de tres cultivares de *Penstemon*.

Cultivar	Tamaño inicial (cm)		Tamaño del brote antes de la antesis (cm)		Tiempo para alcanzar la antesis (días)
	Largo	Ancho	Largo	Ancho	
<i>P. barbatus</i> ‘Rondo’ (10)	0.70±0.01	0.41±0.01	3.21±0.03	0.88±0.01	13.50±0.22
<i>P. smalii</i> (9)	0.60±0.01	0.31±0.01	2.96±0.05	0.94±0.02	12.00±0.39
<i>P. × mexicali</i> ‘Miniature Bells’ (8)	0.64±0.03	0.38±0,02	2.30±0.03	0.86±0.02	8.38±0.42

±n: Error estándar. El número en paréntesis representa el número de flores observadas.

A pesar de que el día exacto de la antesis varió entre las flores de la misma planta, la mayoría de las flores en 2 de las 3 variedades abrieron en un día específico. La mayoría de las flores en *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ abrieron el día 8 y la mayoría de *P. barbatus* ‘Rondo’ abrieron el día 14. Las mayoría de las flores de *P. smalii* abrieron en los días 12 y 14 (Figura 2).

Las flores fotografiadas para la guía visual tienen la morfología representativa de cada cultivar, junto con los cambios en color y forma característicos del desarrollo. (Figura 3)

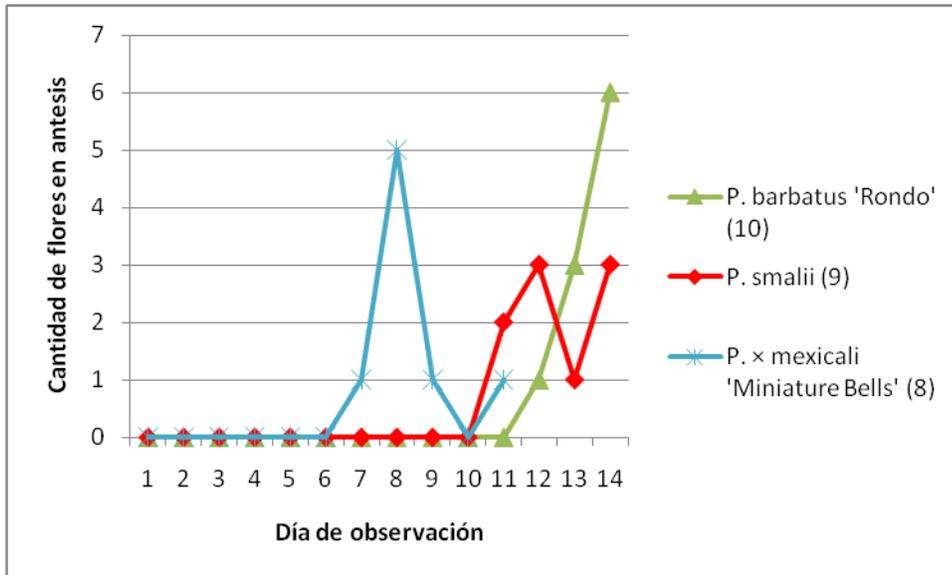
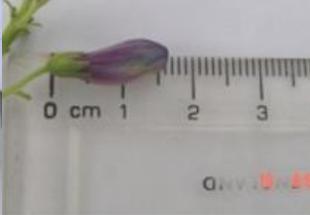


Figura 2. Número de flores abiertas en tres cultivares de *Penstemon* a lo largo del período de observación: El número en paréntesis representa la cantidad de flores bajo observación. (Elaborado con Microsoft Excel)

Cultivar	Etapa de desarrollo	Fenología				
		Primeros estadíos ←→ Últimos estadíos				
A) <i>P. barbatus</i> 'Rondo'	1. Cáliz					
	2. Apertura del cáliz					
	3. Elongación de la corola					
	4. Antesis					

Cultivar	Etapa de desarrollo	Fenología				
		Primeros estadíos ← → Últimos estadíos				
B) <i>P. smallii</i>	1. Cáliz	-				
	2. Apertura del cáliz	-				
	3. Elongación de la corolla					
	4. Antesis					

Cultivar	Etapa de desarrollo	Fenología		
		Primeros estadíos ←	→ Últimos estadíos	
C) <i>P. × mexicali</i> 'Miniature Bells'	1. Cáliz			
	2. Apertura del cáliz			
	3. Elongación de la corola			
	4. Antesis			

Figura 3. Flores y brotes de tres especies de *Penstemon* en diversos estados del desarrollo floral. A) *P. barbatus* 'Rondo', B) *P. smallii* y C) *P. × mexicali* 'Miniature Bells'.

Longitud de estilos

El largo de los estilos fue muy similar en todos los cultivares excepto en *P. smalii* ‘Violet Dusk’, el cual fue el más corto de todos (Tabla 5)

Tabla 5. Largo de los estilos de 4 cultivares de *Penstemon*.

Cultivar	Largo (mm)
<i>P. barbatus</i> ‘Rondo’ (10)	20.3±0.01
<i>P. smalii</i> (10)	18.5±0.01
<i>P. × mexicali</i> ‘Miniature Bells’ (10)	17.5±0.02
<i>P. smalii</i> ‘Violet Dusk’ (10)	13.0±0.02

El número en paréntesis representa el número de estilos medidos. ± Error estándar.

Cronología en la dehiscencia del polen

Con respecto a la primera señal de dehiscencia de polen, *P. smalii* mostró la dehiscencia más precoz, mientras *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ la más tardía, teniendo *P. barbatus* ‘Rondo’ una duración intermedia. Interesantemente algunas anteras en *P. smalii* tuvieron dehiscencia incluso antes de que se abriera la flor. El tiempo transcurrido entre la anthesis hasta la dehiscencia de las cuatro anteras mostró el mismo patrón; el menor tiempo en *P. smalii*, el mayor período en *P. × mexicali* ‘Miniature Bells’ y *P. barbatus* ‘Rondo’ tuvo una duración intermedia (Tabla 6).

Tabla 6. Cronología de dehiscencia del polen en 3 cultivares de *Penstemon*.

Especies	Tiempo transcurrido desde la anthesis hasta el primer signo de dehiscencia (horas)	Tiempo transcurrido desde la anthesis hasta la dehiscencia de las 4 anteras (horas)
<i>P. ×mexicali</i> ‘Miniature Bells’(7)	37.29±5.96	95.14±4.07
<i>P. barbatus</i> ‘Rondo’ (10)	15.90±2.05	32.70±3.96
<i>P. smalii</i> (8)	4.50±1.88	26.25±2.10

Los números en paréntesis representan el número de flores observadas. El primer signo de dehiscencia fue considerado cuando se observaba por primera vez una o dos anteras dehiscentes. ± Error estándar.

Las anteras de *P. ×mexicali* ‘Miniature Bells’ tienen un color morado claro antes de la dehiscencia y se tornan negras tras la descarga del polen. Las anteras de *P. barbatus* ‘Rondo’ cambian de un color blanco a un morado grisáceo con un borde blanco (lugar donde se localiza la línea de dehiscencia). *P. smalii* posee anteras morado oscuro que se vuelven negras tras la dehiscencia (Figura 4).

Especies	Anteras sin abrir	Dos anteras en dehiscencia	Cuatro anteras en dehiscencia
<i>P. smalii</i>			
<i>P. barbatus</i> 'Rondo'			
<i>P. × mexicali</i> 'Miniature Bells'			

Figura 4. Proceso de dehiscencia en las anteras de tres especies de *Penstemon*. Las flechas (↓) señalan las anteras en dehiscencia.

Fertilización exitosa

Se designaron como cruces de fertilización exitosa a aquellos donde se observó un notable crecimiento en sus frutos, sin corroborarse si sus semillas eran viables o no, ya que en el momento de finalizar este estudio no se pudieron analizar las semillas engendradas.

Se encontró éxito unilateral en los cruces del Set 1, pero solamente donde se utilizó a *P. × mexicali* 'Sunburst Ruby' como flor hembra. No se observó crecimiento frutal en sus cruces recíprocos.

Los cruces intraespecíficos del Set 2 presentaron éxito bilateral en ambas direcciones del cruce recíproco.

En el Set 3, solo se observó crecimiento frutal en el cruce *P. barbatus* 'Navigator' × *P. smallii*. Sin embargo, el polen extraído de los cultivares de *P. barbatus* era escaso y presentaba un color amarillento, sugiriendo polen de mala calidad. Además, las flores de donde se extrajo el polen se encontraban en estado de senescencia. Al contrario, fue posible obtener polen fresco de los estambres de *P. smallii*. El cruce intraespecífico *P. smallii* × *P. smallii* 'Violet Dusk' no presentó crecimiento en sus frutos.

A pesar de que la mayoría de los cruces interespecíficos donde intervino *P. smallii* como flor femenina fallaron, en el Set 4 creció un fruto producto del cruce *P. smallii* 'Violet Dusk' × *P. × mexicali* 'Sunburst Amethyst'. Como era de esperarse, las autopolinizaciones en *P. smallii* 'Violet Dusk' presentaron un éxito de polinización del 100%. Por otro lado, las auto polinizaciones de *P. smallii* no resultaron en ningún crecimiento frutal, pero se observó daño en los ovarios durante etapas tempranas de su desarrollo, probablemente causado durante las mediciones.

El número de set, fecha de la polinización, el cruce realizado, tipo de cruce, cantidad de polinizaciones realizadas, y porcentaje de fertilizaciones exitosas se muestran en el Tabla 7.

El éxito en el crecimiento frutal de algunos cruces, en especial del Set 3 y 4, fueron afectados por otros factores que serán abordados en la discusión.

Tabla 7. Número de set, fecha de polinización, cruce realizado, tipo de cruce, cantidad de polinizaciones realizadas y porcentaje de fertilizaciones exitosas.

Set	Fecha de polinización	Pariente materno	Pariente paterno	Cantidad de polinizaciones	Cantidad de frutos en crecimiento	Fertilizaciones exitosas (%)	Tipo de cruce
Set 1	8 de octubre, 2009	<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst Ruby’	<i>P. barbatus</i> ‘Rondo’	4	4	100	Interespecífico
		<i>P. barbatus</i> ‘Rondo’	<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst Ruby’	6	0	0	
		<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst Ruby’	<i>P. smalii</i>	3	3	100	
		<i>P. smalii</i>	<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst Ruby’	5	0	0	
Set 2	10 de octubre,	<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst	<i>P. ×mexicali</i> ‘Sunburst Amethyst’	3	3	100	Intraespecífico

	2009	Ruby'					
		<i>P. ×mexicali</i> 'Sunburst Amethyst'	<i>P. ×mexicali</i> 'Sunburst Ruby'	2	2	100	
Set 3	4 de noviem- bre, 2009.	<i>P. barbatus</i> 'Navigator'	<i>P. smallii</i>	5	5	100	Interespecí- fico
		<i>P. smallii</i>	<i>P. barbatus</i> 'Navigator'	3	0	0	
		<i>P. smallii</i>	<i>P. smallii</i> 'Violet Dusk'	3	0	0	Intraespecí- fico
		<i>P. barbatus</i> 'Navigator'	<i>P. barbatus</i> 'Rondo'	5	0	0	
Set 4	11 de noviem- bre, 2009	<i>P. smallii</i> 'Violet Dusk'	Autopolinización	3	3	100	Autopolini- zación
		<i>P. smallii</i>	Autopolinización	5	0	0	
		<i>P. smallii</i>	<i>P. ×mexicali</i>	5	1	20	Interespecí-

		'Violet Dusk'	'Sunburst Amethyst'				fico
		<i>P. smallii</i>	<i>P. ×mexicali</i> 'Sunburst Amethyst'	5	0	0	

Crecimiento frutal

Solamente son presentados los frutos que mostraron crecimiento y permanecieron intactos hasta el final de este estudio. Aquellos frutos que crecieron pero fueron perdidos en etapas iniciales fueron excluidos. En el Set 1, como se mencionó previamente, solo se observó crecimiento frutal en los cruces donde se utilizó *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ como flor femenina. Sin embargo, al ser comparados los frutos del cruce *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. barbatus* ‘Rondo’, obtuvieron un crecimiento mayor aquellos que tenían a *P. smalii* como flor paterna o donador de polen. En la semana 9, se observó que uno de los frutos del cruce *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. barbatus* ‘Rondo’ mostró una coloración café y una reducción en su tamaño, aparentemente alcanzando la madurez (Figura 5). Dicho fruto fue cosechado y las observaciones al respecto son mencionadas más adelante.

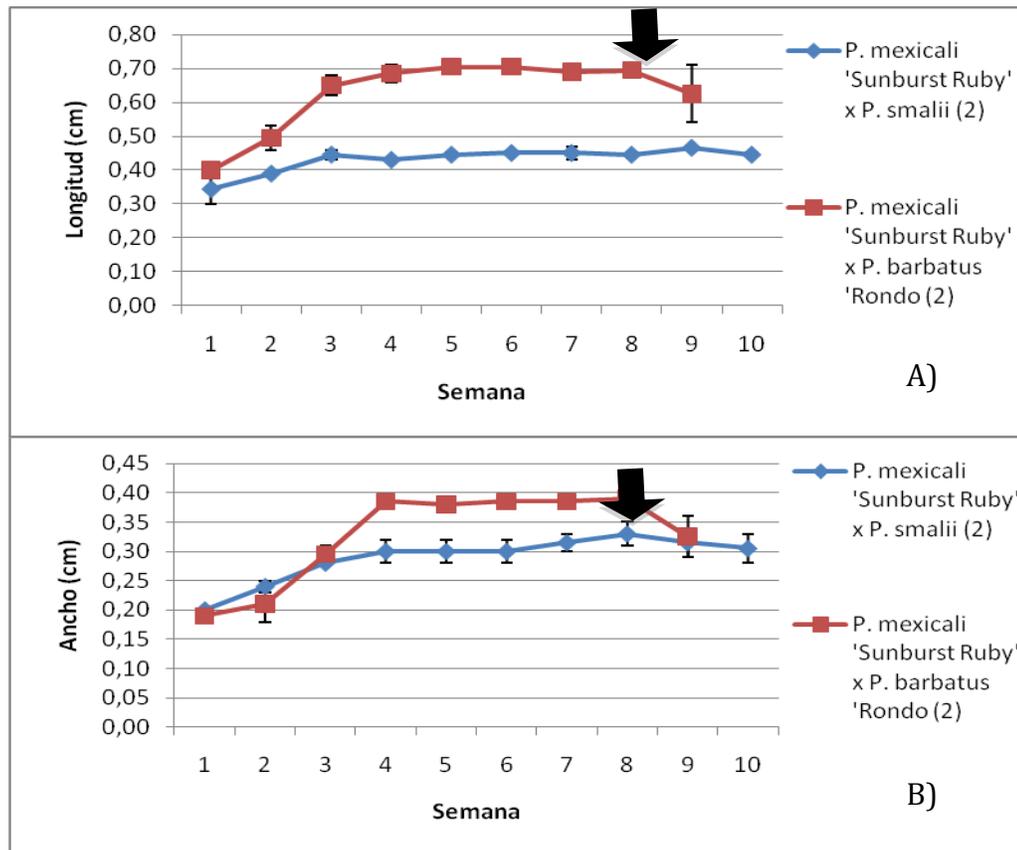


Figura 5. Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 1. A) Longitud. B) Ancho. El número en paréntesis representa el número de repeticiones para ese cruce. Las flechas muestran el momento en el que se recolectó un fruto maduro del cruce *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' × *P. barbatus* 'Rondo'. Debido a que este fruto se colectó en la novena semana, la línea de crecimiento frutal del gráfico se detiene ahí, ya que solo quedaba una repetición q no podía ser promediada. Cada punto representa el promedio para esa semana, con las barras de error mostrando el (\pm) error estándar. (Elaborado con Microsoft Excel)

En el Set 2, se observó crecimiento en ambos cruces recíprocos. Sin embargo, cuando se utilizó *P. × mexicali* 'Sunburst Ruby' como flor femenina registró mayor crecimiento que cuando se utilizó *P. × mexicali* 'Sunburst Amethyst' como flor femenina. Esta diferencia se observa mejor en el grosor que en la longitud de los frutos (Figura 6).

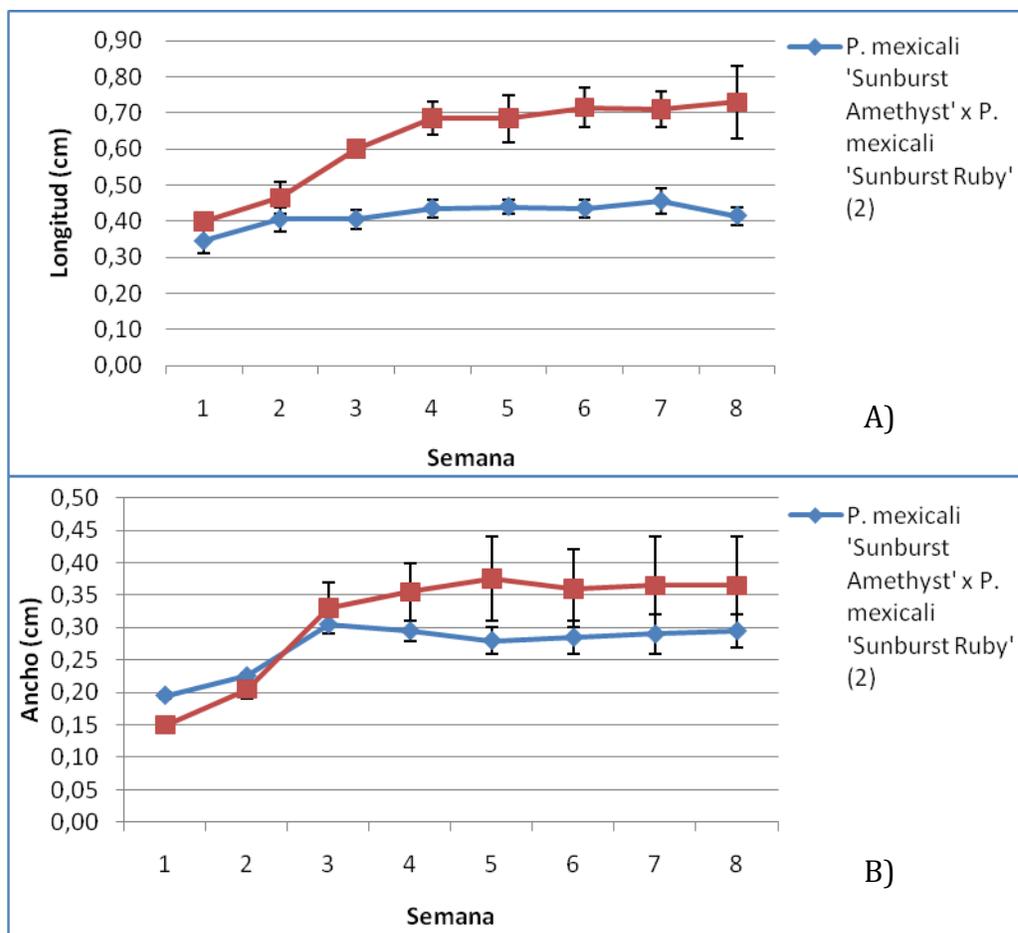


Figura 6. Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 2. A) Longitud. B) Ancho. El número en paréntesis representa el número de repeticiones para ese cruce. Cada punto representa el promedio para esa semana, con las barras de error mostrando el (\pm) error estándar. (Elaborado con Microsoft Excel)

En el Set 3, se registró un leve crecimiento de los frutos, en comparación con el crecimiento de sets anteriores (Figura 7)

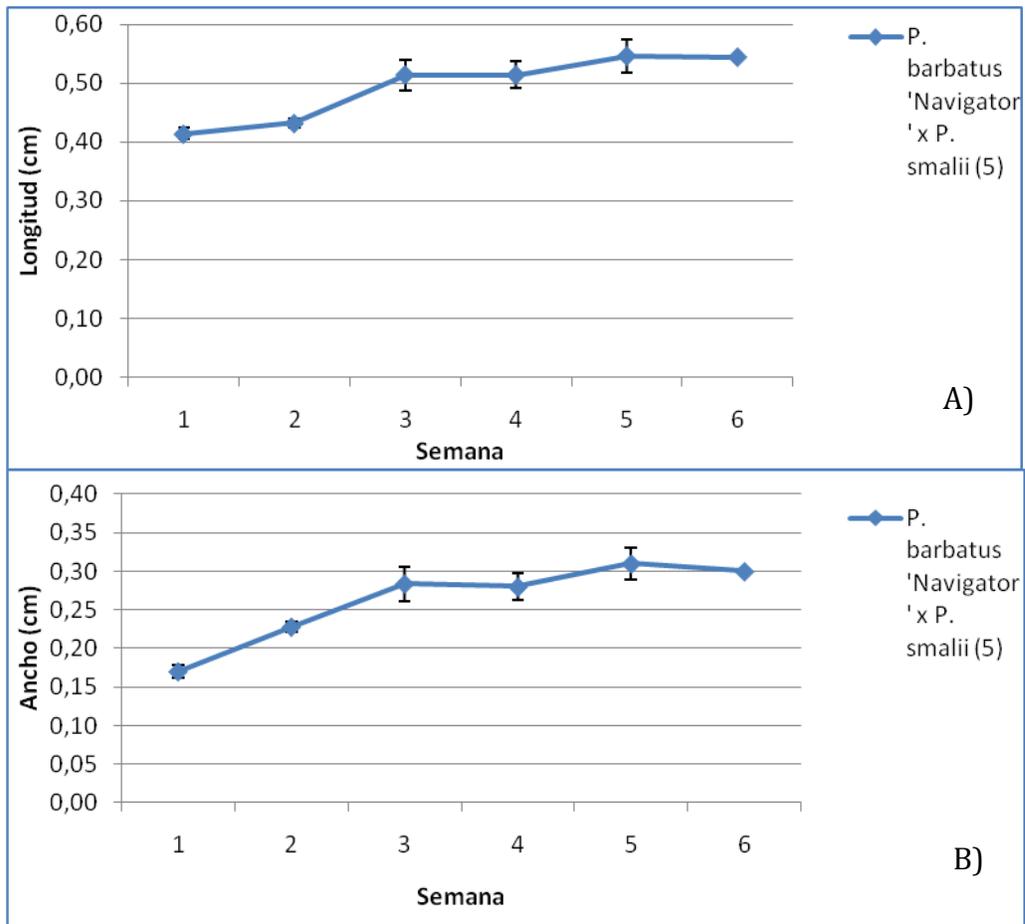


Figura 7. Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 3. A) Longitud. B) Ancho. El número en paréntesis representa el número de repeticiones para ese cruce. Cada punto representa el promedio para esa semana, con las barras de error mostrando el (\pm) error estándar. (Elaborado con Microsoft Excel)

Como era esperado, el crecimiento frutal fue visiblemente notorio en las autopolinizaciones de 'Violet Dusk'. Se registró el crecimiento substancial de un fruto en el cruce *P. smalii* 'Violet Dusk' \times *P. mexicali* 'Sunburst Amethyst'. El ritmo y el crecimiento de este fruto fue muy similar al promedio de crecimiento en los frutos autopolinizados en 'Violet Dusk' (Figura 8).

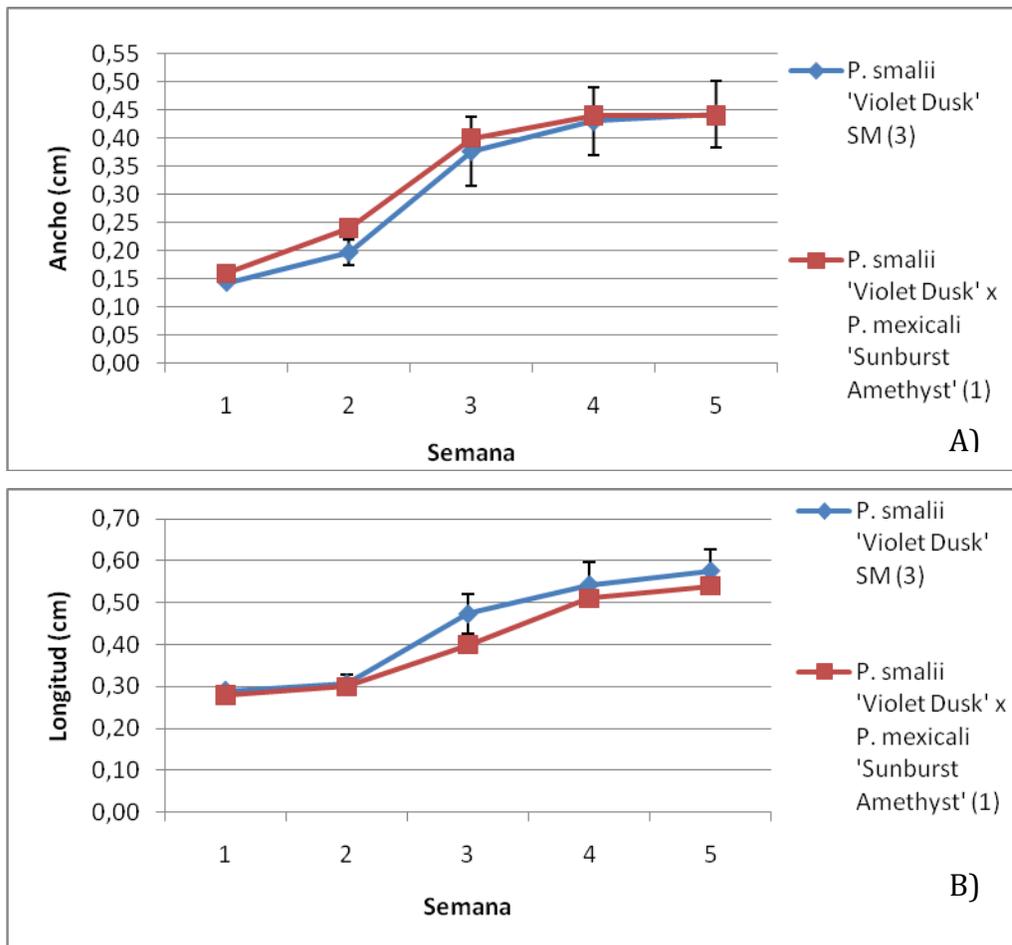


Figura 8. Crecimiento promedio de los frutos obtenidos en los cruces del Set 4. A) Longitud. B) Ancho. El número en paréntesis representa el número de repeticiones para ese cruce. Cada punto representa el promedio para esa semana, con las barras de error mostrando el (\pm) error estándar. (Elaborado con Microsoft Excel)

Colecta de frutos maduros y observación de las semillas obtenidas

Las únicas semillas tentativas que se pudieron recolectar antes de la finalización de este estudio fueron obtenidas del cruce *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' × *P. barbatus* 'Rondo' (Figura 9, A). Ya que solo fue posible recolectar un fruto, las semillas no fueron contadas ni pesadas. No se recolectaron más frutos ni semillas debido a que estos aún se encontraban en maduración tras la finalización del presente trabajo. Sin embargo, se pudo hacer una interesante comparación visual entre estas semillas y algunas semillas obtenidas en estudios preliminares. Esto fue hecho con el objetivo de ilustrar y apoyar hipótesis que podrían explicar los resultados obtenidos hasta la finalización de este trabajo, y no para obtener conclusiones experimentales a partir de dicha comparación. Por la misma razón, la metodología de estos estudios preliminares no es mostrada, a pesar de que fuera muy similar a la del estudio actual.

Nótese como las semillas tentativas (Figura 9, A) son visualmente similares a las obtenidas de un cruce preliminar, *P. barbatus* 'Navigator' × *P. smallii* 'Violet Dusk' (Figura 9, C.2), y como estas dos difieren en apariencia a semillas provenientes de flores sin manipular (probablemente autopolinizadas o fertilizadas por polinización cruzada) de *P. barbatus* 'Navigator' (Figura 9, C.1). Además, a pesar de que las semillas obtenidas en el presente estudio (Figura 9, A) no poseen escala, su tamaño es visiblemente menor en comparación con semillas provenientes de flores no manipuladas de *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' (mismo pariente materno en ambos casos) (Fig. 9, B)

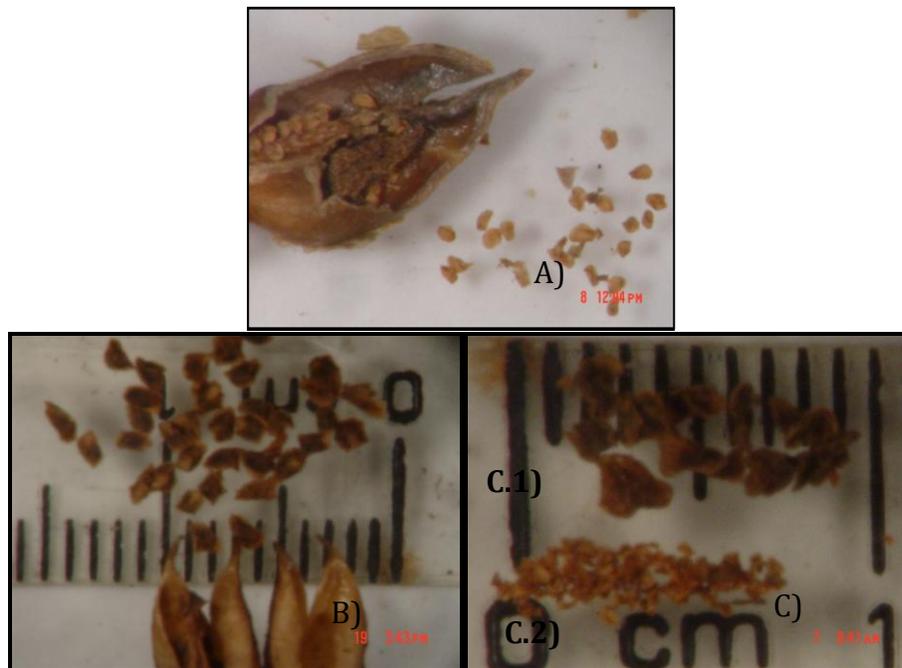


Figura 9. Comparación entre semillas obtenidas del estudio actual (A) y cruces preliminares (B, C); A) Semillas tentativas obtenidas del cruce *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' × *P. barbatus* 'Rondo', B) Semillas de flores no manipuladas de *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby', C.1) Semillas de flores no manipuladas de *P. barbatus* 'Navigator', C.2) Semillas tentativas del cruce *P. barbatus* 'Navigator' × *P. smallii* 'Violet Dusk'.

DISCUSIÓN

Registro del desarrollo floral y construcción de una guía visual

El registro fotográfico del desarrollo floral presente en la guía visual puede utilizarse como una herramienta básica para relacionar el tamaño y apariencia de la flor con la etapa de desarrollo de la misma flor, pudiéndose hacer una aproximación rápida de la cantidad de tiempo necesaria para alcanzar la antesis.

Las tres especies analizadas de *Penstemon* tuvieron distinta duración para alcanzar la antesis. Casos similares han sido reportados para siete especies del género *Nolana* (Douglas, 2007), lirios híbridos (Grassotti y Torrini 1990, Ohkawa *et al* 1990) y dos subespecies de *Clarkia xantiana* (Mazer *et al* 2004).

El fenómeno de apertura floral se encuentra “programado” por la planta para exponerse a los polinizadores más aptos, por lo que las flores pueden mostrar un control preciso del tiempo de apertura, dehiscencia, receptividad del estigma, usualmente en respuesta también a factores ambientales como luz, temperatura y humedad relativa (Reid 2005).

Los factores ambientales no fueron objeto de estudio en el presente trabajo, ya que las plantas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de invernadero. Por lo tanto, adaptaciones evolutivas y diferencias genéticas entre las tres especies pudieron haber sido los causantes de las diferencias temporales en la apertura floral. La morfología floral de las tres especies estudiada sugiere una preferencia a distintos polinizadores. Algunos datos experimentales mostraron que la corola de *P. barbatus* tiene mayor longitud que la de *P. smallii* y ‘Miniature Bells’, a la vez es más angosta que la de *P. smallii* (en el momento de antesis). En *Penstemon*, las adaptaciones evolutivas en la morfología de la flor han categorizado las especies según su tipo de polinizador: colibríes o insectos himenópteros. Se dice que las flores polinizadas por colibríes tienden a ser rojas, son angostas, inclinadas, sin lóbulos inferiores con función de “plataforma de aterrizaje” y con grandes cantidades de néctar diluido. Por otro lado, las flores polinizadas por abejas son amarillas o azules, poseen lóbulos adecuados para que los insectos puedan escalar, con posición horizontal o levemente hacia arriba, con “plataformas de aterrizaje” y poseen néctar concentrado (Wilson *et*

al 2004). *P. barbatus* ha sido reportado como una especie típicamente polinizado por colibríes (Lange *et al* 2000) mientras que ‘Miniature Bells’ y *P. smallii* poseen algunos síntomas propias de las flores polinizadas por abejas. Estas adaptaciones evolutivas implican divergencias genéticas que probablemente provocan respuestas (en este caso, la respuesta es la apertura floral) a factores ambientales en diferentes tiempos para cada especie (Van Doorn y Van Meeteren 2003, Levin 2003). Finalmente, y coincidiendo con los resultados obtenidos, *P. barbatus* ha mostrado flores con mayor longevidad o permanencia en la planta en comparación con otras especies de *Penstemon*. (Lange *et al* 2000).

Cronología en la dehiscencia del polen

La dehiscencia del polen está cercanamente relacionada con la apertura floral, siendo todo parte integral del proceso reproductivo en conjunto con la receptividad sexual del estigma y la senescencia floral (Reid 2005). Por lo tanto, la discusión en cuanto a las diferencias en apertura floral de las tres especies de *Penstemon*, puede aplicar también a las diferencias encontradas en tiempos de dehiscencia; adaptaciones evolutivas, diferencias genotípicas y factores ambientales (Van Doorn y Van Meeteren 2003, Lange *et al* 2000, Levin 2003)

Diferencias en los tiempos de dehiscencia han sido reportadas ampliamente en otras especies de *Penstemon* (Clements *et al* 1999, Tepedino *et al* 1999, Tepedino *et al* 2006, Lara y Ornelas 2008). La cronología en la dehiscencia y la longevidad (vida útil) del polen pueden afectar directamente el éxito de una polinización. Se conoce que la viabilidad del polen disminuye, algunas veces rápidamente, con el tiempo y la exposición a condiciones ambientales desfavorables. Debido al potencial impacto de factores no genéticas en la habilidad del polen de fertilizar óvulos, los investigadores que realizan polinizaciones manuales intentan controlar la frescura o viabilidad del polen utilizado. Se podría pensar que los granos de polen permanecen viables por el tiempo suficiente para descartar pérdida por dicha causa. Sin embargo, se ha podido demostrar lo contrario. Ha sido sugerido que algunas condiciones ambientales probablemente limitan la vida útil del polen a pocos días o incluso horas (Stone *et al*, 1995).

La longevidad del polen (en condiciones naturales, sin ser sometido a tratamientos de conservación como refrigeración) varía enormemente entre especies, desde un tiempo extremadamente de 4 minutos en *Oryza sativa* hasta 51 días en *Dactylorhiza purpurella* (Orchideaceae) (Dafni y Firmage 2000). Adicionalmente, Thomson *et al* (1994) encontró que en *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae), la viabilidad del polen tuvo distintos resultados dependiendo del método con el que se analizó; utilizando tinción fluorocromática la viabilidad del polen disminuyó drásticamente con la edad, la germinación *in vitro* también declinó con la edad, pero de manera menos drástica y la producción de semilla no se vio afectado con la edad del polen utilizado.

No se encontró literatura referente a la longevidad del polen en *Penstemon* y por lo tanto, no se conoce por cuánto tiempo el polen permanece viable en condiciones de campo o invernadero. Resultaría interesante combinar un estudio de longevidad del polen con la cronología presentada, para estimar si es necesario recolectar polen o utilizar el mismo antes de ciertos períodos críticos de tiempo, para evitar la posibilidad de utilizar polen inviable en polinizaciones.

Fertilización exitosa

Set 1 y Set 3: Éxito unilateral en tres cruces recíprocos

Tres de los cruces realizados tuvieron altos porcentajes de fertilización exitosa en una sola dirección. Dos de ellos pertenecían al Set 1 (*P. × mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. barbatus* ‘Rondo’ y *P. × mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. smallii*) y uno al Set 3 (*P. barbatus* ‘Navigator’ × *P. smallii*). No se obtuvo ningún crecimiento frutal en los cruces recíprocos de los antes mencionados (Set 1: *P. barbatus* ‘Rondo’ × *P. × mexicali* ‘Sunburst Ruby’ y *P. smallii* × *P. × mexicali* ‘Sunburst Ruby’). Para el cruce recíproco *P. smallii* × *P. barbatus* ‘Navigator’ del Set 3 se cree hubo otro factor que afectó el éxito en la fertilización y será discutido más adelante; la no disponibilidad de polen fresco. No se realizaron estudios para determinar la causa específica de dicha fallo ni tampoco en la etapa que pudo haber ocurrido. Sin embargo, se ha reportado que la fertilización es indispensable para la iniciación del fruto y su desarrollo sostenido (Gillaspy *et al* 1993). Por lo tanto, se puede deducir que en los tres cruces fallidos previamente mencionados no

ocurrió la fertilización de los óvulos, esto demostrado por la ausencia de desarrollo o crecimiento de los frutos. Con base a esto, se proponen y discuten los más probables mecanismos precigóticos que pudieron haber sido las barreras reproductivas para estos cruces fallidos:

1. **Polen inviable:** Polen con poca viabilidad o inviable del todo, proveniente de las flores masculinas pudieron haber su germinación en el estigma tras realizarse la polinización. A pesar de que esta no es considerada una hipótesis fuerte, ya que el polen utilizado es relativamente fresco (usado inmediatamente después de la colecta), la longevidad y sobrevivencia del polen en *Penstemon* son desconocidos. Se recomiendan pruebas de viabilidad y longevidad del polen, y germinabilidad *in vitro/in vivo* para asegurar las polinizaciones más óptimas.
2. **Incongruencia:** Una vez que polen saludable ha alcanzado el estigma, la incapacidad de este para adherirse a la superficie estigmática es otra barrera precigótica común. Esta barrera es explicada adecuadamente con el concepto de incongruencia. La incongruencia se define como un rechazo pasivo, produciendo la detención del crecimiento del tubo polínico, causado probablemente por la inhabilidad del polen para utilizar los nutrientes del estilo, o la ausencia de estos para su correcto desarrollo. También podría haber una falta de enzimas adecuadas en el tubo polínico. Los síntomas de la incongruencia son similar a aquellos causados por la auto-incompatibilidad; falta de germinación del polen en el estigma y falta de penetración del polen en el tracto de transmisión del estilo (Vervaeke *et al* 2001). A pesar de su similitud, la auto-incompatibilidad es un sistema de rechazo activo, donde las interacciones iniciales entre el polen y el estigma inician una cascada de señales fisiológicas que reducen la hidratación del polen, impiden al germinación del tubo polínico y finalmente llevan al auto-rechazo del polen (Swanson *et al* 2004). Un rechazo pasivo del polen y del crecimiento del tubo polínico podrían ser causas que afectaron la cruce entre las especies de *Penstemon*.

3. Longitud de estilos: El cultivar con el estilo más pequeño, *P. smalii* 'Violet Dusk', actuó como pariente paterno en un cruce, donde el pariente materno (*P. smalii*) poseía un estilo de mayor tamaño. El largo del estilo puede considerarse como causante de una hibridización fallida. Cruces donde se utilizan especies de estilo corto como flor femenina y polen proveniente de especies de estilo largo podrían ser exitosos, pero sus cruces recíprocos podrían no serlo. Esto fue demostrado en géneros como *Vigna*, *Lycopersicon* y *Leucaena*. La incapacidad de la especie masculina con el estilo corto para alcanzar el ovario con estilo largo está relacionada a la inhabilidad intrínseca del tubo polínico para crecer más allá del largo de sus propios pistilos (Vervaeke *et al* 2001). Como coincidencia, el cruce *P. smalii* × *P. smalii* 'Violet Dusk' no produjo fruto alguno. Sin embargo, se necesita un estudio con significancia estadística para confirmar este fallo, y como se señala más adelante, hubo otros factores que pudieron haber intervenido en el éxito de fertilización. Adicionalmente, la diferencia en los largos de los estilos entre los parientes pueden no ser importantes, ya que ellos mismos tienen estrategias para superar dichas diferencias de tamaño. Por ejemplo, cuando polen de *Rhododendron* con pistilos cortos es colocado sobre pistilos mucho más largos, sus tubos polínicos son capaces de crecer de 1.5 a 2 veces el largo de su propio pistilo, pero no pueden alcanzar ovarios más allá de esa distancia. Los tubos polínicos pueden crecer hasta cierta distancia usando las reservas almacenadas en los granos del polen, pero necesitan adicionalmente algunos nutrientes para alcanzar el polen (Vervaeke *et al* 2001).

El éxito unilateral de crecimiento frutal en cruces artificiales ha sido reportado previamente en *Penstemon* (Mackaness 1959, Chari y Wilson 2001). Se ha reportado también que en cruces interespecíficos de otras especies como *Aechmea* (Bromeliaceae) se producen pocos híbridos en una dirección y ninguno en la dirección recíproca. Un importante desbalance genómico o anomalías cromosómicas son propuestos como posibles causas (Vervaeke *et al* 2001)

P. ×mexicali ‘Sunburst Ruby’: una posible especie intermediaria.

Interesantemente, los cruces que desarrollaron frutos tras la polinización en el Set 1 tuvieron un pariente materno en común: el híbrido *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’. A pesar de que es prematuro hacer la afirmación y es necesario más pruebas para corroborarlo, se podría hipotetizar que ‘Sunburst Ruby’ tiene características genéticas favorables para ser denominada una especie intermediaria. Estas especies son más receptivas a cruzarse interespecíficamente y son utilizados cuando un cruzamiento directo entre cultivares no es exitoso (Hayes *et al* 2005). El cruce con intermediarias es utilizado comúnmente como una técnica de cruzamiento indirecto entre dos especies, generalmente de diferente ploidía (Acquaah 2007). Las especies intermediarias son utilizadas también en cruces de igual ploidía y en *Penstemon* ha sido reportado el caso de su uso en la formación de nuevos híbridos, como el caso de los híbridos ‘Fate’ y ‘Seeba’, los cuales fueron cruzados con diversas especies y han producido semilla viable. Sin embargo, fue el descubrimiento fortuito de el híbrido natural *P.* ‘Flathead Lake’ el que le dio un impulso a los programas de mejoramiento genético de *Penstemon*. El híbrido ‘Flathead Lake’ no poseía caracteres de interés ornamental, pero era capaz de cruzarse con casi cada una de las secciones del género, siendo una especie intermediaria de gran importancia (Viehmeyer 1958, Mackaness 1959, Way y James 1998).

Set 2

Se encontró un alto porcentaje de frutos en crecimiento en ambos cruces recíprocos entre *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ y *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’. Esto era de esperarse, ya que en especies auto-compatibles el mejor desempeño reproductivo se da entre individuos genéticamente más similares, contrario a lo que ocurre en especies de reproducción por polinización cruzada (Willi y Van Buskirk 2005). Cruces intraespecíficos (o conespecíficos) en *Penstemon* han sido reportados como más (Chari y Wilson 2001) o igualmente exitosos (Kimball *et al* 2008) que los cruces interespecíficos. En el género *Brassica*, el polen intraespecífico producía progenies con mejor desempeño que los híbridos producidos con polen foráneo (Hauser *et al* 1997).

Set 4

Solo un fruto fue obtenido del cruce *P. smalii* 'Violet Dusk' × *P. ×mexicali* 'Sunburst Amethyst'. Esto es considerado normal en las hibridaciones interespecíficas. En muchas especies, incluso aquellas pertenecientes a la misma sección, el aislamiento genético parece estar tan bien desarrollado como para hacer el intercambio génico raro o imposible en cruzamientos naturales o artificiales. Sin embargo, ese aislamiento entre y dentro de las especies no siempre es del todo completo y ocasionalmente pueden producirse algunos híbridos fértiles (Viehnmeier 1958). Basado en esto, cruzamientos a gran escala son recomendados si se descubre que la frecuencia de polinizaciones exitosas es muy baja, para obtener al menos un número limitado de semillas. También el uso de flores femeninas estériles que eviten la emasculación masiva y métodos de polinización eficiente podrían ayudar a incrementar el número de polinizaciones exitosas (Fehr 1991).

Factores adicionales que afectaron el desempeño de los cruces

Algunos factores externos afectaron la polinización, el crecimiento frutal y por ende, el éxito de los cruces. Los ovarios de las flores femeninas usadas en tres cruces (*P. smalii* × *P. smalii* 'Violet Dusk' del Set 3, y las auto-polinizaciones de *P. smalii* y *P. smalii* × *P. ×mexicali* 'Sunburst Amethyst' del Set 4) estaban visiblemente dañadas probablemente durante las mediciones de tamaño. Se evidenció cierta necrosis y perforaciones el pericarpo de los frutos.

No fue posible la obtención de polen fresco de los parientes paternos en los cruces *P. barbatus* 'Navigator' × *P. barbatus* 'Rondo' y *P. smalii* × *P. barbatus* 'Navigator' (Set 3). Las únicas anteras dehiscentes encontradas en los cultivares de *P. barbatus* provenían de flores senescentes y el polen tenía apariencia amarillosa. Adicionalmente a lo previamente discutido con respecto a la longevidad y "vida útil" del polen, debe agregarse que las polinizaciones de baja calidad (en este caso, causadas por polen no fresco) provocan una menor cantidad de frutos y éstos de tamaño inferior o aborto del embrión (Gillaspy *et al* 1993).

Crecimiento frutal

Set 1

Un crecimiento notable fue observado solamente en frutos de los cruces donde se usó *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ como pariente materno. En estos cruces, los frutos que poseían a *P. smalii* como pariente paterno crecieron menos en comparación a los que tuvieron a *P. barbatus* ‘Rondo’. Esta diferencia coincide con el hecho que las semillas de *P. smalii* son visualmente más pequeñas que las de *P. barbatus* ‘Rondo’. Diferencias de masa o cantidad de semillas entre los frutos es muy posible, pero tales observaciones deben de corroborarse en un análisis de semillas más detallado. Podría decirse que el tamaño de los frutos en ambos cruces del Set 1 fue influenciado por el donador de polen, ya que ambos tuvieron el mismo pariente materno. Las diferencias en el tamaño de las semillas puede ser influenciado genéticamente por diferentes donadores de polen (Andersson 1990) y la identidad específica del pariente paterno tiene efectos altamente significativos en la progenie (Andersson *et al* 2008).

Se encontró efecto paterno en la germinación de las semillas, al cambiar los donadores de polen en cruces interespecíficos de *Silene* (Caryophyllaceae), influenciado probablemente por factores citoplasmáticos heredados del pariente paterno o por el silenciamiento de genes maternos (Andersson *et al* 2008). La variación del pariente paterno afectó el tamaño de la semilla en *Crepis tectorum* (Asteraceae) (Andersson 1990) y *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) (Nakamura 1986).

Set 2

Los frutos obtenidos de los cruces intraespecíficos entre los cultivares de *P. mexicali* tuvieron un tamaño mayor en la dirección *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. ×mexicali* ‘Sunburst Amethyst’. Diferencias en el tamaño de las semillas es posible en especies o cultivares genéticamente cercanos (ver Nakamura 1986). Utilizar pruebas control con auto-polinizaciones y un adecuado análisis estadístico es necesario para determinar si el tamaño frutal y la cantidad y peso de las semillas en estos cruces, fue influenciado por el pariente materno o el paterno (Kimball *et al* 2008).

Set 3

Se registró un crecimiento discreto en los frutos del cruce *P. barbatus* ‘Navigator’ × *P. smalii*. Sin embargo, ya que no fue posible registrar el crecimiento frutal de otro cruce del mismo set, no se pudo realizar comparación alguna.

Set 4

Se encontró que los frutos auto-polinizados de *P. smalii* ‘Violet Dusk’ tuvieron una tendencia de crecimiento similar a la del único fruto obtenido del cruce *P. smalii* ‘Violet Dusk’ × *P. ×mexicali* ‘Sunburst Amethyst’, sugiriendo que al menos las semillas de este fruto son similares en masa y/o número a los del cruce, y aparentemente posee un desarrollo normal del endospermo. Kimball *et al* (2008) reportó que en cruces interespecíficos de *Penstemon davidsonii* y *P. newberryi* se produjeron igual cantidad de semillas que en cruce intraespecíficos. Sin embargo, ya que solo se obtuvo un fruto en el cruce antes mencionado, es muy probable la presencia de fuertes barreras pre- o post-cigóticas que producen esta frecuencia tan baja de hibridización.

Se encontró muy poca literatura acerca del tamaño de frutos y semillas en *Penstemon*, razón por la cual se deberían realizar experimentos futuros para satisfacer esta necesidad.

Colecta de frutos maduros y observación de las semillas obtenidas

Las posibles semillas obtenidas del cruce *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. barbatus* ‘Rondo’ no fueron sometidas a pruebas de germinación debido a la falta de tiempo. Además, no pudieron ser comparadas con otras semillas, ya que al finalizar el presente estudio, no había más frutos maduros. Sin embargo, se realizó una comparación demostrativa con semillas (o posibles semillas) de estudios preliminares, lo cual podría ayudar a establecer hipótesis de acuerdo a los resultados obtenidos. Las semillas del presente estudio eran visiblemente más pequeñas que las semillas provenientes de flores sin manipular de *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ (mismo pariente materno).

Los frutos maduros, que poseen el mismo tamaño al óvulo en los estadios tempranos de la flor, no fueron fertilizados, y aquellos frutos que son mayores a este tamaño pero menores a un fruto desarrollado completamente, tuvieron un aborto embrionario –se conocen como semillas abortadas o vacías. Además, se ha reportado que óvulos no fertilizados de *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) podrían crecer y alcanzar el mismo tamaño de las semillas normales, en frutos donde ambos estén presentes (Seavey *et al* 2000).

La aparición de frutos partenocárpicos podría descartarse, ya que no han sido reportados en *Pentstemon*. De la misma manera, podría asegurarse que ocurrió fertilización en los frutos colectados, es decir, no hubo barreras pre-cigóticas, ya que, como se mencionó previamente, la fertilización es indispensable para la iniciación del fruto y su desarrollo sostenido (Gillaspy *et al* 1993). Esto se da porque la fertilización produce un rápido incremento de la síntesis de hormonas en el óvulo y semilla. Presuntamente, estas hormonas se difunden en los alrededores del pericarpo, donde estimulan la división y expansión celular. La abscisión de un fruto no desarrollado después de la antesis es principalmente provocada por la falta de fertilización, y por lo tanto, desarrollo de la semilla (Bangerth 2004, Cox y Swain 2006). Los eventos post-fertilización del presente estudio son aún desconocidos, pero basándose en que: a) la fertilización de las células huevo y central ocurrió definitivamente, ya que es indispensable para que haya crecimiento frutal, b) la partenocarpia se excluye en *Penstemon*, c) pudieron haberse generado barreras de compatibilidad en cualquier etapa post-fertilización, y d) las semillas obtenidas parecían subdesarrolladas, o al menos, visiblemente más pequeñas que semillas normales obtenidas de flores sin manipular del mismo pariente materno. Con estos hechos podría proponerse la siguiente hipótesis: las semillas obtenidas del cruce *P. ×mexicali* ‘Sunburst Ruby’ × *P. barbatus* ‘Rondo’ han abortado sus embriones, o son una mezcla de semillas con embrión abortivo y óvulos sin fertilizar, los cuales no son distinguibles unos de otros. Es muy probable que las semillas de los frutos restantes, no recolectados por encontrarse en estado inmaduro, se encuentren en la misma condición, y al colectarse y extraerse su semilla, estas serán inviables. La fertilización estimuló el crecimiento frutal, pero varias posibles barreras post-cigóticas pudieron haber provocado la muerte del embrión. La etapa exacta del fallo del cruce no fue identificada,

pero sería una investigación interesante a futuro. Entre las barreras post-cigóticas más probables en haber causado la muerte embrionaria de los frutos en los cruces designados como exitosos son:

1. Interacciones génicas adversas: Si el polen ha germinado correctamente y el tubo polínico ha alcanzado y fertilizado el óvulo se hipotetiza que los frutos sin desarrollarse fueron afectados por una negativa interacción de genes entre las especies (Bushell *et al* 2003), por ejemplo una discordancia genómica causada por genes deletéreos o eliminación cromosómica (aneuploidismo) (Brar 2004). El reordenamiento de cromosomas es una fuente bien conocida de disminución en el desempeño de un híbrido. Plantas heterocigotas con inversiones para- o peri-céntricas, fusiones tándem o céntricas, o traslocaciones recíprocas pueden producir gametos aneuploides inviables (Fishman y Willis 2001). Esto podría provocar aborto embrionario en etapas muy tempranas, como sucede en frutos estenospermocárpicos, donde las semillas son pequeñas y con trazas de embrión en su interior (Janick 2005, Ostergaard 2009).
2. Diferencias en la ploidía: Cruces entre individuos que poseen diferente número de cromosomas, conocidos como cruces interploides, tiene relativamente poco éxito (Bombliés 2006). Sin embargo, no se encontró ninguna prueba en la literatura para afirmar que las especies utilizadas para este estudio posean números cromosómicos distintos, por lo que esta posibilidad podría descartarse.
3. Desarrollo deficiente del endosperma causado por los genes sellados (“*imprinted genes*”) El mal desarrollo del endosperma es citado frecuentemente como una causa común en el aborto de la semilla. El endospermo es el segundo producto formado tras la fertilización y se desarrolla al fusionarse uno de los núcleos polares del óvulo con el núcleo espermático del polen. El desarrollo deficiente del endospermo ha sido atribuido a un desbalance entre los genomas paterno (p) y materno (m). Su desarrollo normal usualmente requiere un radio genómico 2m:1p (Bushell *et al* 2003). El radio genómico 2m: 1p se da naturalmente con la fertilización secundaria, donde uno de los núcleos de la célula central del óvulo y una célula espermática se fusionan, generando el endospermo. Así, el endospermo obtiene una ploidía 3n, dos juegos genómicos provenientes de los dos núcleos en la célula central más un juego de genes del núcleo espermático (Flores 1999, Lin 1984). Alguna desviación de este radio,

provocado por el cruce entre especies similares o diferentes con diferentes niveles de ploidía, está relacionado generalmente con el aborto de la semilla. Un exceso de genes maternos (un ratio $> 2m:1p$) está relacionado generalmente con inhibición en la proliferación del endospermo, y un exceso de genes paternos está relacionado con sobre crecimiento. Se cree que el mecanismo involucrado en la necesidad de un ratio genómico específico es el sellado génico (“*parental imprinting*” o “*imprinted genes*”). Este término se refiere a la expresión génica diferenciada en la progenie, marcada por el pariente paterno (o materno), mediado por la vía epigenética. El modelo que explica el sellado génico es la teoría del conflicto parental, que define el sellado como una “lucha” entre los genomas maternos y paternos para heredar su información a la progenie. De acuerdo con este modelo, hay una presión de selección por promotores de crecimiento que se activa durante la transferencia de recursos a la progenie. Estos se expresan cuando son heredados por el pariente paterno, pero silenciados cuando son heredados por pariente materno, mientras que inhibidores de crecimiento son seleccionados para expresión materna y silenciamiento paterno. Se dice que dosis extra de genoma materno proveen copias activas extra de inhibidores de crecimiento, resultando en endospermos y semillas pequeños (Bushell *et al* 2003). En el presente estudio un posible desarrollo deficiente del endospermo pudo haber ocurrido en etapas tempranas de la formación de la semilla. En cruces interespecíficos de Solanáceas se sugiere que la formación del endospermo puede fallar en cualquier etapa de desarrollo de la semilla (Cooper y Brink 1940, Dinu y Thill 2004).

4. Influencia materna o citoplasmática: Algún tipo de influencia maternal fue observada claramente en dichos cruces, incluso sin haber determinado la causa específica del fallo. Se ha reportado que en cruces, el pariente materno tienen una fuerte influencia en todos los aspectos de la formación de semilla. El éxito de los híbridos F_1 dependen mucho de cual especie fue utilizada como pariente materno, pudiendo ocurrir un desempeño asimétrico en los híbridos. La expresión de genes citoplasmáticos heredados a través del pariente materno, interacciones citonucleares o influencia del ambiente materno podrían causar variaciones adicionales en la progenie proveniente de distintos parientes maternos (Kimball *et al* 2008). La interacción entre los genomas nucleares, del cloroplasto y mitocondrial ha sido sincronizada a través del desarrollo evolutivo de las plantas. Los distintos genomas han co-

evolucionado y se encuentran co-adaptados funcionalmente. Sus interacciones son alteradas al introducirse genes foráneos nucleares o citoplasmáticos dentro de la célula. Por lo tanto, entre más divergentes sean los genomas foráneos de los nativos, será mayor la probabilidad de desarmonía entre los genomas nucleares y citoplasmáticos en cruces interespecíficos y más fuertes serán las barreras post-cigóticas para el intercambio génico (Levin 2003).

CONCLUSIONES

- Se identificaron cuatro etapas características del desarrollo floral en *Penstemon*: Cáliz, Apertura del Cáliz, Elongación de la Corola y Antesis.
- Las diferencias de tiempo en la etapa de elongación de la corola y dehiscencia del polen se debieron a diferencias genéticas y evolutivas entre especies, las cuales han buscado la máxima exposición al polinizador más efectivo.
- El crecimiento frutal que se dio de forma unilateral en tres cruces recíprocos, es un fuerte indicio de que ocurrió la fertilización de los óvulos. Caso contrario sucedió con los mismos cruces recíprocos donde no se dio crecimiento frutal, infiriéndose una ausencia de fertilización y la posibilidad de alguna barrera pre-fertilización, como incapacidad de germinación del polen o incongruencia.
- A pesar de que no fue posible corroborar experimentalmente que las semillas producto de cruces utilizando a *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' como pariente materno eran viables, esta fue la especie que mostró más potencial como especie intermediaria y receptiva a hibridización, siendo exitosa a los sumo hasta la etapa de crecimiento frutal
- Se estableció la hipótesis de que las semillas obtenidas del cruce *P. ×mexicali* 'Sunburst Ruby' × *P. barbatus* 'Rondo' han abortado sus embriones, o son una mezcla de semillas con embrión abortivo y óvulos sin fertilizar, los cuales no son distinguibles unos de otros.

RECOMENDACIONES

- Realizar tratamientos control de auto-polinización y dejar flores sin polinizar.
- Utilizar al menos tres clones por cada cultivar, con edad homogénea, para darle significancia estadística al estudio
- Realizar las polinizaciones en las épocas de mayor floración, para tener mayor disponibilidad de flores y polen.
- Realizar un estudio de viabilidad o longevidad del polen, para complementarlo con la cronología de dehiscencia del mismo.
- Buscar alternativas a la medición de los frutos para evitar su manipulación y posible daño. Realizar también mediciones de peso y número de semillas, una vez madurados los frutos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abruzzo, J; Ault, J. *s.f.*. Age on Fruit Set of Cross-Pollinated *Penstemon kunthii* Hybrids [En línea]. Chicago Botanic Garden. Disponible en: <http://labs.corpus-callosum.com/cbg/Posters2004/Abruzzo.pdf>.
- Acquaah, G. 2007. Principles of Plant Genetics and Breeding. 1st Edition. Oxford, UK. Blackwell Publishing.
- Albach, D; Meudt, H; Oxelman, B; 2005. Piecing Together the “New” Plantaginaceae. American Journal of Botany 92(2): 297–315.
- Allard, R. 1999. History of Plant Population Genetics. Annual Review of Genetics. Vol. 33: 1-27.
- Andersson, S; Mansby, E; Prentice, H. 2008. Paternal effects on seed germination: a barrier to the genetic assimilation of an endemic plant taxon?. J. Evol. Biol. 21 1408–1417.
- Andersson, S. 1990. Paternal effects on seed size in a population of *Crepis tectorum* (Asteraceae) OIKOS 59: 3-8.
- Baenziger, P; Erayman, M; Budak, H; Campbell, B. 2000. Breeding Pure Line Cultivars. Encyclopedia of Plant and Crop Science.
- Bangerth, F. 2004. Internal Regulation of Fruit Growth and Abscission. Proc. XXVI IHC – Deciduous Fruit and Nut Trees. Ed.: Webster A.D. Acta Hort. 636, ISHS.
- Bomblies, K. 2006. Hybrid Incompatibility: When Opposites Attract with a Fatal Outcome. Current Biology Vol 16 No 14.
- Brar, D. 2004. Interspecific Hybridization. Encyclopedia of Plant and Crop Science
- Bushell, C; Spielman, M; Scott, R. 2003. The Basis of Natural and Artificial Postzygotic Hybridization Barriers in *Arabidopsis* Species. The Plant Cell, Vol. 15, 1430–1442.
- Castellanos, M; Wilson, P; Thomson, J. 2004. Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. J. Evol. Biol. 17 876–885
- Chari, J; Wilson, P. 2001. Factors limiting hybridization between *Penstemon spectabilis* and *Penstemon centranthifolius*. Can. J. Bot. 79: 1439–1448.
- Clements, R; Baskin, J; Baskin C. 1999. The Comparative Biology of the Two Closely-Related Species *Penstemon tenuiflorus* Pennell and *P. hirsutus* (L.) Willd. (Scrophulariaceae, Section Graciles):

- II. Reproductive Biology. *Castanea*, Vol. 64, No. 4, pp. 299-309
- Comis, D. 2000. Keeping the Bloom on the Floral and Nursery Industry. *Agricultural Research*, Vol. 48, Fasc. 12.
- Cooper, D; Brink, R. 1940. Somatoplastic Sterility as a Cause of Seed Failure After Interspecific Hybridization. *Genetics* 25: 503.
- Costa, E; Scariot, V; Beruto, M. 2007. The Development of New Products Through the Collection of Old Cultivars and Wild Species of *Ranunculus* Genus. *Acta Hort. (ISHS)* 743:45-49
- Cox, C; Swain, S. 2006. Localized and non-localized promotion of fruit development by seeds in *Arabidopsis*. *Functional plant biology*, vol. 33, n 1, pp. 1-8.
- Crosswhite, F. 1965. Hybridization of *Penstemon barbatus* (Scrophulariaceae) of Section Elmigera with Species of a Section Habroanthus. *The Southwestern Naturalist*, Vol. 10, No. 4, pp. 234-237
- Dafni, A; Firmage, D. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst. Evol.* 222:113-132.
- Daughtrey, M; Benson, M. 2005. Principles of plant health management for ornamental plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:141-69
- Dinu, I; Thill, C. 2004. Endosperm and embryo development in interspecific incompatible *Solanum* crosses (Abstr). *Am J Potato Res* 81:57
- Douglas, A. 2007. Sexual Compatibility and Seed Germination in *Nolana* Species. (Thesis for the degree of MSc. in Plant Biology). Durham, New Hampshire. University of New Hampshire. 151 pp.
- Fehr, W. 1991. Principles of Cultivar Development Vol. 1: Theory and Technique. Macmillan, New York.
- Fishman, L; Willis, J. 2001. Evidence for Dobzhansky-Muller Incompatibilities Contributing to the Sterility of Hybrids between *Mimulus guttatus* and *M. nasutus*. *Evolution*, Vol. 55, No. 10, pp. 1932-1942.
- Flores, E. 1999. La Planta: Estructura y Función. 1ra edición. Cartago, Costa Rica. Libro Universitario Regional. 884 p.
- García, F. 2002. Plant molecular breeding: objectives, safety issues and prospects. *European Review*,

10:3:409-416 Cambridge University Press.

- Gillaspy, G; Ben-David, H; Gruissem, W. 1993. Fruits: A Developmental Perspective. *The Plant Cell*, Vol. 5, 1439-1451.
- Grassoti, A; Torrini, F. 1990. Genetic improvement of *Lilium* in Italy. *In: V International Symposium on Flower Buds. ISHS Acta Horticulturae* 266
- Hallauer; A. 2004. Breeding Hybrids. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*.
- Hauser, T; Jorgensen, R; Ostergard, H. 1997. Preferential Exclusion of Hybrids in Mixed Pollinations Between Oilseed Rape (*Brassica napus*) and Weedy *B. campestris* (Brassicaceae). *Botanical Society of America* 84 (6); 756-762.
- Hayes, R; Dinu, I; Thill C. 2005. Unilateral and bilateral hybridization barriers in inter-series crosses of 4x 2EBN *Solanum stoloniferum*, *S. pinnatisectum*, *S. cardiophyllum*, and 2x 2EBN *S. tuberosum* haploids and haploid-species hybrids. *Sex Plant Reprod* 17: 303–311
- Janick, J. 2005. The Origins of Fruits, Fruit Growing, and Fruit Breeding. *Plant Breeding Rev.* 25: 255-320.
- Jauhar, P. 2006. Modern Biotechnology as an Integral Supplement to Conventional Plant Breeding: The Prospects and Challenges *Crop Sci.* 46:1841–1859
- Jerardo, A. 2007. Floriculture and Nursery Crops Yearbook. Market and Trade Economics Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture.
- Kimball, S; Campbell, D; Lessin, C. 2008. Differential performance of reciprocal hybrids in multiple Environments. *Journal of Ecology* 96.
- Lange, R; Scobell, S; Scott, P. 2000. Hummingbird-Syndrome Traits, Breeding System, and Pollinator Effectiveness in Two Syntopic *Penstemon* Species Source: *International Journal of Plant Sciences*, Vol. 161, No. 2 pp. 253-263
- Lara, C; Ornelas, J. 2008. Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization?. *Pl Syst Evol* 271: 223–237
- Levin, D. 2003. The Cytoplasmic Factor in Plant Speciation. *Systematic Botany* (2003), 28(1): pp. 5-11.
- Lewinsohn, J; Tepedino, V. 2007. Breeding Biology and Flower Visitors of the Rare White River *Penstemon*, *Penstemon scariosus* var. *albifluvis* (Scrophulariaceae). *Western North American*

Naturalist 67(2), pp. 232–237

- Lin, B. 1984. Ploidy Barrier to Endosperm Development in Maize. *Genetics* 107: 103-115.
- Liu, H; Yan, G; Sedgley, R. 2006. Interspecific hybridization in the genus *Leucadendron* through embryo rescue. *South African Journal of Botany* 72 416–420
- Lynn, S. 2001. Evolution and dynamics of hybridization in *Penstemon* subgenus *Dasanthera* (Scrophulariaceae S.L.) Thesis Degree Doctor of Philosophy. Ohio, United States. The Ohio State University. 114 p.
- Mackanness, F. 1959. Experimental hybridization of Columbia River Gorge *Penstemons*. *Northwest Science* 33: 129-134.
- Mazer, S; Paz, H; Bell, M. 2004. Life, Histoyr, Floral Development, and Mating System in *Clarkia xantiana* (Onagraceae): Do Floral and Whole Plant Rates of Development Evolve Independently?. *American Journal of Botany* 91(12): 2041-2050.
- Meyer, S. *Penstemon* Schmidl: *Penstemon*, beardtongue. En: Bonner, F; Karrfalt, R. Eds. The Woody Plant Seed Manual. Agric. Handbook No. 727. 2008. Washington, DC. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. p. 774-777
- Moose, S; Mumm, R. 2008. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiol.* 147(3): 969–977.
- Nakamura, R. 1986. Maternal Investment and Fruit Abortion in *Phaseolus vulgaris*. *Amer. J. Bot.* 73(7): 1049-1057.
- Ohkawa, K; Kano, A; Nukaya, A. 1990. Time of flower bud differentiation in Asiatic hybrid lilies. En: V International Symposium on Flower Buds. ISHS Acta Horticulturae 266
- Orians, C. 2000. The Effects of Hybridization in Plants on Secondary Chemistry: Implications for the Ecology and Evolution of Plant-herbivore Interactions. *American Journal of Botany* 87(12): 1749–1756.
- Ostergaard, L. Fruit development and seed dispersal. Vol. 38. Oxford, Wiley Blackwell; 2009. pp. 326–345.
- Reid, M. 2005. Flower Development: From Bud to Bloom. Proc. VIIIth IS Postharvest Phys. Ornamentals Eds. Marissen, N *et al.* Acta Hort. 669, ISHS 2005

- Seavey, S; Mangels, S; Chapel, N. 2000. Unfertilized Ovules of *Epilobium obcordatum* (Onagraceae) Continue to Grow in Developing Fruits. *American Journal of Botany* 87(12): 1765–1768.
- Shehata, A. On the Taxonomy of Plantaginaceae Juss. Sensu Lato: evidence from SEM of the Seed Coat. *Turk J Bot* 30 (2006) 71-84.
- Stone, J; Thomson, J; Dent-Acosta, S. 1995. Assessment of Pollen Viability in Hand-Pollination Experiments: A Review. *American Journal of Botany*, Vol. 82, No. 9, pp. 1186-1197
- Straw, R. 1955. Hybridization, Homogamy, and Sympatric Speciation. *Evolution*, Vol. 9, No. 4, pp. 441-444.
- Straw, R. 1956. Floral isolation in *Penstemon*. Vol. XC, No. 850 *The American Naturalist* January-February, 1956.
- Straw, R. 1966. A Redefinition of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Brittonia*, Vol. 18, No. 1. pp. 80-95.
- Swanson, R; Edlund, A; Preuss, D. 2004. Species Specificity in Pollen Pistil Interactions. *Annu. Rev. Genet.* 38:793–818
- Tepedino, V; Sipes, S; Griswold, T. 1999. The reproductive biology and effective pollinators of the endangered beardtongue *Penstemon penlandii* (Scrophulariaceae). *Plant Syst. Evol.* 219:39-54
- Tepedino, V; Bowlin, W; Griswold, T. 2006. The Pollination Biology of the Endangered Blowout *Penstemon* (*Penstemon haydenii* S. Wats.: Scrophulariaceae) In *Nebraska. J. Torrey Bot. Soc.* 133: 548-559.
- The Conard-Pyle Company. 2009. About us. Pennsylvania, U. S. A. Disponible: <<http://www.conard-pyle.com/index.cfm/fuseaction/home.showpage/pageID/2/index.htm>>
- Thomson, J; Rigney, L; Karoly, K; Thomson, B. 1994. Pollen Viability, Vigor, and Competitive Ability in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany*, Vol. 81, No. 10, pp. 1257-1266.
- USDA (Department of Agriculture, US). 2009. Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Penstemon* Schmidel [En línea]. The PLANTS Database. Disponible en <<http://plants.usda.gov>>
- Van Doorn, W; Van Meeteren, U. 2003. Flower opening and closure: a review. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 389, pp. 1801-1812.

- Van Uffelen, R; De Groot, N. 2005. Floriculture world wide; production, trade and consumption patterns show market opportunities and challenges [En línea]. Disponible en: <http://ageconsearch.umn.edu/handle/29148>.
- Vervaeke, I; Parton, E; Maene, L; Deroose, R; De Proft, M. Prefertilization barriers between different Bromeliaceae. *Euphytica* 118: 91–97, 2001.
- Viehmeyer, G. 1958. Reversal of evolution in the genus *Penstemon*. *The American Naturalist*, 864:129-137.
- Way, D; James, P. 1998. *The Gardener's Guide to Growing Penstemons*. United States of America, Timber Press Inc. 160 p.
- Willi, Y; Van Buskirk, J. 2005. Genomic compatibility occurs over a wide range of parental genetic similarity in an outcrossing plant. *Proc. R. Soc. B.* 272, 1333-1338.
- Wilson, P; Valenzuela, M. 2002. Three Naturally Occurring *Penstemon* Hybrids. *Western North American Naturalist* 62(1) pp. 25–31.
- Wilson, P; Castellanos, M; Hogue, J; Thomson, J; Armbruster, W. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *OIKOS* 104: 345–3.
- WIPO (World Intellectual Property Organization). 2006. UPOV: The Impact of plant variety protection [En línea]. WIPO Magazine. Geneva. No. 4. Disponible en: <http://www.wipo.int/wipo_magazine/en/pdf/2006/wipo_pub_121_2006_04.pdf>
- Wolfe, A; Randle, C; Datwyler, S; Morawetz, J; Arguedas, N; Diaz, J. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeography of *Penstemon* (Plantaginaceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany* 93(11): 1699–1713. 2006.
- Zhou, W. 1995. The Role of Horticulture In Human History and Culture. *Acta Hort. (ISHS)* 391:41-52