



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**Evaluación morfológica y genética de la posible hibridación
entre *Fuchsia microphylla* y *F. thymifolia* (Onagraceae)**

TESIS QUE PRESENTA

Biol. Cinthya Indira Cervantes Díaz

Para obtener el título de
Maestra en ciencias biológicas
Área temática ecología y conservación

Asesor de tesis
Doctor en ciencias
Eduardo Cuevas García

Coasesor de tesis
Doctor en ciencias
Mauricio Quesada Avendaño

Febrero de 2016, Morelia, Michoacán



A mi padre Luis A. Cervantes B.

A mi madre María Díaz G.

A mis hermanos Jonathan y Miguel

A mi novio Jorge A. Ramírez S.

A mis familiares y amigos

Les dedico todo el esfuerzo invertido, porque siempre han creído en mí y han estado a mi lado, incluso para escucharme hablar y hablar sin comprenderme.

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de los integrantes de mi comité tutorial durante este proceso: Dr. Mauricio, Dr. Fernando, Dr. Antonio, Dr. Omar y sobre todo a mi asesor el Dr. Eduardo Cuevas quien siempre me ha brindado su confianza y apoyo en todo momento.

A Gumersindo Sánchez y Hernán quienes me apoyaron desde el primer día de trabajo en el laboratorio.

A los Doctores Lucho y Clement muchas gracias por ayudarme y aclararme tantas dudas aunque fuera de rato en rato.

A todos mi compañeros del laboratorio del Dr. Mauricio: Francisco, Martín, Marichuy, Jacob, Estrella y demás compañeros de los cuales se me escapa su nombre por el momento, gracias por siempre estar ahí cuando necesite de su auxilio.

De igual manera a cada una de las personas que se tomaron un poco de su tiempo para conocer mí proyecto y hacerme sugerencias y/o comentarios al respecto.

A CONACyT por la beca otorgada.

Por último y no menos importante gracias a mis compañeros de maestría que siempre me dieron ánimos y colaboraron conmigo en especial a Alejandro, Ulises, Pedro y Marisol.

INDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS	10
III. OBJETIVOS.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
4.1 ÁREA DE ESTUDIO	12
4.2 ESPECIES DE ESTUDIO	12
4.2.1 <i>Fuchsia microphylla</i> H.B.K.....	14
4.2.2 <i>Fuchsia thymifolia</i> H.B.K.....	14
4.3 TRABAJO DE CAMPO	16
4.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS.....	17
4.4.1 Morfometría Geométrica Foliar	17
4.4.2 Morfometría Geométrica Floral	17
4.5 ANÁLISIS GENÉTICOS	20
4.5.1 Genotipificación usando microsatélites	20
4.5.2 Identificación de especies progenitoras e híbridos.....	20
4.5.3 Diversidad genética de especies progenitoras e híbridos.....	21
4.5.4 Análisis de Coordenadas Principales	22
4.5.5 Correlación entre distancias genéticas, morfológicas y geográficas	22
V. RESULTADOS.....	23
5.1 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA FOLIAR	23
5.2 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA FLORAL.....	30
5.2.1 Tubo floral.....	31
5.2.2 Pétalos.....	34
5.2.3 Sépalos	38
5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	41
5.4 ANÁLISIS GENÉTICOS	42
5.4.1 Identificación de especies progenitoras e híbridos.....	42
5.4.2 Diversidad genética de especies progenitoras e híbridos.....	44
5.4.3 Análisis de Coordenadas Principales	49

5.4.4	Correlación entre distancias genéticas, morfológicas y geográficas	51
VI.	DISCUSIÓN	55
6.1	MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA	55
6.2	IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES PROGENITORES E HÍBRIDOS.....	57
6.3	DIVERSIDAD GENÉTICA DE ESPECIES PROGENITORES E HÍBRIDOS	60
6.4	ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	61
6.5	CORRELACIÓN ENTRE MATRICES MORFOLÓGICAS, GENÉTICAS Y GEOGRÁFICAS	61
VII.	CONCLUSIONES	63
	LITERATURA CITADA	64
	ANEXO 1: NOTA DE LOS MICROSATÉLITES	69
	ANEXO 2: MÉTODO DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa de distribución de las poblaciones de las especies de estudio.....	13
Figura 2.	Fotografía de flores y hojas de <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos putativos de Garnica.....	15
Figura 3.	Fotografías de flores y hojas analizadas con morfometría geométrica.....	18
Figura 4.	AVC del reconocimiento foliar de las especies de estudio.....	24
Figura 5.	AVC de hojas de progenitores e híbridos.....	27
Figura 6.	AVC de categorías de híbridos.....	27
Figura 7.	AVC del tubo floral entre especies.....	31
Figura 8.	AVC del tubo flora por morfo en <i>F. thymifolia</i>	32
Figura 9.	AVC de pétalos entre especies de estudio.....	34
Figura 10.	AVC de pétalos entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> por morfo.....	35
Figura 11.	AVC de sépalos entre las especies de estudio.....	39
Figura 12.	AVC de sépalos entres poblaciones de <i>F. microphylla</i> por morfo.....	39
Figura 13.	ACP de las estructuras evaluadas en <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos putativos.....	41
Figura 14.	Estructura genética entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> e híbridos.....	43

Figura 15. Estructura genética entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos putativos.....	44
Figura 16. ACoP de poblaciones de <i>F. microphylla</i> e híbridos.....	50
Figura 17. ACoP entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de 25 trabajos sobre hibridación.....	6
Tabla 2. Descripción del número final de fotografías.....	19
Tabla 3. Resumen de AVC de comparaciones entre poblaciones de hojas.....	26
Tabla 4. Clasificación a priori y posteriori de hojas.....	29
Tabla 5. Resumen de AVC entre tubos florales, pétalos y sépalos.....	30
Tabla 6. Clasificación a priori y posteriori de tubos florales.....	33
Tabla 7. Clasificación a priori y posteriori de pétalos.....	37
Tabla 8. Clasificación a priori y posteriori de sépalos.....	40
Tabla 9. Coeficientes de endogamia corregidos por presencia de alelos nulos.....	45
Tabla 10. Parámetros de diversidad genética en poblaciones de <i>F. microphylla</i>	46
Tabla 11. Diferenciación genética entre poblaciones de <i>F. microphylla</i>	47
Tabla 12. Parámetros de diversidad genética entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos putativos.....	48
Tabla 13. Diferenciación genética entre poblaciones de <i>F. microphylla</i> , <i>F. thymifolia</i> e híbridos putativos.....	48
Tabla 14. Diferenciación genética entre especies e híbridos.....	49
Tabla 15. Pruebas de Mantel entre distancias morfológicas y geográficas.....	52
Tabla 16. Pruebas de Mantel entre distancias genéticas y geográficas.....	53
Tabla 17. Pruebas de Mantel entre distancias genéticas y morfológicas.....	54
Tabla 18. Microsatélites desarrollados para <i>F. microphylla</i>	71
Tabla 19. Parámetros básicos de diversidad genética para poblaciones de <i>F. microphylla</i>	71

RESUMEN

La hibridación es un proceso cuya importancia radica en ser fuente de innovaciones genéticas facilitando la especiación y radiación adaptativa. Se ha documentado que entre el 16-34% de las familias de plantas presentan algún reporte de hibridación. Uno de estos casos es la familia Onagraceae y particularmente el género *Fuchsia*. En México *F. microphylla* y *F. thymifolia* presentan poblaciones alopátricas y simpátricas en las que se ha registrado la presencia de híbridos putativos. El objetivo de este trabajo es comprobar la existencia de la hibridación en tales poblaciones.

Se usaron siete microsátélites de *F. microphylla* para conocer la estructura genética, la diversidad genética y la diferenciación genética entre las poblaciones de ambas especies e híbridos. Además, con ayuda de la morfometría geométrica se comparó la forma de hojas, tubos florales, pétalos y sépalos entre las dos especies y los híbridos putativos.

Las cuatro estructuras morfológicas estudiadas no presentan el mismo patrón de semejanza ya que las hojas y tubos florales de los híbridos putativos se parecen más a *F. thymifolia*, mientras que los pétalos y sépalos son más parecidos a los de *F. microphylla*. Sin embargo, estos últimos verticilos no son confiables para distinguir una especie de la otra. Siendo la forma de las hojas y los tubos florales las estructuras que mejor permiten diferenciar a los parentales de los híbridos. Respecto a los análisis genéticos, parece existir una introgresión sesgada hacia *F. microphylla* debido a que de los siete microsátélites empleados solamente cuatro amplificaron en *F. thymifolia*. Por el contrario, todos estos funcionaron en los híbridos putativos. A pesar de que la estructura genética no está totalmente definida entre estas dos especies con apenas tres microsátélites, es posible visualizar que los híbridos putativos poseen una mayor diversidad genética seguidos de *F. microphylla* y *F. thymifolia*. En conclusión, se encontró que los híbridos putativos parecen ser morfológicamente parecidos a *F. thymifolia* y genéticamente similares a *F. microphylla*. No obstante, se requiere incluir más marcadores para corroborar estos resultados.

Palabras clave: *F. microphylla*, *F. thymifolia*, hibridación, microsátélites, morfometría geométrica.

ABSTRACT

The hybridization is a process of relevance for genetics innovations and may facilitate the speciation process and adaptive radiation. Approximately 16-34% of plant families have some report of hybridization. One example of hybridization is the genus *Fuchsia* (Onagraceae). In Mexico *F. microphylla* and *F. thymifolia* have allopatric and sympatric populations in which there are some reports about putative hybrids. The main goal of this project is to test if hybridization is occurring in sympatric populations of *Fuchsia microphylla* and *F. thymifolia*.

Seven microsatellites of *F. microphylla* were used to estimate the genetic structure, genetic diversity and genetic differentiation across populations of *F. microphylla*, *F. thymifolia* and putative hybrids. Additionally, geometric morphometric were used in order to compare the shape of leaves, floral tubes, petals and sepals between the populations of both species and putative hybrids.

The four morphological structures that were studied did not show the same direction of similarity. The leaves and floral tubes of hybrids were more similar to *F. thymifolia*, while the petals and sepals were more similar to *F. microphylla*. Nevertheless, the shape of petals and sepals did not allowed to separate clearly one species from the other. For this reason, the shape of leaves and floral tubes were the more suitable structures for recognize the parental species and the hybrids. All of the seven microsatellites amplified well in putative hybrids and only five work without problem in *F. thymifolia*. This suggest a possible biased introgression into *F. microphylla*. Although there is no a clear genetic structure between both species with only three loci, it is possible see how the hybrids have more genetic diversity follow by *F. microphylla* and *F. thymifolia*. In conclusion, the putative hybrids are morphologically more like to *F. thymifolia* and genetically more like to *F. microphylla*. But it is necessary to include more molecular makers in order to corroborate this results.

Key words: *F. microphylla*, *F. thymifolia*, hybridization, microsatellites, geometric morphometric.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las preguntas que más ha intrigado a la humanidad desde hace mucho tiempo es ¿cómo se originan las especies?. A pesar de que existen varias aproximaciones y distintos enfoques para tratar de contestar esta pregunta, de manera general se reconoce que se requiere de la presencia de barreras de aislamiento reproductivo, las cuales limitan el flujo de genes interespecífico y mantienen la integridad de las especies (Dell'Olivo *et al.* 2011). En general, las barreras se clasifican de acuerdo al momento en la historia de vida de los organismos en el que actúan. Se consideran barreras precigóticas a las diferencias ecogeográficas, temporales y de comportamiento entre las especies; por otro lado, las barreras postcigóticas se caracterizan por actuar después de la fertilización y pueden provocar la inviabilidad híbrida o esterilidad híbrida (Ramsey *et al.* 2003, Kay 2006).

Trabajos de recopilación recientes (Lowry *et al.* 2008; Brys *et al.* 2014), concuerdan en que las barreras precigóticas tienen una mayor contribución que las postcigóticas para mantener la integridad de especies cercanas que viven en simpatría. La importancia de estudiar la efectividad de estas barreras, radica en saber si son suficientes para prevenir por completo el flujo genético entre especies.

Ramsey *et al.* (2003), evaluaron los componentes de las barreras reproductivas entre las especies hermanas *Mimulus lewisii* y *M. cardinales*. Encontraron que las barreras precigóticas previenen alrededor del 99.8% del flujo génico. También observaron que los híbridos resultantes de la F1 mostraron una baja tasa de germinación y una baja fertilidad de polen y óvulos. Sin embargo, Bradshaw *et al.* (1998), realizaron un trabajo evaluando QTL y caracteres morfológicos florales en poblaciones de invernadero conformadas por plantas

progenitoras de *M. lewisii* y *M. cardinales*, individuos F1 y F2, de estos últimos obtuvieron 480 individuos que produjeron flores.

Kay (2006), estudió el aislamiento reproductivo entre *Costus scaber* y *C. pulverulentus* encontrando que las barreras precigóticas son muy fuertes, de tal forma que evitan entre el 99% y el 100% del flujo génico. A pesar de esto, una vez que los híbridos superan la etapa de germinación crecen vigorosamente. Recientemente, Surget-Groba y Kay (2013), evaluaron el flujo genético mediante marcadores microsatelitales entre estas mismas especies a lo largo de su distribución geográfica, encontrando un alto aislamiento genético entre poblaciones dentro de cada especie y un bajo nivel de introgresión entre especies en las poblaciones simpátricas evaluadas.

Estas barreras funcionan como un filtro al flujo génico, entre especies de plantas, pero su eficacia dependerá de la fenología de la floración, la especificidad de los polinizadores y el sistema de apareamiento, aunque se considera que cierto grado de flujo de genes puede superar estas barreras (Widmer *et al.* 2009). La hibridación para Rieseberg (1997) es la producción, en condiciones naturales, de descendencia a partir del entrecruzamiento de individuos pertenecientes a poblaciones que pueden distinguirse con base en por lo menos un carácter heredable, independientemente de su estatus taxonómico. Ellstrand *et al.* (1996), especifican que los grupos donde ocurre con mayor frecuencia la hibridación se caracterizan por: a) fecundación cruzada y aislamiento reproductivo incompleto, b) flexibilidad ecológica para que los híbridos se desarrollen hasta la madurez y c) hábito perenne y apomíctico o reproducción vegetativa, lo que permite que aunque los híbridos sean parcialmente estériles obtengan cierto éxito reproductivo. Además, Quiroga *et al.* (2005), postulan que para que los híbridos puedan establecerse y sobrevivir, deberían desarrollarse en “hábitats híbridos”,

los cuales, muchas veces son sitios perturbados donde las especies progenitoras tendrían disminuida su adecuación.

La hibridación y su importancia en la evolución y especiación de las plantas se ha debatido durante décadas (Soltis y Soltis, 2009). En la actualidad, con ayuda de los marcadores moleculares, los biólogos han encontrado evidencia de que la hibridación parece facilitar la especiación y radiación adaptativa tanto en los animales como en las plantas (Mallet, 2007).

Mallet (2007) propone que entre más emparentadas sean las especies es más probable que ocurra la hibridación, la cual se considera como una característica normal de la biología de las especies aunque los híbridos interespecíficos puedan llegar a representar solo un 0.1% de los individuos de una población típica. A pesar de ello se considera que la hibridación puede ser un catalizador no sólo para la especiación, sino también para las grandes innovaciones evolutivas. Rieseberg (1997), menciona que la compilación de Knobloch (1971) es el más completo listado sobre ejemplos de híbridos interespecíficos (23675 casos). A pesar de ello, solo entre el 16-34% de las familias de plantas y entre el 6-16% de los géneros tienen uno o más híbridos reportados. Además, contempla que existen alrededor de 50 ejemplos de especiación híbrida homoploide (cuando hibridan especies con igual ploidía, generando nuevas especies) pero para Rieseberg solamente ocho de estos casos han sido bien documentados.

La hibridación no siempre se da a la par de la introgresión, la cual se define como el flujo genético entre las poblaciones cuyos individuos hibridan. Este movimiento de genes se logra cuando los híbridos se retrocruzan con una o ambas poblaciones progenitoras (Rhymer y Simberloff, 1996; Quiroga *et al.* 2005; Eguiarte *et al.* 2007). Furches *et al.* (2013) señala que

cuando la introgresión ocurre surge la pregunta de ¿en qué grado la hibridación podría afectar el pool genético de las especies involucradas y en un futuro su evolución?

A menudo la morfología no es suficiente para identificar a los híbridos, sobre todo después de varias generaciones de retrocruzamiento (esto ocurre cuando un individuo híbrido se cruza con algún parental). En otras ocasiones, las observaciones morfológicas pueden sugerir la hibridación, pero la introgresión no siempre se refleja morfológicamente; por ello, con los marcadores moleculares ahora se puede documentar el grado de hibridación e introgresión entre poblaciones (Rhymer y Simberloff, 1996).

Dentro de la variedad de marcadores moleculares los microsatélites (también conocidos como SSR = Simple Sequence Repeats) actualmente son considerados uno de los marcadores genéticos más populares para mapeo, prueba de paternidad y genética de poblaciones, debido principalmente a su alto polimorfismo, herencia co-dominante, y amplia distribución en el genoma (Schlotterer, 2004; Selkoe y Toonen, 2006; Balvino, 2012). Los microsatélites son secuencias tándem repetitivas de 1-6 nucleótidos encontrados en alta frecuencia en los genomas nucleares de muchos taxa. Los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí, lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo (Eguiarte *et al.* 2007).

Otra importante ventaja de los microsatélites es que trabajan directamente con la fuente de variación (ADN) y no están influenciados por el ambiente como en el caso de los caracteres morfológicos (Balvino, 2012). Sin embargo, en algunos estudios (Archibald *et al.* 2004 y Lihová *et al.* 2011), se ha visto que la información genética no siempre concuerda con los resultados de la evaluación morfológica, a pesar de ello, lo más recomendable es contrastar ambos tipos de evidencia (Tabla 1).

Para evaluar la hibridación se han utilizado diferentes herramientas moleculares por ejemplo: ADN de cloroplastos, ADN ribosómico, ISSR, RAPD's entre otros. Actualmente ha incrementado el número de trabajos que utilizan microsatélites, a continuación se describen 25 ejemplos de sistemas de estudio donde se evaluó la hibridación. Estos trabajos abarcan 15 familias, 18 géneros y 58 especies, con un promedio de 2.4 especies por artículo, los cuales en su mayoría (17/25) incluyen tanto poblaciones simpátricas como alopátricas (para cada especie como referencia). Además en un 68% de los casos se incluyen tanto análisis de morfología como de biología molecular (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de 25 trabajos donde se evaluó la hibridación mediante diferentes herramientas morfológicas y moleculares.

* utilizaron alguna otra herramienta; el número de SSR usados entre paréntesis; S = poblaciones simpátricas muestreadas;

A = poblaciones alopátricas para cada especie en el orden como aparecen en la columna especies; D= no especifican.

Familias	Géneros	Especies	# spp	Sitios	Morfología	Marcador molecular	Autores	Conclusión
Aizoaceae	<i>Carpobrotus</i>	<i>C. edulis</i> , <i>C. chilensis</i>	2	49 D	vegetal, frutal		Albert et al. 1997	Enjambre híbrido con Introgresión hacia <i>C. edulis</i>
Asteraceae	<i>Senecio</i>	<i>S. jacobaeae</i> , <i>S. aquaticus</i>	2	1 S, 2 A		AFPLs *	Heather et al. 2004	Retrocruzas con <i>S. jacobaeae</i> , la morfología los confunde
	<i>Borrichia</i>	<i>B. frutescens</i> , <i>B. arborescens</i>	2	23 S, 3/1 A	foliar, floral y tallos	nADN, CpADN	Cattell y Karl, 2004	Introgresión hacia <i>B. frutescens</i>
Brassicaceae	<i>Cardamine</i>	<i>C. pratensis</i> , <i>C. raphanifolia</i>	2	4 S, 5/6 A	vegetal, floral	nADN, CpADN, AFPLs *	Lihová et al. 2007	Fenotipos progenitores afectados por introgresión, e híbridos intermedios similares genéticamente a un progenitor
Dipterocarpaceae	<i>Shorea</i>	<i>S. curtisii</i> , <i>S. leprosula</i> , <i>S. parvifolia</i>	3	1 S	taxonómica	nADN, CpADN	Kamiya et al. 2011	Hibridación con pocos casos de introgresión
Ericaceae	<i>Rhododendron</i>	<i>R. ponticum</i> , <i>R. smirnovii</i> , <i>R. ungeronii</i> , <i>R. caucasicum</i>	4	9 S, 1/0/0/1 A	foliar, floral	nADN, CpADN	Milne et al. 1999	Distintas etapas de hibridación e introgresión
Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>	<i>A. gracilens</i> , <i>A. monococca</i>	2	herbario	vegetal		Levin 1998	Variación morfológica debida al ambiente
Fagaceae	<i>Quercus</i>	<i>Q. crispula</i> , <i>Q. dentata</i>	2	1 S, 2/1 A	foliar	AFPLs *	Ishida et al. 2003	Información morfológica y de minadores diferencian a las especies e híbridos
		<i>Q. petraea</i> , <i>Q. robur</i> , <i>Q. pubescens</i> , <i>Q. pyrenaica</i>	4	1 S	foliar	SSR (10)	Viscosi et al. 2009	Los híbridos son un mosaico de fenotipos con caracteres de progenitores e intermedios
		<i>Q. hypoleucoides</i> , <i>Q. scytophylla</i> , <i>Q. sideroxylla</i>	3	13 S, 2/4/4 A	foliar	SSR (7)	Peñaloza-Ramírez et al. 2010	Compleja zona híbrida con un mosaico de genotipos
		<i>Q. magnoliifolia</i> , <i>Q. resinosa</i> ,	2	1 S, 2/2 A	foliar	SSR (8)	Albarrán-Lara et al. 2010	Zona híbrida por contacto secundario
		<i>Q. acuta</i> , <i>Q. salicina</i> , <i>Q. glauca</i>	3	3 S		nSSR (6)	Lee et al. 2014	Baja hibridación, los híbridos F1 posiblemente estériles
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	<i>E. rubida</i> , <i>E. viminalis</i> ,	3	12 S, 5/5/5 A	vegetal	isoenzimas	Field et al. 2009	La F1 se identifica bien, las siguientes generaciones se

		<i>E. aggregata</i>						confunden con progenitores puros
Nothofagaceae	<i>Nothofagus</i>	<i>N. antarctica</i> , <i>N. pumilo</i>	2	1 S, 3/2 A	foliar	isoenzimas	Quiroga et al. 2005	Introgresión hacia <i>N. antarctica</i>
		<i>N. dombeyi</i> , <i>N. antarctica</i>	2	5 S	vegetal, floral	isoenzimas	Stecconi et al. 2004	Introgresión hacia <i>N. antarctica</i>
Orchidaceae	<i>Orchis</i>	<i>O. militaris</i> , <i>O. purpurea</i>	2	1 S, 1/1 A	floral	AFLPs	Jacquemyn et al. 2012	Enjambre híbrido con introgresión hacia <i>O. purpurea</i>
	<i>Epidendrum</i>	<i>E. fulgens</i> , <i>E. puniceoluteum</i>	2	6 S, 1/1 A		nSSR (9), SSR plástidos	Pinheiro et al. 2010	Se detectaron híbridos F1 y F2, así como introgresión hacia <i>E. puniceoluteum</i>
Proteaceae	<i>Lomatia</i>	<i>L. myricoides</i> , <i>L. silaifolia</i>	2	3 S	vegetal y floral	SSR (12)	McIntosh et al. 2013	Sitios con distintas etapas de hibridación
Saliaceae	<i>Salix</i>	<i>S. eriocephala</i> <i>S. sericea</i>	2	1 S	foliar y brotes	RAPD, cpADN, rADN *	Hardig et al. 2000	Introgresión hacia <i>C. eriocephala</i>
		<i>S. dasyclados</i> , <i>S. schwerinii</i> , <i>S. viminalis</i>	3	7 S, 0/2/5 A	foliar y brotes	cpSSR (4), SNP	Fogelqvist et al. 2015	Alta introgresión, bajo número de híbridos F1
Sarraceniaceae	<i>Sarracenia</i>	<i>S. leucophylla</i> , <i>S. alata</i> , <i>S. rubra</i>	3	1 S, 1/1/1 A		SSR (8)	Furches et al. 2013	Hibridación introgresiva
Scrophulariaceae	<i>Zaluzianskya</i>	<i>Z. natalensis</i> , <i>Z. microsiphon</i>	2	1 S, 2/5 A	foliar y floral	ISSR	Archibald et al. 2004	Los híbridos genéticamente parecidos a <i>Z. microsiphon</i> y morfológicamente parecidos a <i>Z. natalensis</i>
	<i>Buddleja</i>	<i>B. crispa</i> , <i>B. officinalis</i>	2	1 S, 1/1 A	foliar	loci nucleares, nrETS	Liao et al. 2015	La mayoría de los híbridos son F1, introgresión hacia <i>B. crispa</i>
Ulmaceae	<i>Ulmus</i>	<i>U. pumila</i> , <i>U. minor</i>	2	61 S, 1/0 A		SSR (10)	Brunet et al. 2013	Introgresión hacia <i>U. pumila</i>
		<i>U. pumila</i> , <i>U. rubra</i>	2	6 S, 1/ 5 A		SSR (9)	Zalapa et al. 2009	Hibridación extensiva con introgresión sesgada hacia <i>U. pumila</i>

De acuerdo con del Toro *et al.* (2010) hasta la década de los 30's la morfología se centraba en comparar grupos o poblaciones mediante sus dimensiones lineales, pero a partir de entonces se desarrolló la morfometría geométrica, la cual, se basa en aplicar la estadística multivariada al estudio de la covariación de la forma, es decir: cuando la forma del objeto en estudio no se describe en términos de sus dimensiones, sino mediante la relación espacial entre sus partes buscando capturar la geometría de la estructura. Para Viscosi y Cardini (2011), el proceso de hibridación se puede detectar con ayuda de la morfometría geométrica, por ello, Viscosi *et al.* (2009) y Peñaloza-Ramírez *et al.* (2010) han aplicado la morfometría geométrica para complementar sus estudios de hibridación con marcadores moleculares, encontrando principalmente que se pueden diferenciar las especies de estudio y localizar a los híbridos con una morfología intermedia.

En ocasiones, la morfología no es suficiente ni confiable para identificar una especie de otra, como en el caso de *Senecio jacobaea* y *S. aquaticus* (Heather *et al.* 2004), o de *Ulmus pumila* de *U. minor* (Brunet *et al.* 2013); sin embargo, parece que siempre existe un carácter que permitirá diferenciar a las especies. Dicho carácter puede ir desde los tricomas estrellados, la diversidad de insectos minadores (Ishida *et al.* 2003), compuestos químicos como los alcaloides pirrolizados en el género *Senecio* (Heather *et al.* 2004), hasta llegar a casos donde la duración de la vida de las hojas de los híbridos resulta ser el carácter indicado para diferenciar a las especies y sus híbridos (Stecconi *et al.* 2004).

En el género *Fuchsia*, Talluri (2009), señala que la hibridación interespecífica en especies simpátricas ocurre comúnmente en la naturaleza, también enfatiza que los híbridos surgen ya sea entre especies de diferentes secciones o de la misma, con el mismo o distinto número de cromosomas. Agrega que la facilidad de hibridación en las especies de *Fuchsia* sugiere una

debilidad en las barreras genéticas, lo cual quedó demostrado con sus 125 cruzas realizadas entre 15 especies de *Fuchsia* y tres cultivares (Talluri, 2012).

Breedlove (1969), menciona que *F. microphylla* y *F. thymifolia*, tienen poblaciones simpátricas, aunque para *F. microphylla* registra como polinizadores a los himenópteros y para *F. thymifolia* a los dípteros. Breedlove reporta que ocasionalmente se forman híbridos y en estos individuos la fertilidad del polen decrece a solo el 20%. Además reporta una situación muy diferente en la Sierra de Juárez de Oaxaca, donde estos individuos morfológicamente intermedios son más comunes, siendo descritos como un enjambre híbrido. Posiblemente debido a que es la única área no volcánica donde coexisten ambas especies.

Álvarez (2009), evaluó el aislamiento reproductivo entre *F. microphylla* y *F. thymifolia*, en las poblaciones simpátricas del cerro de Garnica y San José, Michoacán, encontrando que existe un traslape en la floración y las dos especies comparten al menos un polinizador (*Bombus ephippiatus*). Estos resultados sugieren que es posible el flujo de polen interespecífico entre estas dos especies. Además, menciona la presencia de individuos que por su morfología podrían ser híbridos naturales putativos.

Por lo anterior, se considera que *F. microphylla* y *F. thymifolia*, son un buen modelo de estudio para evaluar si ocurre la hibridación entre estas dos especies utilizando la morfología de flores y hojas, así como microsatélites como los marcadores moleculares.

II. HIPÓTESIS

Debido a que las especies *F. microphylla* y *F. thymifolia* coexisten en simpatría, comparten al menos un polinizador y presentan un traslape en la temporada de floración, se espera confirmar mediante el uso de caracteres morfológicos y marcadores moleculares que los individuos encontrados en la población simpátrica de Garnica, cuya morfología es intermedia, son híbridos producto de la cruce interespecífica entre estas dos especies de *Fuchsia*.

III. OBJETIVOS

General:

- Detectar la hibridación en poblaciones simpátricas de *F. microphylla* y *F. thymifolia* utilizando caracteres morfológicos y microsatélites como marcadores moleculares.

Particulares:

- ✓ Identificar a los progenitores e híbridos putativos mediante morfometría geométrica.
- ✓ Reconocer los caracteres morfológicos diagnósticos de cada especie y de los posibles híbridos.
- ✓ Determinar el nivel de introgresión entre *F. microphylla* y *F. thymifolia* en sus poblaciones simpátricas.
- ✓ Describir la diversidad genética de las poblaciones estudiadas de cada especie.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Las poblaciones de estudio se localizan principalmente en la Faja Volcánica Transmexicana, específicamente, dentro de los estados de Michoacán, Distrito Federal, Estado de México, Sinaloa y Jalisco. En general el clima de estas montañas es templado con lluvias en verano con una temperatura media anual que oscila entre 10 y 20 °C y una precipitación media anual que oscila entre los 400 y 1000 mm de lluvia (Rodríguez 2009). La vegetación de las regiones más elevadas de casi todas los bosques de coníferas se conforma por los géneros *Abies*, *Pinus*, *Quercus*, *Arbutus*, *Cupressus*, entre otros (Breedlove, 1969).

4.2 Especies de estudio

El género *Fuchsia* pertenece a la familia Onagraceae (Orden Myrtales), comprende aproximadamente 110 especies, es el único género de la familia con frutos carnosos y polen en gran medida biporado, cuyas flores generalmente son polinizadas por colibríes. Dentro del género se han reconocido 12 secciones, de las cuales cerca de tres cuartas partes se concentran en los Andes tropicales, y el resto se encuentran en México, América Central, La Española, el sureste de Brasil y los Andes del sur, además existen tres especies nativas de Nueva Zelanda y una en la isla de Tahití (Berry, 2004).

Dentro del género, la sección *Encliandra* es común en bosques templados de América Central y México, en la Sierra Madre del Sur de Michoacán y en las montañas de la Faja Volcánica Transmexicana, a altitudes que van de los 2000 a los 3400 m. (Breedlove 1969; Arroyo y Raven 1975). Las seis especies que reconoce Breedlove (1969) en esta sección son: (*Fuchsia microphylla*, *F. thymifolia*, *F. raveni*, *F. encliandra*, *F. obconica*, y *F. parviflora*) son

especies dimórficas, ya sean subdioicas, como las tres primeras o dioicas como el resto de las especies.

Las dos especies de estudio pertenecen a la sección Encliandra, las cuales cuentan con poblaciones simpátricas y alopátricas a lo largo de sus distribuciones (Fig.1).

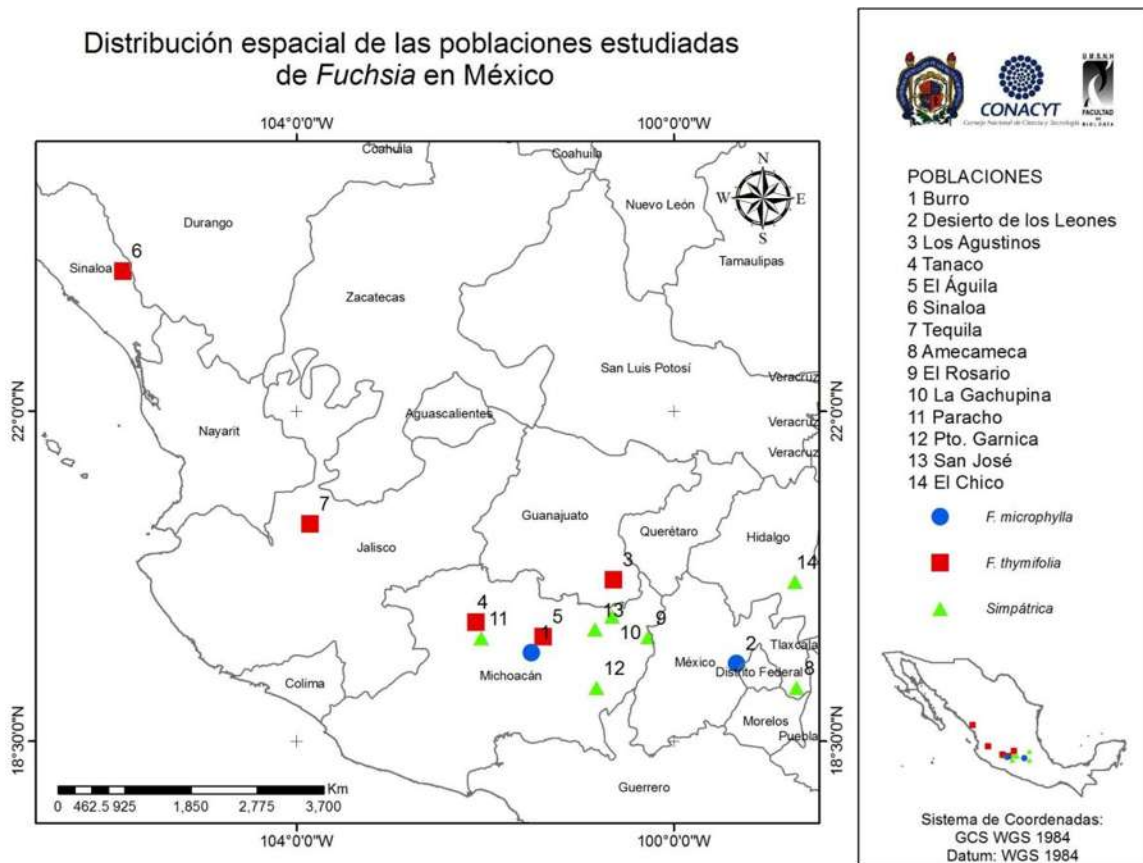


Figura 1. Poblaciones alopátricas y simpátricas conocidas de *F. microphylla* y *F. thymifolia*.

4.2.1 *Fuchsia microphylla* H.B.K.

Presenta hojas aserradas desde el ápice hasta la mitad del margen, con 4 a 5 dientes de cada lado; flores con el hipantio y los sépalos rojo-morados. Es un arbusto ginodioico-subdioico, con hojas opuestas o fasciculadas, elípticas a ovadas o lanceoladas, el envés más claro que el haz, coriáceas. Hipantio angostamente obcónico a cilíndrico. Estambres exsertos. Las flores femeninas similares a las hermafroditas pero en general más pequeñas, frutos con 12 a 36 semillas (Breedlove, 1969; Figura 2a).

4.2.2 *Fuchsia thymifolia* H.B.K.

Posee hojas subenteras, pubescentes, las flores jóvenes con el hipantio y los sépalos pálidos, volviéndose rojos o morados oscuros. Es un arbusto ginodioico-subdioico, hojas opuestas o fasciculadas, anchamente elípticas a ovadas, ápice obtuso a agudo, subenteras, base redondeada. Estambres exsertos, los episépalos exsertos fuera del hipantio; estigma exserto sobre el borde del hipantio, lóbulos lanceolados, extendidos. Las flores femeninas parecidas a las hermafroditas de menor tamaño, fruto con 12 a 18 semillas (Breedlove, 1969; Figura 2b).

F. microphylla tiene una distribución que va de Jalisco a Hidalgo y hasta Panamá. Desde el Valle de México, Texcoco, Amecameca y en el extremo norte del mismo entre los 2500 y 3500 m de altitud. *F. thymifolia* tiene una distribución desde la Sierra Madre Occidental de Sinaloa y Durango hasta el sur de Jalisco y a través de la Faja volcánica transmexicana hasta Veracruz, norte de la Sierra de Pachuca, Hidalgo y sur de la Sierra Juárez de Oaxaca, entre los 2000 y 3200 m de altitud. Ambas especies se localizan en laderas, cañadas, lugares húmedos y sombríos de bosques de *Pinus*, *Abies*, *Quercus* y mesófilo de montaña (Breedlove, 1969).

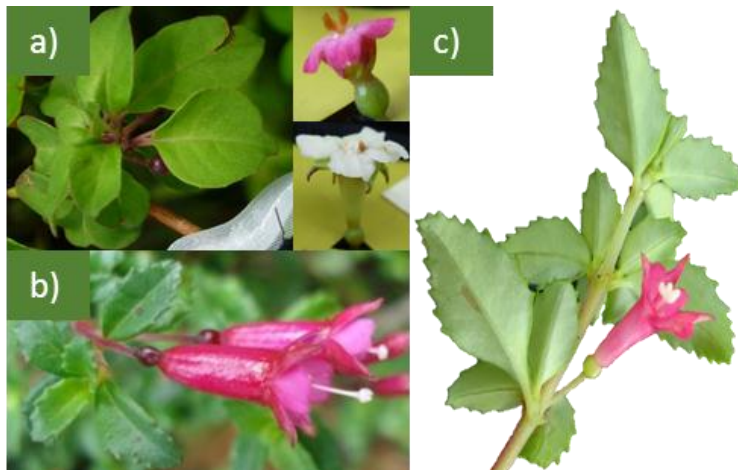


Figura 2. Se muestran las flores y hojas de a) *Fuchsia thymifolia*, b) *F. microphylla* y c) híbridos putativos de la población de Garnica.

4.3 TRABAJO DE CAMPO

De las poblaciones conocidas se seleccionaron dos poblaciones alopátricas para *F. thymifolia* (El Batel, Sinaloa y Cerro del Tequila, Jalisco) y otras dos para *F. microphylla* (El Desierto de los Leones, D.F., y el Cerro Burro, Pátzcuaro, Michoacán), así como dos poblaciones simpátricas (Cerro Garnica, Michoacán y Amecameca, Edo. de México), debido a que en la primera se tienen registrados alrededor de 20 híbridos putativos y la literatura registra híbridos en la segunda población simpátrica.

En las poblaciones mencionadas se recolectó una rama en cada una de 20 plantas elegidas (10 hembras y 10 hermafroditas) separadas al menos una de otra por 2.5 m de distancia y en estado de floración, dicha rama se etiquetó y transportó en hielo para su posterior congelación y extracción de ADN en el laboratorio, con excepción de Amecameca y el Desierto de los Leones porque ya se contaba con material previamente congelado en el laboratorio. Además para todas las poblaciones se obtuvieron 4 hojas/individuo/especie maduras, y al menos 2 flores/individuo/especie las cuales se fijaron en alcohol al 70% para tomarles sus respectivas fotografías, solamente en Sinaloa al momento de la colecta no había flores.

4.4 Análisis Morfométricos

4.4.1 Morfometría Geométrica Foliar

Se colectaron un total de 721 hojas (4 hojas/individuo/población) de seis poblaciones distintas (dos simpátricas, dos alopátricas para *F. thymifolia* y dos alopátricas para *F. microphylla*). Se fotografiaron por el haz con una regla de referencia (Fig. 2a). Posteriormente, se utilizaron una serie de programas obtenidos del “Integrated Morphometrics Package” IMP series (<http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>) para procesar las fotografías y digitalizar una configuración de 30 puntos (dos landmarks y 28 semilandmarks), aplicándose la Superposición de Procrustes para generar las coordenadas y finalmente se usó el método de Análisis de Variantes Canónicas para conocer cuántos ejes AVC son necesarios para formar dos o más grupos en la muestra (ver apéndice 2 y Figura 2).

4.4.2 Morfometría Geométrica Floral

Primeramente se tomaron fotografías de los 20 individuos muestreados por población (~3.5 flores por individuo). En total se obtuvieron 402, 409 y 422 fotografías de corolas, tubos florales y cálices, respectivamente (Tabla 2). En las fotografías de corolas y cálices solamente se utilizó un pétalo o un sépalo por cada flor. A cada juego de fotografías se le construyó una configuración de puntos distinta, buscando que esta representara adecuadamente cada parte de la flor. Al final se digitalizaron 12 puntos para los pétalos, 7 para los sépalos y 19 para los tubos florales, además se añadieron un par de puntos extras sobre la regla haciendo referencia a un cm de longitud (ver anexo 2 y Figura 3).

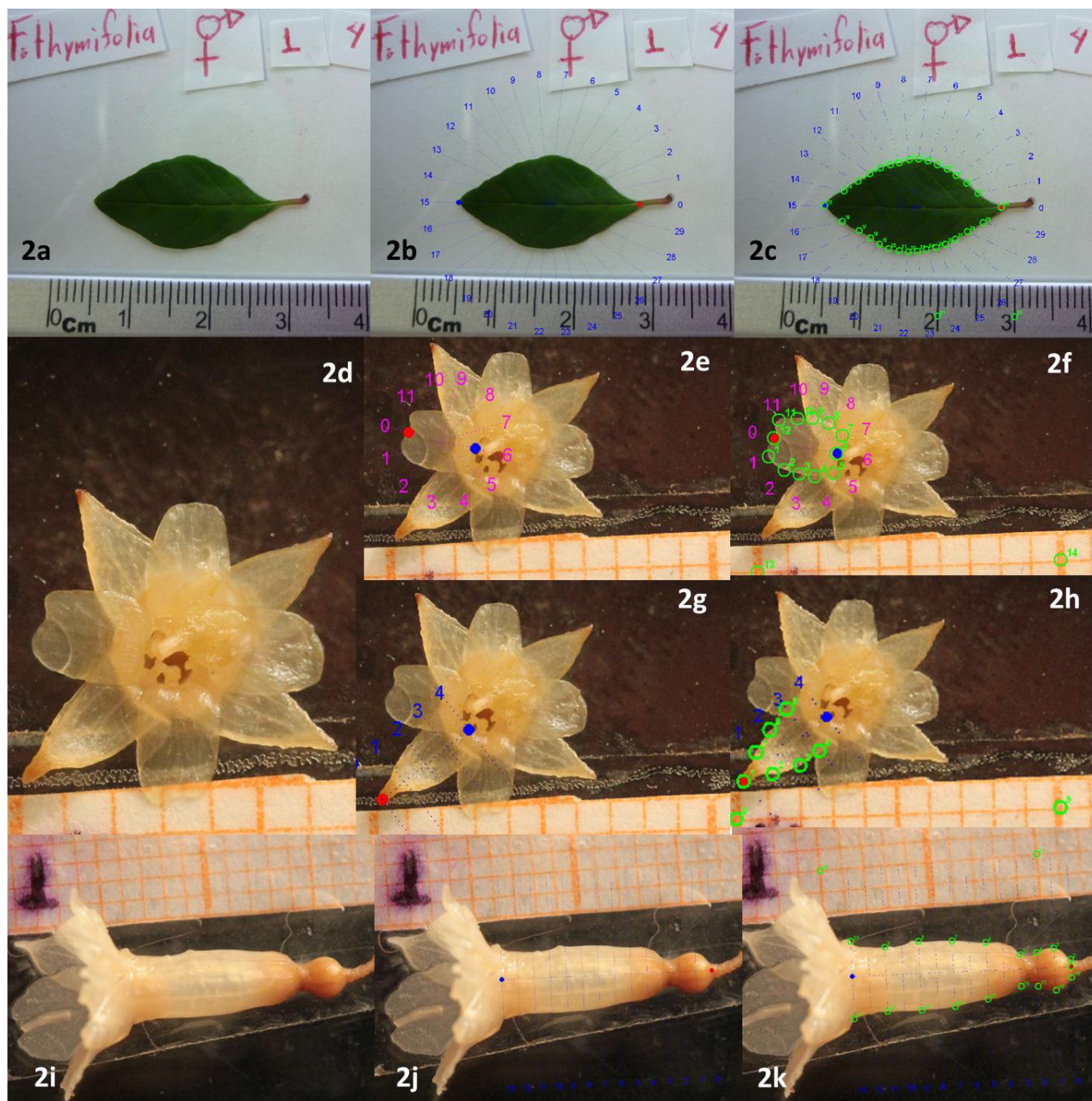


Figura 3. Ejemplos de hojas y flores analizadas con los programas de morfometría geométrica. a) hoja con regla de referencia; b) Fan (abanico) utilizado en las hojas; c) landmarks y semilandmarks de hojas; d) fotografía de pétalos y sépalos por flor; e) y g) Abanicos de pétalos y sépalos, respectivamente; f) y h) landmarks y semilandmarks en pétalos y sépalos, respectivamente; i) tubo floral con una tira de papel milimétrico como referencia de tamaño; j) Abanico del tubo floral; k) landmarks y semilandmarks utilizados en el tubo floral.

Tabla 2. Descripción del número final de fotografías obtenidas de cada uno de los órganos de los 20 individuos muestreados por población.

Población	Especie	Hojas h	Hojas H	Tubos h	Tubos H	Pétalo h	Pétalo H	Sépalo h	Sépalo H
Amecameca (A)	Fm	80*							
Amecameca (A)	Ft	79*							
Burro (B)	Fm	40	40	31	29	31	29	31	28
Desierto Leones (DL)	Fm	39	40	34	33	33	33	35	34
Garnica (G)	Ft	40	40	39	35	32	34	39	39
Garnica (G)	Fm	39	40	38	36	37	36	38	36
Garnica (G)	Híbridos	84		69		69		72	
Sinaloa (S)	Ft	80*							
Tequila (T)	Ft	40	40	38	27	37	31	38	32
Total		721		409		402		422	

* Se desconoce el morfo; H, hermafrodita; h, hembra; Fm, *F. microphylla*; Ft, *F. thymifolia*.

Para averiguar qué caracteres son más importantes para diferenciar a las especies de estudio de los híbridos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP, en el programa estadístico Past v.3.10, Hammer *et al.* 2001) utilizando las distancias al centroide (Distancia de Mahalanobis) por individuo, obtenidos de las coordenadas generadas mediante el método de superposición de Procrustes, para cada uno de los órganos evaluados (hojas, tubo floral, pétalos y sépalos) pero solamente en las poblaciones del Desierto de Leones, Cerro Burro, Garnica y Tequila, sitios para los cuales se poseen datos de todas las estructuras.

4.5 Análisis genéticos

4.5.1 Genotipificación usando microsatélites

La genotipificación se realizó en los 182 individuos provenientes de seis poblaciones (cuatro alopátricas y dos simpátricas) usando los siguientes 7 microsatélites: fus 27, fus 52, fus 35, fus 48, fus 31, fus 47 y fus 33. De estos pares de primers los siete amplificaron en la especie *F. microphylla*, para la cual fueron diseñados; en la especie *F. thymifolia* solamente amplificaron correctamente cuatro de ellos (fus 27, fus 52, fus 35, fus 48); y para los híbridos putativos amplificaron todos los primers; con excepción del fus 47, el cual, no funcionó bien en todos los individuos de *F. thymifolia* e híbridos (ver anexo 1).

4.5.2 Identificación de especies progenitoras e híbridos

El método aplicado para clasificar a los individuos en una categoría híbrida, o de alguno de los dos progenitores es el método Bayesiano disponible en el programa Structure (v. 2.3.4; Pritchard et al. 2000), primeramente se corrió un análisis entre la especie parental *F. microphylla* y los híbridos putativos debido a que para estos se cuenta con información de cinco microsatélites; después se hizo un segundo análisis que incluyó a los dos progenitores y los híbridos putativos pero basado en solo tres microsatélites. Para la primera prueba se usó un valor de $k=6$ y para la segunda $k=10$, se corrieron los análisis con 200000 MCMC (Markov chain Monte Carlo), con un burn-in de 20000 y 10 iteraciones; no se utilizó información a priori de las poblaciones, se aplicó el modelo de mezcla genética y el de frecuencias alélicas correlacionadas. El programa calculó un coeficiente de mezcla (q) para cada individuo, en el segundo análisis debido a que se esperaba un $K=2$, los valores de q cercanos a 1 pertenecerán a una de las dos especies progenitoras, valores cercanos al 0.5

significará individuos híbridos de la primera generación (F1), y finalmente individuos con valores de 0.75 de una especie y un 0.25 de la otra especie probablemente corresponderán a retrocruzas hacia alguna especie parental.

4.5.3 Diversidad genética de especies progenitoras e híbridos

Primeramente se estimó la presencia de alelos nulos para cada loci por población mediante el programa MICROCHECKER. Después con el programa iNest 2.0 se calculó el coeficiente de endogamia no sesgado mediante el modelo bayesiano IIM (Individual Inbreeding Model). A su vez con el valor de DIC generado por especie (Criterio de Desviación de la Información) se evaluó el efecto de los siguientes tres factores en el modelo como son: alelos nulos (n), endogamia (f) y los errores de genotipado (b).

Para describir la diversidad genética de las especies *F. microphylla*, *F. thymifolia* e híbridos, se utilizó el programa GeneAIEx 6.501 (Peakall and Smouse, 2012), esto se realizó para cada población muestreada por especie. De igual manera que en la sección de arriba, los datos genéticos de 7 microsatélites se usaron para estimar por población (para *F. microphylla* e híbridos): el número de alelos (N_a), alelos efectivos (N_e), índice de información (I, equivalente al índice de Shannon-Weaver), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad esperada no sesgada (uH_e). Además, se estimó el número de loci fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Después se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para estimar el grado de variación genética dentro y entre las poblaciones. Finalmente, se examinó el grado de diferenciación genética mediante los valores pareados de F_{ST} entre especies y entre poblaciones (a través del AMOVA en GeneAIEx con 999 bootstrap permutaciones). En seguida, se calcularon los mismos

parámetros de diversidad, se realizó el AMOVA (incluyendo 3 regiones que corresponden a ambas especies e híbridos) y se estimó el grado de diferenciación genética pero entre las dos especies y los híbridos putativos.

4.5.4 Análisis de Coordenadas Principales

Se realizó un ACoP con distancias genéticas calculadas a partir de los alelos, primeramente solo para las poblaciones de *F. microphylla* (5 microsatélites) y después para las especies *F. microphylla*, *F. thymifolia* y los híbridos (3 microsatélites).

4.5.5 Correlación entre distancias genéticas, morfológicas y geográficas

Para evaluar si existe una correlación entre las distintas matrices de distancias genéticas (F_{ST}), morfológica (distancia de Manhattan, calculada en el programa estadístico Past v.3.10, Hammer *et al.* 2001) y geográfica por especie, se llevó a cabo una prueba de Mantel parcial en el programa en línea Isolation by distance <http://ibdws.sdsu.edu/>, agregando siempre una tercera matriz como indicador. Cabe mencionar que solamente se realizaron las pruebas de correlación morfológica con las poblaciones para las cuales se colectaron tanto flores como hojas.

V. RESULTADOS

5.1 Morfometría Geométrica Foliar

Primeramente se realizaron dos análisis AVC con el objetivo de poder diferenciar a las especies *F. thymifolia* y *F. microphylla* así como a los híbridos putativos a partir de la forma de las hojas. El primer análisis de variantes canónicas incluyó solo poblaciones alopátricas de cada especie junto con los híbridos (AVC/MANOVA; AVC1, Wilks's lambda = 0.2133, $x^2=575.60$, d.f. = 112, $p<0.0001$; AVC2, Wilks's lambda = 0.6762, $x^2 = 145.72$, d.f. = 55, $p<0.0001$) mostrando que con el AVC1 ambas especies se diferencian, e incluso las hojas de los individuos considerados como híbridos forman un grupo aparte separados por el AVC2, aunque más cercano a la especie *F. thymifolia* como se aprecia en la Figura 4. En el segundo AVC (AVC1, Wilks's lambda = 0.3407, $x^2 = 743.48$, d.f. = 112, $p<0.0001$ y AVC2, Wilks's lambda = 0.8564, $x^2 = 107.01$, g.l.= 55, $p<0.0001$) se incluyeron tanto poblaciones simpátricas como alopátricas de cada especie y los híbridos, presentando el mismo patrón de diferenciación entre especies aunque con un mayor grado de variación morfológica foliar entre estas.

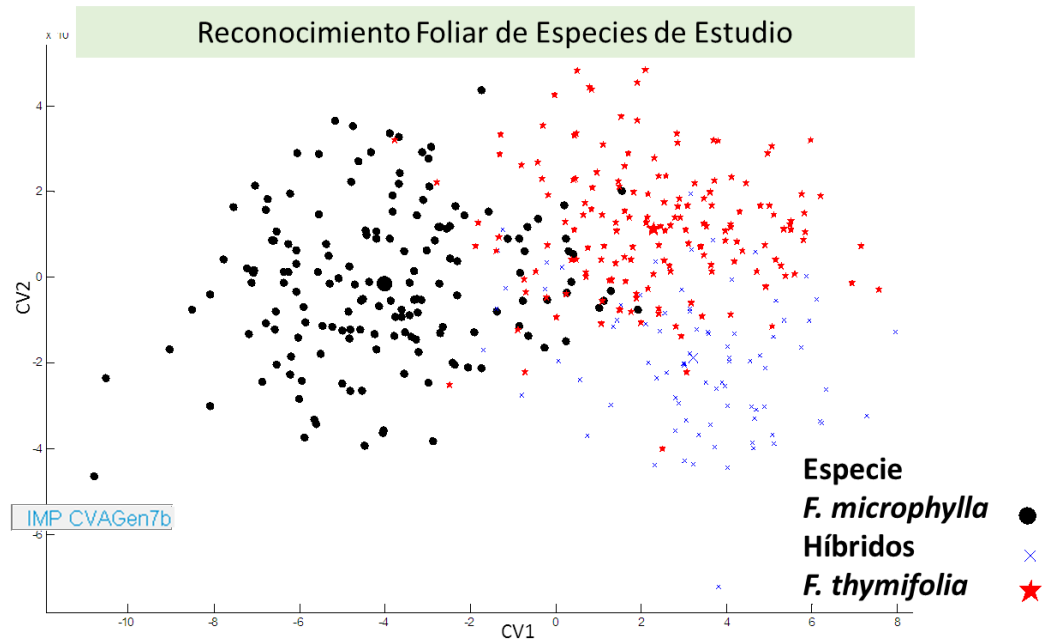


Figura 4. El AVC permite apreciar la separación en tres grupos de las hojas de estudio pertenecientes a las dos especies progenitoras de origen alopátrico y los híbridos putativos mediante dos ejes canónicos.

Además se compararon las poblaciones muestreadas y los morfos por población para cada especie, siempre incluyendo a los híbridos como una población adicional (Tabla 3). De acuerdo con los ejes canónicos dentro de cada especie fue posible distinguir cada una de las muestras incluidas, es decir, se distinguían las poblaciones o las muestras por morfo/población, con la excepción de dos casos, el primero cuando en las poblaciones de *F. microphylla* se compararon los morfos y los híbridos generándose cinco grupos: híbridos, hembras de Garnica, hermafroditas de Garnica, hembras-Hermafroditas del Burro y finalmente las hembras-Hermafroditas del Desierto de los Leones, indicando que en la poblaciones alopátricas de esta especie no se detecta un dimorfismo foliar tan marcado como en la población simpátrica de Garnica. El segundo caso donde los resultados del AVC/MANOVA (AVC1, Wilks's lambda = 0.1203, $x^2 = 450.09$, g.l. = 224, $p < 0.0001$ y

AVC2, Wilks's lambda = 0.2880, $x^2 = 264.51$, g.l.= 165, $p < 0.0001$) no lograron separar las cinco categorías fue al comparar las poblaciones de *F. thymifolia* utilizando las hojas por morfo/población y los híbridos formando apenas tres grupos: las hembras y hermafroditas de Garnica, las hembras y hermafroditas de Tequila, y las hojas de los híbridos como un grupo aparte, con estos resultados en *F. thymifolia* no parece existir un dimorfismo foliar tanto en condición simpátrica como alopátrica. Considerando todas las comparaciones anteriores se realizó un análisis foliar que incluía una población alopátrica de cada especie parental así como las muestras de los progenitores simpátricos de Garnica junto con los híbridos, en el cual, se logra visualizar que los híbridos forman un grupo aparte pero más cercano a las poblaciones de *F. thymifolia* y muy alejado de *F. microphylla* (Figura 5: AVC1, Wilks's lambda = 0.0861, $x^2 = 908.7515$, g.l.= 224, $p < 0.0001$; AVC2, Wilks's lambda = 0.3223, $x^2 = 419.55$, g.l.= 165, $p < 0.0001$; AVC3, Wilks's lambda = 0.5761, $x^2 = 204.30$, g.l.= 108, $p < 0.0001$ y AVC4, Wilks's lambda = 0.7935, $x^2 = 85.68$, g.l.= 53, $p < 0.002$).

Por último, se utilizó una pequeña muestra de híbridos sintéticos F1 de cruza entre progenitores de origen alopátrico (El Desierto de los Leones y cerro El Águila) e híbridos sintéticos F1 de cruza entre progenitores de origen simpátrico de Garnica y se comparó su morfología foliar con los híbridos adultos que se tienen registrados en Garnica. Se obtuvieron cuatro ejes canónicos (AVC1, Wilks's lambda = 0.0949, $x^2 = 780.58$, g.l.= 224, $p < 0.0001$; AVC2, Wilks's lambda = 0.3418, $x^2 = 355.83$, g.l.= 165, $p < 0.0001$; AVC3, Wilks's lambda = 0.6048, $x^2 = 166.67$, g.l.= 108, $p < 0.0001$ y AVC4, Wilks's lambda = 0.7882, $x^2 = 78.91$, g.l.= 53, $p < 0.012$) los que permiten distinguir a cada una de las muestras ya sea de híbridos o de progenitores como se aprecia en la Figura 6. Esta separación sugiere que los híbridos registrados en Garnica ya no son F1, sino probablemente de alguna otra filial o incluso

retrocruzas, debido a que se parecen más a *F. thymifolia*. Por el contrario, los híbridos F1 alopátricos se parecen más a su parental *F. microphylla* y los híbridos F1 de origen simpátrico se posicionan con una morfología intermedia entre las dos especies.

Tabla 3. Resumen de las comparaciones realizadas en las hojas entre poblaciones y entre los morfos de cada población incluyendo a los híbridos, basadas en AVC.

Comparaciones	Hojas			
	VC	Wilks's lambda	g.l.	P-valor
Entre especies alopátricos e híbridos	VC1	0.2133	112	0.0001
	VC2	0.6762	55	0.0001
Entre especies e híbridos	VC1	0.3247	112	0.0001
	VC2	0.8387	55	0.0001
Dentro Fm entre sitios e híbridos (A, B, DL, G, H)	VC1	0.1206	224	0.0001
	VC2	0.2869	165	0.0001
	VC3	0.5059	108	0.0001
	VC4	0.7483	53	0.0001
Dentro Fm entre morfos e híbridos (Bh,BH,DLh,DLH,Gh,GH,H)	VC1	0.046	336	0.0001
	VC2	0.1367	275	0.0001
	VC3	0.2642	216	0.0001
	VC4	0.4753	159	0.001
Dentro Ft entre sitios e híbridos (A, G, S, T, H)	VC1	0.1446	224	0.0001
	VC2	0.3586	165	0.0001
	VC3	0.5945	108	0.0001
	VC4	0.8248	53	0.045
Dentro Ft entre morfos e híbridos (Gh,GH,Th,TH,H)	VC1	0.1203	224	0.0001
	VC2	0.288	165	0.0001

DLh, Desierto Leones hembra; DLH, Desierto Leones Hermafrodita; A, Amecameca; B, Cerro Burro; G, Garnica; T, Tequila; S, Sinaloa; H, Híbridos.

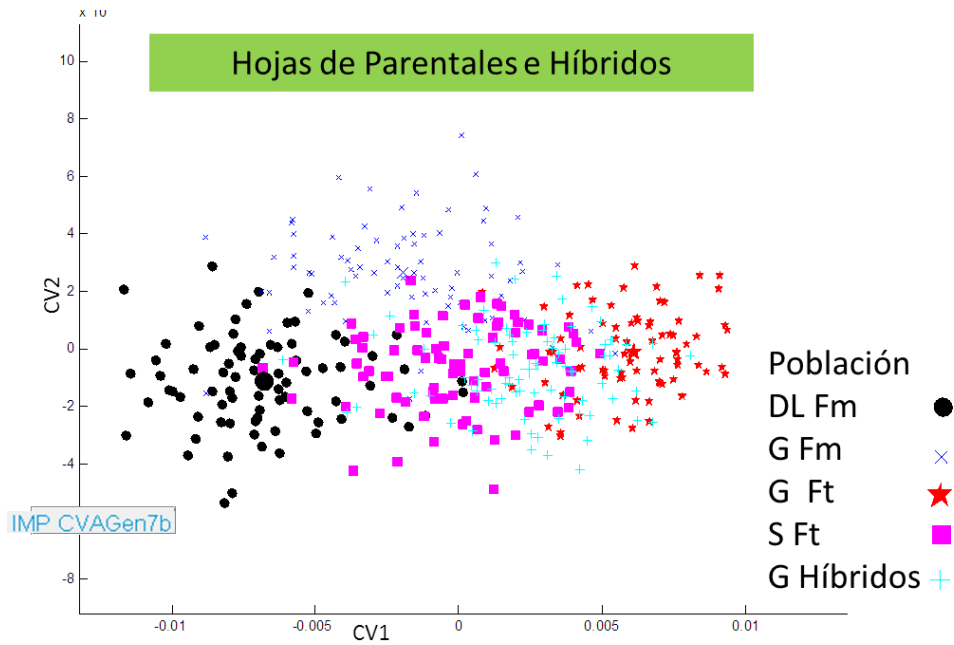


Figura 5. Los ejes del AVC/MANOVA comparando las hojas de *F. microphylla*, *F. thymifolia* e híbridos separando a estos últimos y colocándolos más cercanos a *F. thymifolia*.

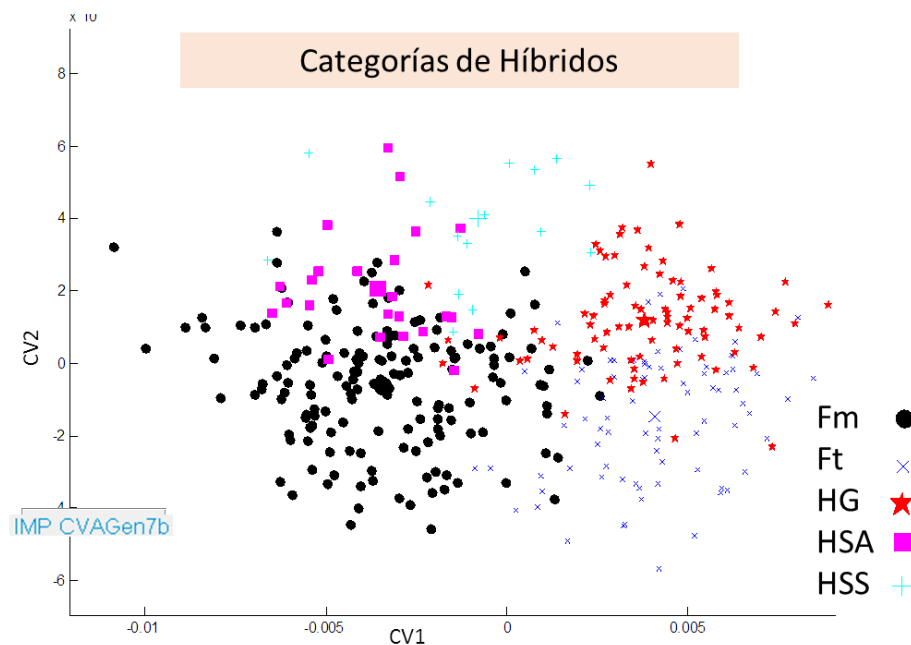


Figura 6. Separación mediante los ejes canónicos de las diferentes categorías de híbridos (HG=híbridos de Garnica, HSA= híbridos sintéticos F1 de progenitores alopatricos, HSS= híbridos sintéticos F1 de progenitores simpáticos) y sus probables progenitores.

En la Tabla 4, se muestra la asignación *a priori* y *posteriori* de los individuos, usados en el análisis, basado en la distancia de Mahalanobis en el espacio definido por los ejes VC significativos. El grupo original está en las filas y los reasignados en las columnas. Los resultados se presentan en porcentajes de la N total y muestran qué porcentaje de los individuos totales de cada grupo podrían pertenecer a otro grupo. En general todos presentan un elevado porcentaje de asignación promedio correcto (> 70%), con excepción de la asignación entre los morfos de *F. thymifolia* e híbridos debido a que las hojas de los híbridos se asemejan más a este parental.

Tabla 4. Clasificación del Análisis de Variantes Canónicas(AVC), la asignación a priori de las hojas se basa en la colecta y la asignación posteriori en la distancia de Mahalanobis

<i>Hojas</i>									
<i>Asignación a priori</i>		<i>Asignación posteriori</i>						Promedio asignación correcta	
Entre especies alopátricas	% Fm	% Ft	% H	Total (n)					
<i>F. microphylla</i> (Fm)	88.05	2.52	9.43	159					82.60
<i>F. thymifolia</i> (Ft)	5.95	79.76	14.29	84					
Híbridos (H)	6.25	13.75	80.00	160					
Entre especies	% Fm	% Ft	% H	Total (n)					
<i>F. microphylla</i> (Fm)	84.91	10.06	5.03	318					74.93
<i>F. thymifolia</i> (Ft)	9.09	71.79	19.12	319					
<i>Híbridos</i> (H)	8.33	22.62	69.05	84					
Dentro Fm entre sitios e H	% A	% B	% DL	% G	% H	Total (n)			
Amecameca (A)	65.00	7.50	13.75	11.25	2.50	80			72.96
Burro (B)	8.75	71.25	7.50	7.50	5.00	80			
Desierto Leones (DL)	13.92	13.92	67.09	2.53	2.53	79			
Garnica (G)	11.39	1.27	5.06	72.15	10.13	79			
Híbridos (H)	2.38	1.19	4.76	2.38	89.29	84			
Dentro Fm entre morfos e H	% Bh	% BH	% DLh	% DLH	% Gh	% GH	% H	Total (n)	
Bh	35.00	35.00	5.00	7.50	12.50	2.50	2.50	40	82.28
BH	32.50	42.50	5.00	10.00	2.50	2.50	5.00	40	
DLh	10.26	2.56	41.03	30.77	2.56	7.69	5.13	39	
DLH	2.50	10.00	27.50	52.50	0.00	2.50	5.00	40	
Gh	5.13	0.00	0.00	0.00	87.18	2.56	5.13	39	
GH	5.00	0.00	2.50	2.50	7.50	67.50	15.00	40	
Híbridos	3.57	0.00	3.57	1.19	1.19	4.76	85.71	84	
Dentro Ft entre sitios e H	% A	% G	%S	% T	%H	Total (n)			
Amecameca (A)	69.62	18.99	7.59	1.27	2.53	79			70.23
Garnica (G)	15.00	73.75	5.00	3.75	2.50	80			
Sinaloa (S)	5.95	9.52	69.05	13.10	2.38	84			
Tequila (T)	0.00	2.50	16.25	63.75	17.50	80			
H	2.50	6.25	7.50	8.75	75.00	80			
Dentro Ft entre morfos e H	% Gh	% GH	% H	% Th	% TH	Total (n)			
Gh	47.5	40	0	0	12.5	40			57.43
GH	42.5	37.5	10	0	10	40			
H	0	9.52	82.14	0.00	8.33	84			
Th	5	0	2.5	70	22.5	40			
TH	7.5	2.5	10	30	50	40			

Bh, hembras del Burro; BH, Hermafroditas del Burro; Gh, hembras de Garnica; GH, hermafroditas de Garnica, etc.

5.2 Morfometría Geométrica Floral

En esta sección se analizaron tres verticilos: tubo floral, corola y cáliz. La Tabla 5, muestra los resultados de las comparaciones analizadas de manera similar a las hojas. Primero se trató de identificar a cada especie y a los híbridos, para después dentro de cada especie realizar comparaciones entre poblaciones y morfos. De acuerdo a los ejes producidos por el AVC/MANOVA se obtuvo que el tubo floral y los sépalos son suficientes para distinguir a cada especie de los híbridos. Por el contrario, la corola solamente permite separar a *F. thymifolia* dejando como un solo grupo a los individuos de *F. microphylla* e híbridos.

Tabla 5. Resumen de los resultados de las comparaciones dentro de cada especie entre poblaciones y morfos.

Comparaciones	Tubos Florales				Pétalo				Sépalo			
	VC	Wilk's lambda	g.l.	P	VC	Wilk's lambda	g.l.	P	VC	Wilk's lambda	g.l.	P
Entre especies alopátricas e híbridos (3)	VC1	0.135	68	0.0001	VC1	0.398	40	0.000	VC1	0.717	20	0.0001
	VC2	0.554	33	0.0001					VC2	0.865	9	0.0001
Entre especies e híbridos (3)	VC1	0.179	68	0.0001	VC1	0.479	40	0.000	VC1	0.633	20	0.0001
	VC2	0.791	33	0.0001					VC2	0.933	9	0.0001
Dentro Fm entre sitios e híbridos (4)	VC1	0.145	102	0.0001	VC1	0.542	60	0.000	VC1	0.752	30	0.0001
	VC2	0.437	66	0.0001	VC2	0.753	38	0.000				
	VC3	0.694	32	0.0001								
Dentro Fm entre morfos e híbridos (7)	VC1	0.021	204	0.0001	VC1	0.263	120	0.000	VC1	0.456	60	0.0001
	VC2	0.114	165	0.0001	VC2	0.493	95	0.000				
	VC3	0.279	128	0.0001	VC3	0.668	72	0.010				
	VC4	0.488	93	0.0001								
	VC5	0.666	60	0.0001								
	VC6	0.829	29	0.020								
Dentro Ft entre sitios e híbridos (3)	VC1	0.157	68	0.0001	VC1	0.498	40	0.000	VC1	0.425	20	0.0001
	VC2	0.506	33	0.0001	VC2	0.813	19	0.003	VC2	0.775	9	0.0001
Dentro Ft entre morfos e híbridos (5)	VC1	0.010	136	0.0001	VC1	0.264	80	0.000	VC1	0.215	40	0.0001
	VC2	0.107	99	0.0001	VC2	0.465	57	0.000	VC2	0.429	27	0.0001
	VC3	0.401	64	0.0001	VC3	0.748	36	0.022	VC3	0.777	16	0.0001
	VC4	0.676	31	0.0001								

VC, ejes canónicos; g.l., grados de libertad; * número de muestras incluidas en el análisis; P, probabilidad.

5.2.1 Tubo floral

Es relevante señalar que la forma del tubo floral de los híbridos es intermedia a la de sus progenitores solamente de origen alopatrico (Figura 7, AVC1, Wilks's lambda = 0.1819, $x^2 = 561.48$, g.l.= 68, $p < 0.0001$ y AVC2 Wilks's lambda = 0.7749, $x^2 = 84.04$, g.l.= 33, $p < 0.000$). Al comparar los morfos entre poblaciones de *F. thymifolia* tanto simpátricas como alopatricas (Figura 8, AVC1, Wilks's Lambda = 0.0103, $x^2 = 858.10$, g.l. = 136 $p < 0.0001$; AVC2 Wilks's Lambda = 0.1069, $x^2 = 419.16$, g.l. = 99, $p < 0.0001$; AVC3, Wilks's Lambda = 0.4007, $x^2 = 171.46$, g.l. = 64, $p < 0.0001$ y AVC4, Wilks's Lambda = 0.6763, $x^2 = 73.32$, g.l. = 31, $p < 0.0001$) cuatro ejes canónicos separan muy bien los tubos de las hembras de los hermafroditas, y los tubos de los híbridos se colocan cerca de los hermafroditas pero más cercanos a los individuos de Tequila.

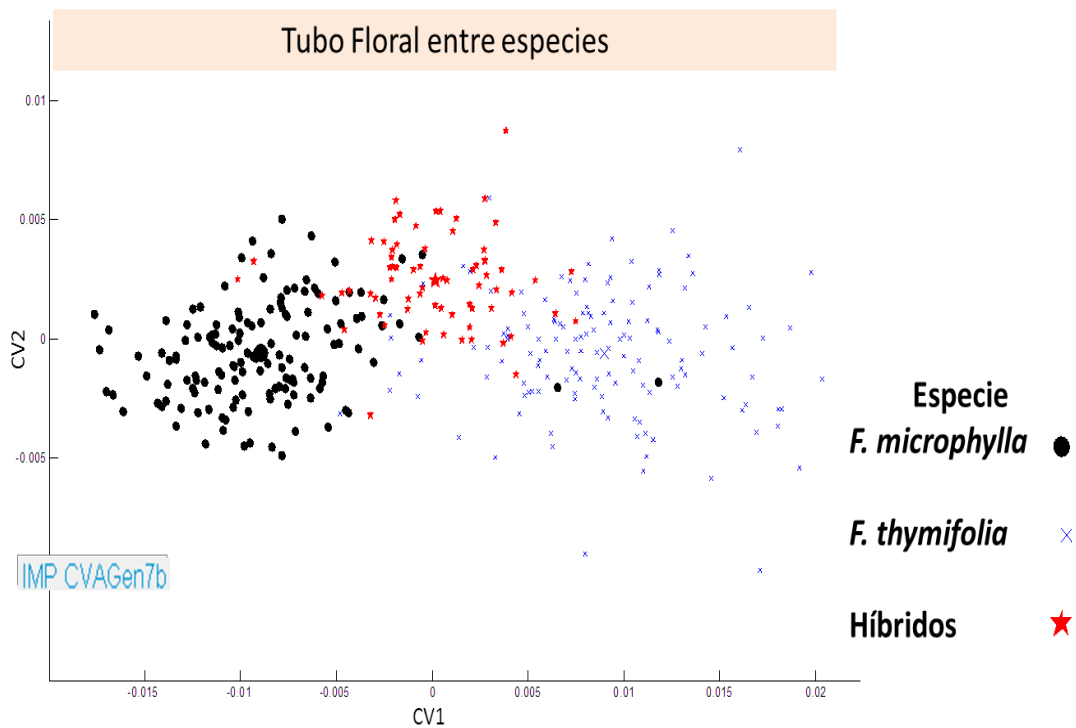


Figura 7. Los ejes AVC/MANOVA de la comparación del tubo floral separan a las especies progenitoras y los híbridos, mostrando estos una morfología intermedia.

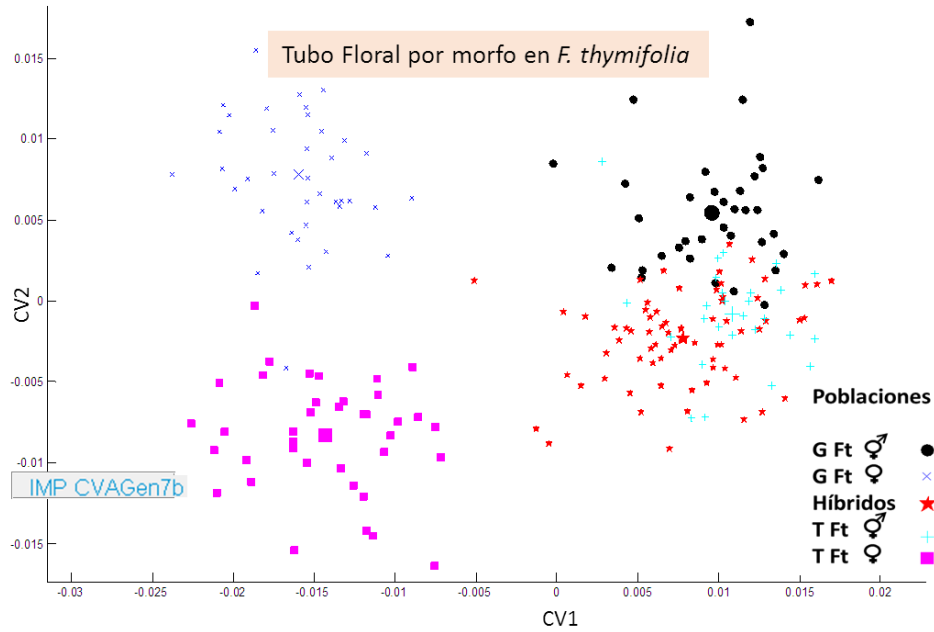


Figura 8. Los resultados del análisis de variantes canónicas muestran que los tubos florales de los híbridos están muy cercanos a los tubos de hermafroditas sobre todo de la población de alopátrica de Tequila.

Los promedios de asignación correcta mostrados en la Tabla 6, son los mayores obtenidos de todos los Análisis de Variantes Canónicas realizados con más del 77% en todas las categorías. Además se observa una tendencia a que algunos individuos híbridos puedan ser incluidos con su parental de origen alopátrico sobre el parental simpátrico, es decir, su lugar de origen y probablemente progenitor directo.

Tabla 6. Resultados de la asignación a priori y posteriori de los tubos florales de cada individuo de acuerdo a la distancia de Mahalanobis

Tubos Florales									
Asignación <i>a priori</i>		Asignación <i>posteriori</i>						Promedio asignación correcta	
Entre especies alopátricas e H		% Fm	% Ft	% H	Total (n)				
<i>F. microphylla (Fm)</i>		93.70	1.57	4.72	127				
<i>F. thymifolia (Ft)</i>		0.00	92.31	1.57	65		91.95		
Híbridos (H)		4.35	5.80	89.86	69				
Entre especies		% Fm	% Ft	% H	Total (n)				
<i>F. microphylla (Fm)</i>		89.55	1.00	9.45	201				
<i>F. thymifolia (Ft)</i>		2.88	87.05	10.07	139		87.85		
Híbridos (H)		7.25	5.80	86.96	69				
Dentro Fm entre sitios e H		% B	% DL	% G	% H	Total (n)			
B		71.67	18.33	8.33	1.67	60			
DL		14.93	68.66	11.94	4.48	67		77.19	
G		9.46	9.46	75.68	5.41	74			
H		0.00	2.90	4.35	92.75	69			
Dentro Fm entre morfos e H		% Bh	% BH	% DLH	% DLh	% GH	% Gh	% H	Total (n)
Bh		90.32	3.23	3.23	3.23	0.00	0.00	0.00	31
BH		0.00	82.76	13.79	0.00	3.45	0.00	0.00	29
DLH		6.06	9.09	60.61	9.09	9.09	3.03	3.03	33
DLh		5.88	0.00	0.00	88.24	0.00	0.00	5.88	34
GH		0.00	8.33	5.56	0.00	83.33	2.78	0.00	36
Gh		15.79	2.63	7.89	2.63	2.63	63.16	5.26	38
H		1.45	0.00	0.00	2.90	0.00	4.35	91.30	69
Dentro Ft entre sitios e H		% G	% H	% T	Total (n)				
G		90.54	5.41	4.05	74				
H		1.45	91.30	7.25	69		88.82		
T		4.62	10.77	84.62	65				
Dentro Ft entre morfos e H		% GH	% Gh	% H	% Th	% TH	Total (n)		
GH		91.43	0.00	5.71	0.00	2.86	35		
Gh		0.00	97.44	0.00	2.56	0.00	39		
H		4.35	1.45	89.86	0.00	4.35	69		
Th		0.00	2.63	0.00	97.37	0.00	38		
TH		3.70	0.00	3.70	0.00	92.59	27		

H, Híbridos; GH, Hermafroditas de Garnica; Gh, hembras de Garnica, etc.

5.2.2 Pétalos

La forma de los pétalos solo permite diferenciar dos grupos uno constituido por las pétalos de *F. thymifolia* y otro por *F. microphylla* e híbridos (Figura 9, AVC1 Wilks's lambda = 0.3977, $x^2 = 230.97$, g.l.= 40 $p < 0.0001$). La mejor separación de pétalos entre especies se logró al incluir solamente los pétalos de poblaciones alopátricas para ambas especies, de lo contrario al analizar todas las poblaciones tanto simpátricas como alopátricas el traslape era mucho mayor.

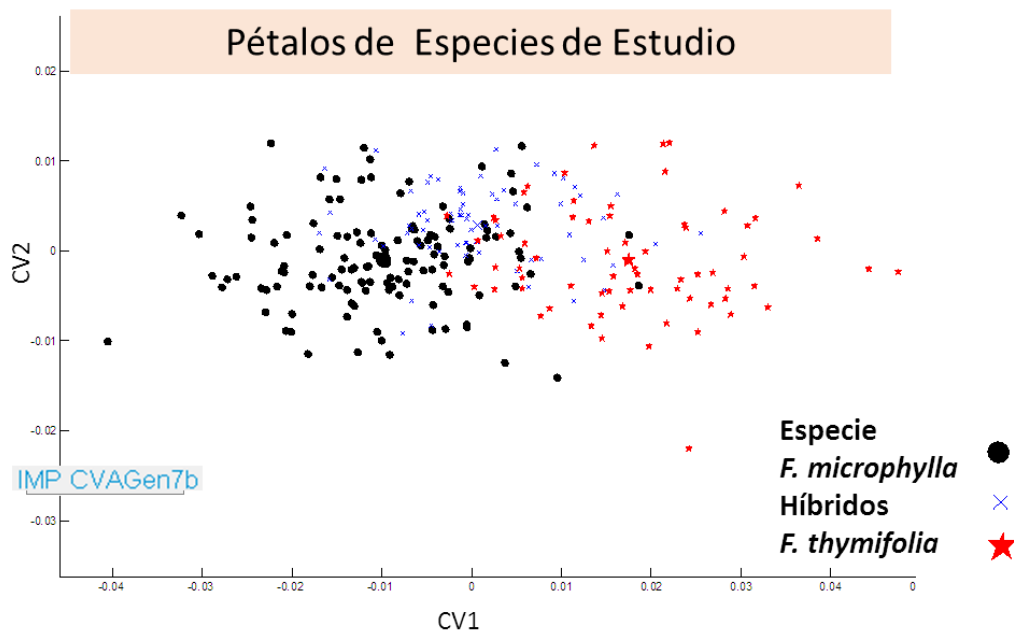


Figura 9. Los resultados de los ejes de Variantes Canónicas al utilizar los valores de los pétalos, muestran que existe poca diferenciación entre las especies progenitoras y los híbridos.

Dentro de las comparaciones realizadas con los pétalos se obtuvo en todos los casos con excepción de uno, que el número de ejes canónicos no fue suficiente para diferenciar a todas las muestras incluidas en el análisis (Tabla 4). Al comparar las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos los pétalos de los individuos de Garnica no logran diferenciarse de los pétalos

de los híbridos, dejando ligeramente a parte a los individuos del Cerro Burro y el Desierto de los Leones (Figura no incluida, AVC1, Wilks's lambda = 0.5417, $x^2 = 156.32$, g.l.= 60, $p < 0.0001$ y AVC2, Wilks's lambda = 0.7529, $x^2 = 72.36$, g.l.= 38, $p < 0.0001$); sin embargo, cuando se incluyen los morfos en las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos se generan cuatro grupos a partir de tres ejes canónicos formados por: los pétalos de los híbridos-hembras de Garnica, las hermafroditas del Cerro Burro-Garnica, las hembras del Cerro Burro-Desierto de los Leones y finalmente muy aparte los pétalos de las hermafroditas del Desierto de los Leones (Figura 10, AVC1, Wilks's lambda = 0.2632, $x^2 = 338.38$, g.l.= 120, $p < 0.0001$; AVC2, Wilks's lambda = 0.4927, $x^2 = 179.45$, g.l.= 95, $p < 0.0001$ y AVC3, Wilks's lambda = 0.6680, $x^2 = 102.27$, g.l.= 72, $p < 0.010$). Esto puede deberse a que en el análisis no se incluyó el morfo de los híbridos ya que en su mayoría son hembras.

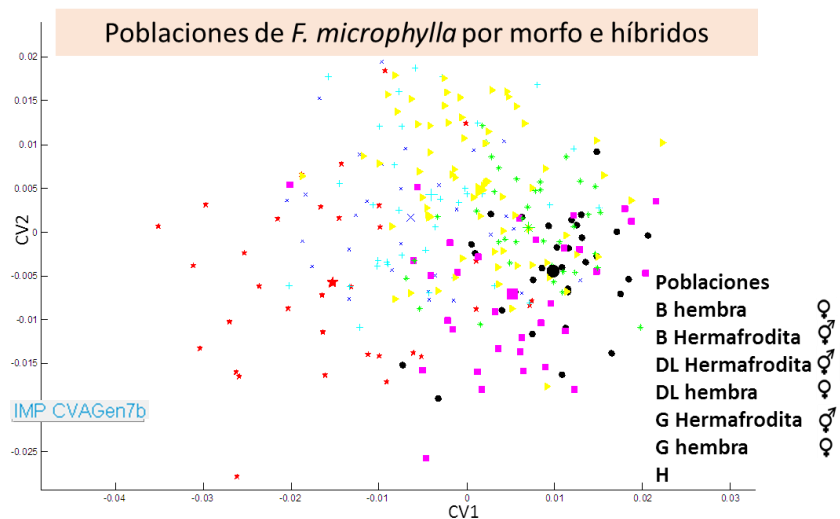


Figura 10. Los tres ejes de las Variantes Canónicas separan los pétalos en cuatro grupos, los cuales no son tan claramente diferenciados.

Para la forma de los pétalos los promedios de los porcentajes de asignación correcta están alrededor del ~63%, en este caso los híbridos al ser comparados con las especies progenitoras putativas poseen un alto porcentaje (20 y 30%) de pétalos que podrían ser categorizados como pertenecientes a *F. thymifolia* y *F. microphylla* respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la asignación a priori y posteriori de las corolas de cada individuo de acuerdo a la distancia de Mahalanobis.

Pétalos									
<i>Asignación a priori</i>		<i>Asignación posteriori</i>							Promedio asignación correcta
Entre especies alopátricas		% Fm	% Ft	% H	Total (n)				
<i>F. microphylla</i> (Fm)		68.25	29.37	2.38	126				
<i>F. thymifolia</i> (Ft)		0.00	26.47	73.53	68		63.69		
Híbridos (H)		30.43	49.28	20.29	69				
Entre especies		% Fm	% Ft	% H	Total (n)				
<i>F. microphylla</i> (Fm)		65.83	6.03	28.14	199		62.75		
<i>F. thymifolia</i> (Ft)		2.99	73.13	23.88	134				
Híbridos (H)		30.43	20.29	49.28	69				
Dentro Fm entre sitios e H		% B	% DL	% G	% H	Total (n)			
B		48.33	21.67	20.00	10.00	60		63.08	
DL		10.61	68.18	10.61	10.61	66			
G		26.03	15.07	20.55	38.36	73			
H		13.04	15.94	18.84	52.17	69			
Dentro Fm entre morfos e H		% Bh	% BH	% DLH	% DLh	% GH	% Gh	% H	Total (n)
Bh		64.52	3.23	3.23	12.90	0.00	9.68	6.45	31
BH		6.90	34.48	20.69	3.45	17.24	10.34	6.90	29
DLH		6.06	3.03	69.70	3.03	12.12	3.03	3.03	33
DLh		9.09	6.06	3.03	60.61	3.03	15.15	3.03	33
GH		5.56	16.67	16.67	0.00	36.11	8.33	16.67	36
Gh		16.22	13.51	0.00	16.22	2.70	37.84	13.51	37
H		8.70	7.25	2.90	15.94	23.19	10.14	31.88	69
Dentro Ft entre sitios e H		% G	% H	% T	Total (n)				
G		56.06	22.73	21.21	66		64.88		
H		11.59	76.81	11.59	69				
T		20.59	17.65	61.76	68				
Dentro Ft entre morfos e H		% GH	% Gh	% H	% TH	% Th	Total (n)		
GH		41.18	11.76	17.65	8.82	20.59	34		57.59
Gh		12.50	59.38	15.63	12.50	0.00	32		
H		14.49	8.70	66.67	7.25	2.90	69		
Th		5.41	16.22	10.81	59.46	8.11	37		
TH		22.58	0.00	9.68	6.45	61.29	31		

H, Híbridos; GH, Hermafroditas de Garnica; Gh, hembras de Garnica, etc.

5.2.3 Sépalos

La forma de los sépalos permite diferenciar a las especies progenitoras y a los híbridos, los cuales están más cercanos a *F. microphylla* (Figura 11, AVC1, Wilks's lambda = 0.7169, $x^2 = 87.37$, g.l.= 20, $p < 0.0001$ y AVC2, Wilks's lambda = 0.8647, $x^2 = 38.15$, g.l.=9, $p < 0.0001$). Por lo tanto, al analizar las poblaciones de sépalos solamente para *F. microphylla* el AVC/MANOVA (AVC1, Wilks's lambda = 0.7516, $x^2 = 75.94$, g.l.= 30, $p < 0.0001$, gráfico no mostrado) separa dos grupos uno formado por las poblaciones alopátricas (Desierto de los Leones y el Cerro Burro) y otro por sépalos de híbridos y de individuos de Garnica. Con un solo eje canónico los morfos de las poblaciones de *F. microphylla* se dividen en dos grupos: los sépalos de individuos hermafroditas de todas las poblaciones por un lado y por el otro las hembras y los híbridos (Figura 12, AVC1, Wilks's lambda = 0.4559, $x^2 = 207.78$, g.l.=60, $p < 0.0001$).

La Tabla 8 muestra un bajo porcentaje de asignación correcto para los sépalos (~50%) de acuerdo con las distancias de Mahalanobis y resalta que la asignación posteriori de los híbridos comparados con los morfos de poblaciones de *F. microphylla*, solo poseen un 11.11% de asignación correcta y que el 40.28% de los sépalos de los híbridos de Garnica pueden ser categorizados como sépalos de individuos hembra de la misma población de Garnica.

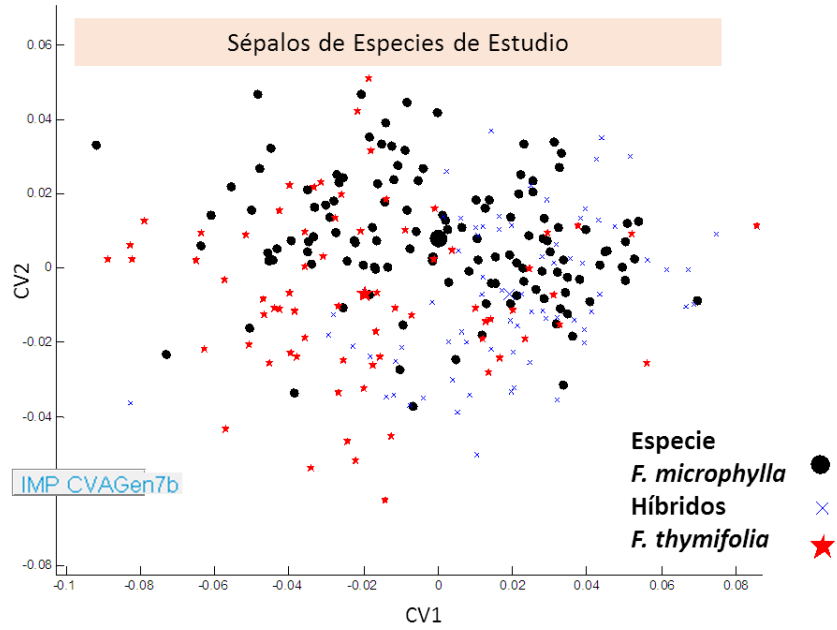


Figura 11. Con los ejes del AVC/MANOVA las comparaciones de los sépalos separan a las dos especies y coloca a los híbridos más cercanos a *F. microphylla*.

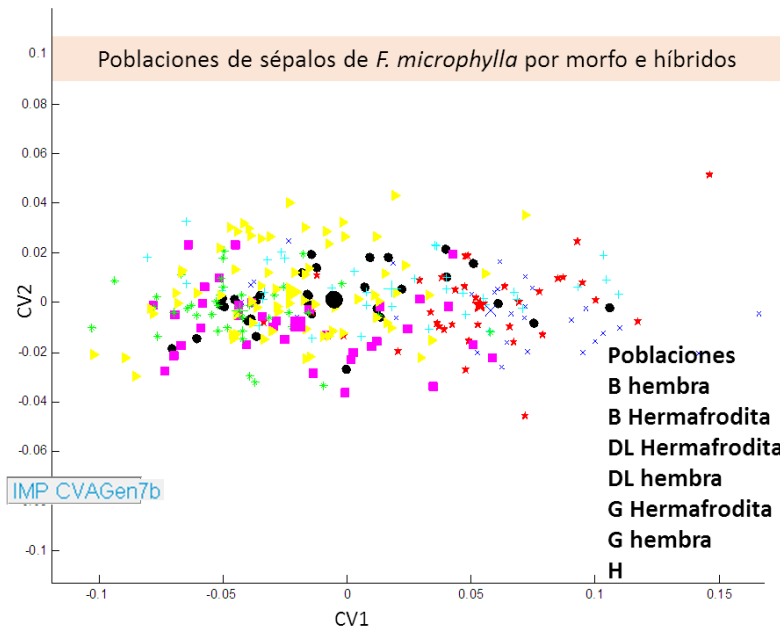


Figura 12. Los resultados de las Variantes Canónicas solamente generan un eje canónico para la forma de los sépalos, incluyendo a los híbridos en el grupo de las hembras de *F. microphylla*.

Tabla 8. Resultados de la asignación a priori y posteriori de los sépalos de cada individuo de acuerdo a la distancia de Mahalanobis.

Sépalo										
Asignación a priori		Asignación posteriori								
Entre especies alopátricas	% Fm	% Ft	% H	Total (n)			Promedio asignación correcta			
<i>F. microphylla</i> (Fm)	44.53	33.59	21.88	128			53.34			
<i>F. thymifolia</i> (Ft)	20.00	22.86	57.14	70						
Híbridos (H)	23.61	58.33	18.06	72						
Entre especies	% Fm	% Ft	% H	Total (n)			Promedio asignación correcta			
<i>F. microphylla</i> (Fm)	51.49	12.87	35.64	202			59.12			
<i>F. thymifolia</i> (Ft)	15.54	68.92	15.54	148						
Híbridos (H)	22.22	20.83	56.94	72						
Dentro Fm entre sitios e H	% B	% DL	% G	% H	Total (n)		Promedio asignación correcta			
B	45.76	8.47	18.64	27.12	59		32.95			
DL	56.52	10.14	13.04	20.29	69					
G	25.68	9.46	17.57	47.30	74					
H	11.11	12.50	18.06	58.33	72					
Dentro Fm entre morfos e H	% Bh	% BH	% DLH	% DLh	% GH	% Gh	% H	Total (n)		Promedio asignación correcta
Bh	6.45	9.68	9.68	19.35	19.35	35.48	0.00	31		31.41
BH	0.00	67.86	7.14	3.57	7.14	10.71	3.57	28		
DLH	5.88	41.18	38.24	2.94	8.82	2.94	0.00	34		
DLh	11.43	2.86	8.57	5.71	17.14	45.71	8.57	35		
GH	11.11	22.22	16.67	2.78	19.44	19.44	8.33	36		
Gh	5.26	2.63	0.00	5.26	2.63	71.05	13.16	38		
H	15.28	2.78	0.00	12.50	18.06	40.28	11.11	72		
Dentro Ft entre sitios e H	% G	% H	% T	Total (n)			Promedio asignación correcta			
G	82.05	6.41	11.54	78			69.98			
H	16.67	73.61	9.72	72						
T	17.14	28.57	54.29	70						
Dentro Ft entre morfos e H	% GH	% Gh	% H	% Th	% TH	Total (n)		Promedio asignación correcta		
GH	82.05	5.13	5.13	2.56	5.13	39		57.81		
Gh	15.38	74.36	7.69	2.56	0.00	39				
H	12.50	1.39	61.11	23.61	1.39	72				
Th	7.89	7.89	42.11	18.42	23.68	38				
TH	31.25	0.00	0.00	15.63	53.13	32				

H, Híbridos; GH, Hermafroditas de Garnica; Gh, hembras de Garnica, etc.

5.3 Análisis de Componentes Principales

Con el ACP de las cuatro estructuras evaluadas mediante morfometría geométrica se determinó que entre el primer y segundo componente se explica un 87.72 y 10.65% de la variación (eigenvalue1= 713.88 y eigenvalue2= 866.63, Figura 13), valores que corresponden a las variables hojas y tubos florales respectivamente. Además se aprecia que los híbridos de Garnica son generalmente más parecidos a la especie *F. thymifolia* que a *F. microphylla*.

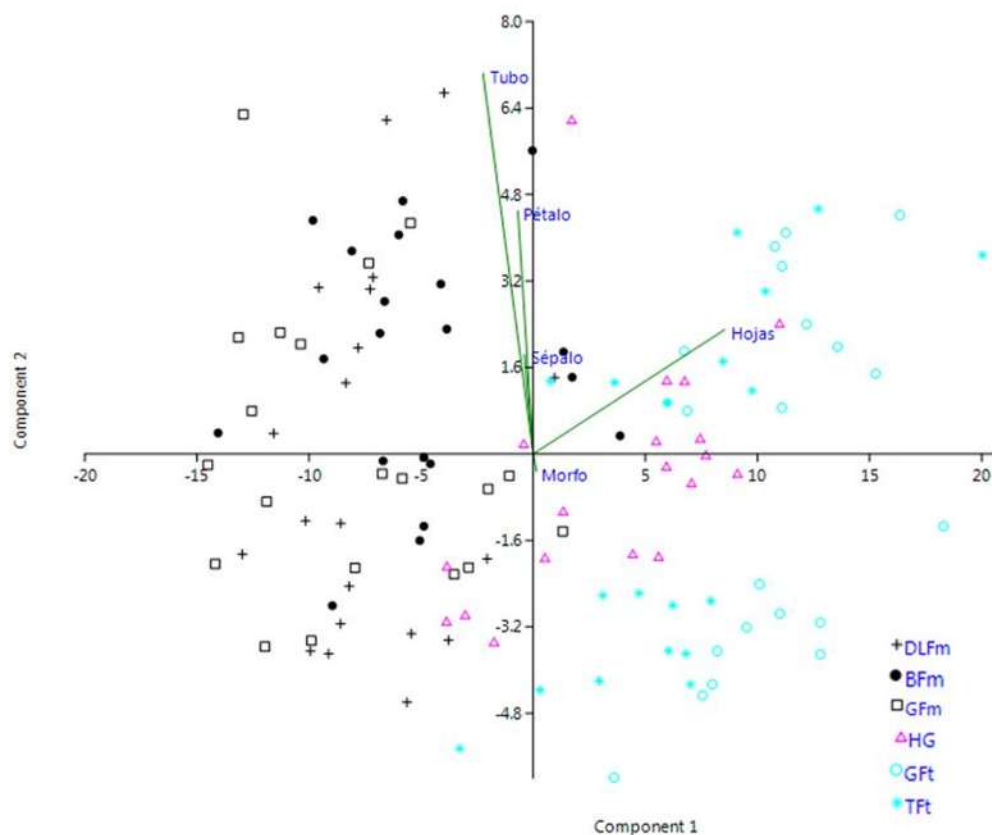


Figura 13. ACP incluyendo las cuatro estructuras morfológicas evaluadas en cuatro sitios. (DLFm, Desierto de los Leones *F. microphylla*; BFm, Cerro Burro *F. microphylla*; GFm, Garnica *F. microphylla*; HG, Híbridos de Garnica; GFt, Garnica *F. thymifolia*; TFt, Tequila *F. thymifolia*).

5.4 Análisis genéticos

5.4.1 Identificación de especies progenitoras e híbridos

Primeramente se realizó un análisis en el programa STRUCTURE, entre el parental *F. microphylla* y los híbridos putativos basándose en los cinco microsatélites que amplificaron para los dos grupos. El valor de Delta K (Figura 14 a y b) indica que existen tres grupos genéticos dentro de esta especie, los cuales corresponden a: el Desierto de los Leones, el Cerro Burro, y el último grupo lo forman entre las poblaciones simpátricas de Amecameca y Garnica. De acuerdo a los valores del coeficiente de mezcla “ q ” (coeficiente < 0.8) nueve híbridos putativos se asignan al grupo genético del Desierto de los Leones, ocho al grupo de poblaciones simpátricas (Amecameca-Garnica), dos al grupo del cerro Burro y finalmente dos híbridos putativos poseen menos del 0.8 del coeficiente de mezcla como para asignarse totalmente a un solo grupo. Es posible que las poblaciones simpátricas formen un solo grupo genético si en ambos sitios está ocurriendo la hibridación y por lo tanto modificándose de manera similar sus genomas.

En segundo lugar, se llevó a cabo una búsqueda de los grupos genéticos en el programa STRUCTURE para las poblaciones de ambas especies y los híbridos putativos a través de tres microsatélites, en este caso el valor de Delta K identifica dos grupos, los cuales se esperaba que correspondieran a las dos especies *F. microphylla* y *F. thymifolia*. Sin embargo, esto no ocurre y no se puede determinar a qué especie parental pertenece el grupo genético al que se asignan la mayoría de los híbridos putativos; no obstante, al menos cinco híbridos putativos son una mezcla genética entre estos dos grupos genéticos identificados.

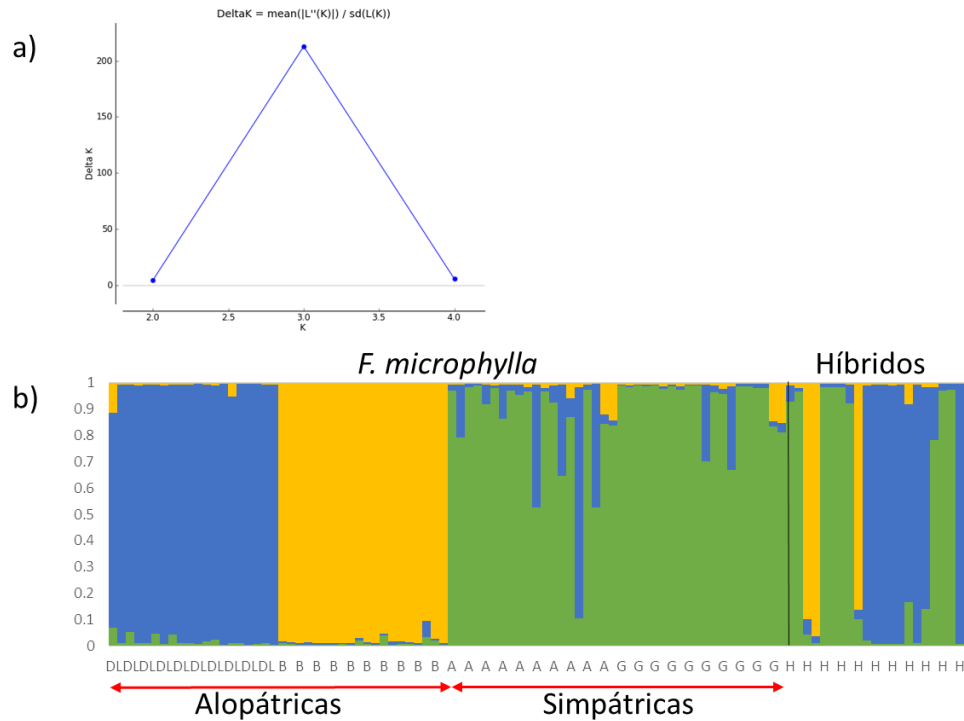


Figura 14. a) Tres grupos genéticos indicados por el valor de Delta K al comparar las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos; b) Estructura genética de las poblaciones de *F. microphylla* y asignación de los híbridos putativos a algún grupo. Cada barra vertical corresponde a un individuo y su proporción de cada grupo genético.

Por otro lado, el gráfico de Delta K (no mostrado) señala que aunque el valor más probable es $K=2$, podrían considerarse $K=4$ (Figura 15 a y b) porque se detecta un pequeño pico en este valor. Con este nuevo número de grupos genéticos se logra separar mejor a las especies incluso aparece un grupo que solamente predomina en *F. thymifolia*, permitiendo ver que los híbridos putativos se distribuyen de acuerdo a los coeficientes de mezcla de la siguiente manera: 13 individuos se agregan a *F. microphylla* (11 a la población del Desierto de los Leones y dos al grupo entre Garnica y el Cerro Burro), solamente un individuo híbrido se une a *F. thymifolia* (híbrido J con $q > 0.8$); los híbridos restantes se clasificaron como mezcla (poseen valores de q repartidos entre tres o cuatro grupos genéticos) pero cargados hacia algún parental: tres hacia *F. microphylla*, dos como *F. thymifolia* y tres intermedios entre las

dos especies. En resumen el 72.72% de los híbridos putativos son genéticamente parecidos a *F. microphylla*, 13.63% a *F. thymifolia* y el 13.63% parecen ser intermedios.

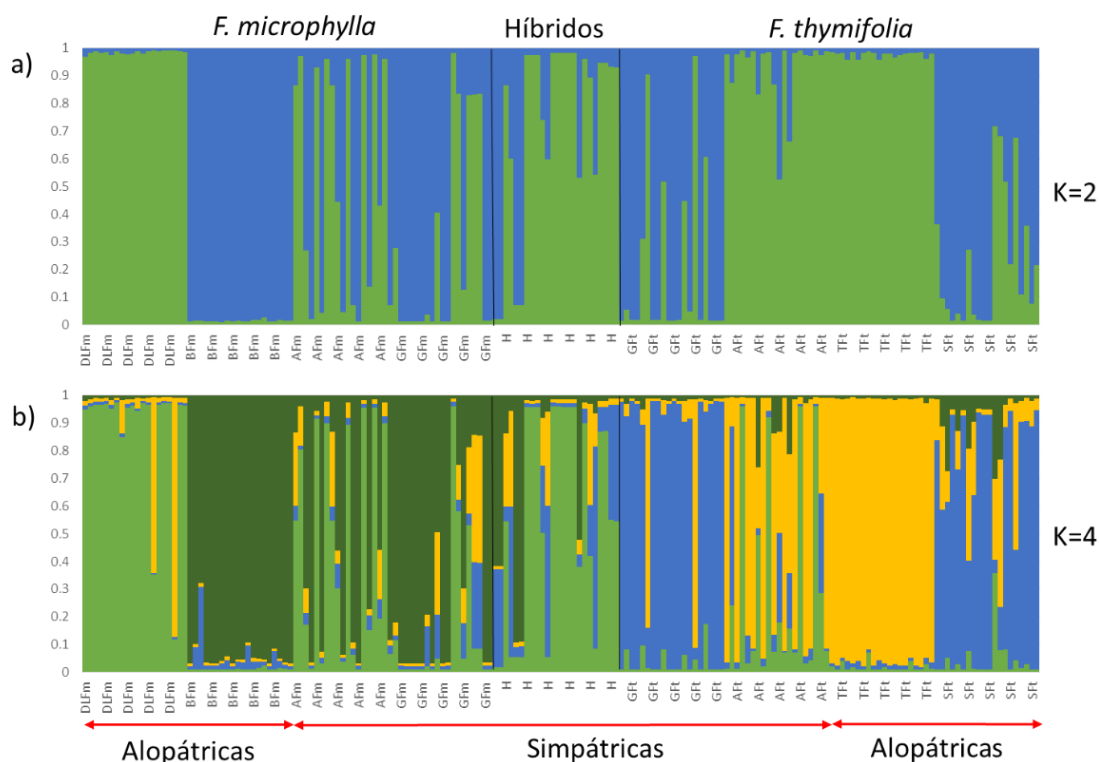


Figura 15. a) Estructura genética de dos grupos entre las poblaciones de *F. microphylla*, *F. thymifolia* e híbridos putativos; b) Formación de cuatro grupos genéticos entre las dos especies e híbridos putativos con el programa STRUCTURE, cada barra vertical corresponde a un individuo y sus proporciones.

5.4.2 Diversidad genética de especies progenitoras e híbridos

De acuerdo con el programa MICROCHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) de las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos considerando 5 microsatélites, los híbridos de la población de Garnica presentan alelos nulos en los loci fus 31, fus 33 y fus 47. Seguido por la población de Garnica con presencia de alelos nulos en los loci fus 31 y fus 47. El mínimo

y máximo valor de Oosterhout va desde 0.202 a 0.338 ambos para el fus 31. El Desierto de los Leones solamente posee alelos nulos en el fus 52 y tanto las poblaciones del Cerro Burro y Amecameca tienen ausencia de alelos nulos.

Respecto con las poblaciones de *F. thymifolia* evaluadas con tres microsátelites, la única con ausencia de alelos nulos es Tequila, por el contrario, Amecameca y Sinaloa poseen alelos nulos tanto en el locus fus 27 como fus 47. Por último Garnica solamente muestra alelos nulos para el fus 27. El parámetro de Oosterhout va de 0.155 (fus 47) hasta 0.364 (fus 27).

Los modelos comparados en el programa INest2 (Chybicki y Burczyk, 2009) para cada especie e híbridos fueron el nfb y el nb (n, alelos nulos; f, endogamia; b, error de genotipado) los cuales, indican que tanto para *F. microphylla*, *F. thymifolia* y los híbridos la presencia de alelos nulos dentro de sus poblaciones son un factor importante en el modelo tanto que al considerarse se disminuyen los coeficientes de endogamia.

Tabla 9. Coeficientes de endogamia corregida por presencia de alelos nulos

Especie		Modelo	
		fb	nfb
Fm	Fis	0.2855	0.0796
	Fis corregida	0.2845	0.0774
	DIC	2595.94	2543.34
Ft	Fis	0.5346	0.506
	Fis corregida	0.535	0.5055
	DIC	1306.19	1305.56
Híbridos	Fis	0.3452	0.041
	Fis corregida	0.3426	0.0345
	DIC	495.403	480.183

Fm, *F. microphylla*; Ft, *F. thymifolia*; Fis, endogamia clásica = 1-Ho/He; n, alelos nulos; f, endogamia; b, error de genotipado; DIC, Criterio de Desviación de la Información.

Los parámetros de diversidad genética entre el parental *F. microphylla* y los híbridos putativos (Tabla 10) indican que la población alopátrica del Cerro Burro es la más diversa en todos los parámetros calculados, respecto a los híbridos estos son muy parecidos a la población de Garnica que corresponde a su parental directo. Sin embargo, los híbridos putativos poseen un mayor número de alelos efectivos y una mayor diversidad genética considerando el índice de información que hace referencia al índice de Shannon-Weaver; además *F. microphylla* de Garnica mediante el índice de fijación (F) indica que poseen un exceso de heterocigosidad, contrario a los híbridos putativos que muestran endogamia; y ambas poblaciones presentan cinco loci desviados del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual, señala que las poblaciones no están teniendo apareamiento aleatorio entre sus individuos.

Tabla 10. Parámetros de diversidad genética por población para *F. microphylla* y los híbridos putativos.

Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	EHW	F	Ap
DL	20	4.00	2.42	0.90	0.48	0.47	2	-0.06	0.43
B	20	5.00	2.97	0.99	0.54	0.47	2	-0.17	1.43
A	20	4.14	2.52	0.83	0.51	0.42	2	-0.21	0.29
G	20	4.00	2.51	0.90	0.47	0.46	5	-0.04	0.57
H	22	4.14	2.84	0.97	0.40	0.49	5	0.11	0.57

N, núm. individuos; Na, Núm. alelos; Ne, núm. alelos efectivos; I, índice de información; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; EHW, núm. de loci desviados del EHW; F, índice de fijación; Ap, alelos privados. DL, Desierto de los Leones; B, Cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica; H, Híbridos de Garnica.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) muestra que el 22% de la variación se encuentra entre las poblaciones de *F. microphylla* y un 78% están dentro de las mismas. El mayor valor de diferenciación genética (F_{ST} , Tabla 11) está entre la población alopátrica del Desierto de los Leones y la simpátrica de Garnica, a su vez la menor diferenciación ocurre entre esta última y los híbridos putativos, remarcando su moderado parecido genético. La siguiente población con la que menos se diferencian los híbridos putativos es la población simpátrica de Amecameca, lugar donde también puede estar ocurriendo la hibridación.

Tabla 11. Diferenciación genética pareada (F_{ST}) entre las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos putativos, basada en cinco microsatélites.

	DLFm	BFm	AFm	GFm
BFm	0.29			
AFm	0.19	0.25		
GFm	0.30	0.22	0.21	
H	0.19	0.20	0.17	0.14

DL, Desierto de Leones; B, Cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica; Fm, *F. microphylla*; Ft, *F. thymifolia*; H, Híbridos de Garnica. Todos las $P \leq 0.001$. En negrito el valor más alto y más bajo.

En la segunda parte, se calcularon los parámetros de diversidad genética para *F. microphylla*, *F. thymifolia* y los híbridos putativos, mediante tres microsatélites (Tabla 12). Nuevamente la población alopátrica del Cerro Burro perteneciente a la especie *F. microphylla* parece ser la que mayor diversidad genética posee en cuanto al índice de información (I), heterocigosidad observada y alelos privados. Respecto a los híbridos putativos estos presentan una mayor diversidad genética sobre sus progenitores directos de Garnica, seguidos por *F. microphylla* de Garnica y al final *F. thymifolia* del mismo sitio. El índice de fijación señala que las poblaciones de BFm, GFm y los híbridos están llevando a cabo un apareamiento aleatorio entre sus individuos, y las poblaciones restantes presentan problemas de endogamia o alelos nulos, entre las cuales esta GFt, el otro parental de los híbridos putativos. Así mismo, las poblaciones de *F. thymifolia* son las que tienen la mayor cantidad de loci (3/3) desviados del Equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que significa que carecen de apareamiento aleatorio dentro de sus poblaciones.

Tabla 12. Parámetros de diversidad genética por población para *F. microphylla* (Fm), *F. thymifolia* (Ft) y los híbridos putativos.

Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	EHW	F	Ap
DLFm	20	4.00	2.45	0.90	0.35	0.47	1	0.18	0.00
BFm	20	6.00	3.13	1.16	0.50	0.51	0	0.01	2.00
AFm	20	5.33	3.20	0.98	0.40	0.45	0	0.15	0.33
GFm	20	4.67	2.23	0.99	0.43	0.49	2	0.06	0.33
H	22	5.33	3.53	1.17	0.48	0.54	2	0.08	0.00
GFt	20	3.67	2.08	0.77	0.27	0.40	1	0.27	0.00
AFt	20	5.67	2.87	1.23	0.43	0.63	2	0.29	0.33
TFt	20	5.00	3.10	1.17	0.42	0.57	3	0.31	2.00
SFt	20	4.67	2.15	0.89	0.17	0.44	3	0.54	0.33

N, núm. individuos; Na, Núm. alelos; Ne, núm. alelos efectivos; I, índice de información; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; EHW, núm. de loci desviados del EHW; F, índice de fijación; Ap, alelos privados. DL, Desierto de los Leones; B, Cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica; H, Híbridos de Garnica; T, Tequila; S, Sinaloa.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones de las especies progenitoras indica que el 27% de la variación se encuentra entre estas, aunque aún existe un 73% de la variación entre los individuo. El grado de diferenciación genética (F_{ST} , Tabla 13) fue mayor entre la población alopátrica del Desierto de los Leones de *F. microphylla* y la población simpátrica de Garnica para *F. thymifolia*, en cambio, la menor diferenciación fue entre los híbridos putativos y la población simpátrica de Amecameca para *F. microphylla*.

Tabla 13. Diferenciación genética pareada (F_{ST}) entre poblaciones de las especies *F. microphylla* (Fm), *F. thymifolia* (Ft) y sus híbridos putativos. Basada en tres microsatélites.

	DLFm	BFm	AFm	GFm	H	GFt	AFt	TFt
BFm	0.41							
AFm	0.26	0.23						
GFm	0.41	0.18	0.18					
H	0.29	0.17	0.11	0.18				
GFt	0.48	0.27	0.32	0.33	0.21			
AFt	0.20	0.28	0.26	0.29	0.21	0.33		
TFt	0.33	0.22	0.22	0.25	0.18	0.29	0.22	
SFt	0.44	0.22	0.29	0.23	0.22	0.29	0.30	0.26

B, Cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica; H, Híbridos; T, Tequila; S, Sinaloa. Todas las probabilidades $P \leq 0.001$. En negrito el valor más alto y más bajo.

Ahora bien cuando se señalan tres regiones una formada por todas las poblaciones de *F. microphylla*, otra para todas las poblaciones de *F. thymifolia* y la tercera por los híbridos de Garnica, y se calcula el AMOVA se encuentra que no existe variación entre estas regiones, identificando un 28% de la variación entre las poblaciones y un 72 dentro de las mismas. En cuanto al nivel de diferenciación genética se encontraron valores relativamente bajos y parecidos, sin embargo, se detecta que la mayor diferenciación es entre las dos especies progenitoras y la menor diferenciación entre *F. microphylla* y los híbridos (Tabla 14).

Tabla 14. Diferenciación genética pareada (F_{ST}) entre *F. microphylla* (Fm), *F. thymifolia* (Ft) y los híbridos putativos (H), basada en tres microsatélites. Todos las $P \geq 0.001$.

	Fm	H
H	0.065	
Ft	0.078	0.077

5.4.3 Análisis de Coordenadas Principales

El Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) entre las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos putativos (Figura 16) identifica al menos dos grupos correspondientes a las dos poblaciones alopátricas. Las poblaciones simpátricas en cambio, se encuentran más dispersas, incluso los híbridos se dividen en dos partes, unos individuos ubicados entre las poblaciones simpátricas y el resto entre las dos poblaciones alopátricas coincidiendo en que, dichos híbridos son mayormente asignados a grupos genéticos alopátricos. Entre el primer y segundo eje de coordenadas principales solamente se explica un 17.8 y 11.12 % respectivamente de la variación genética.

ACoP entre poblaciones de *F. microphylla*

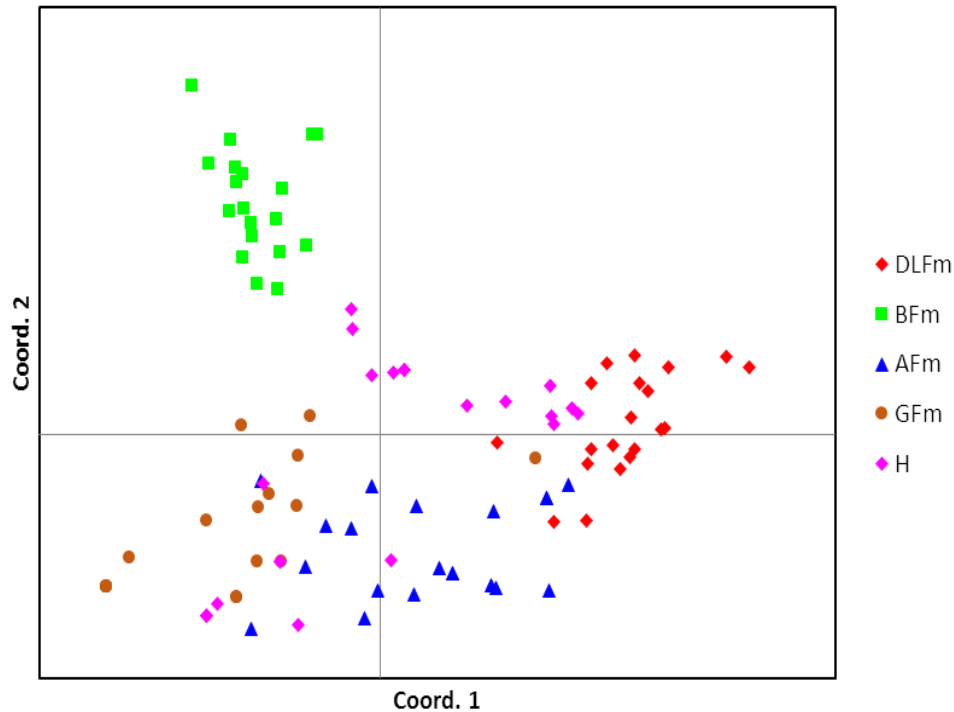


Figura 16. ACoP entre poblaciones de *F. microphylla* donde se observa como los híbridos se colocan mayormente entre las poblaciones alopátricas. DL, Desierto de los Leones; B, cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica y H, híbridos.

Ahora bien, cuando se realizó un ACoP entre las poblaciones de ambas especies y los híbridos putativos (Figura 17) el primer y segundo eje de coordenadas principales explican apenas el 19.7 y 10.8% de la variación genética respectivamente. Se aprecia que las especies progenitoras no logran separarse claramente con la información de 3 microsatélites, no obstante, *F. microphylla* parece encontrarse en mayor frecuencia por debajo del segundo eje y *F. thymifolia* tiende a dominar sobre este mismo eje y se observa que los híbridos putativos están mayormente en la parte de *F. microphylla*. Este patrón refleja la posible introgresión sesgada hacia esta última especie.

ACoP entre *F. microphylla*, *F. thymifolia* e híbridos

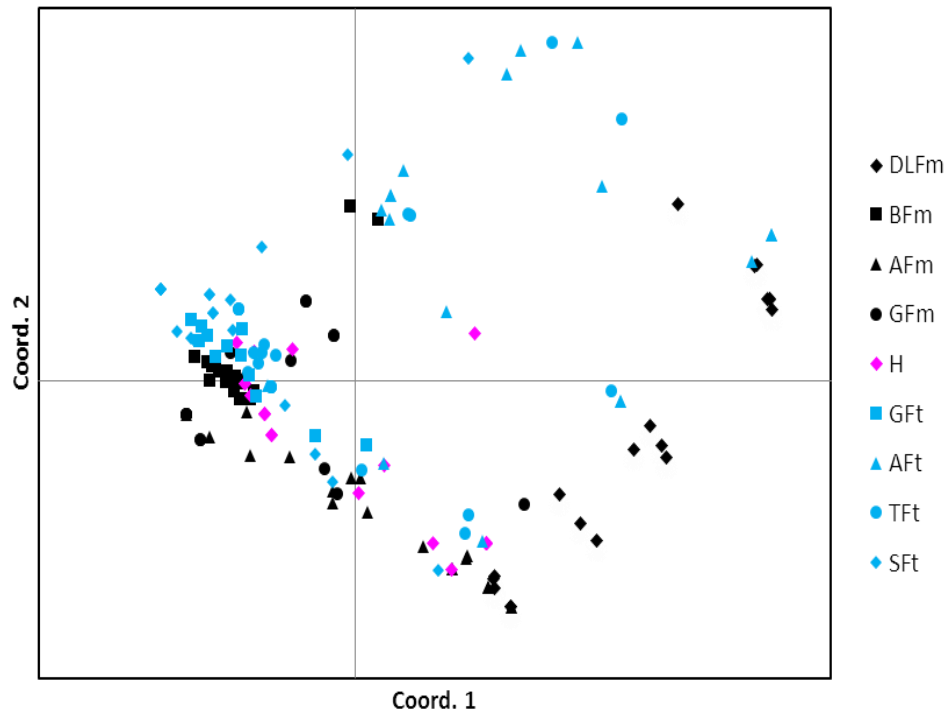


Figura 17. ACoP incluyendo poblaciones de *F. microphylla*, *F. thymifolia* y los híbridos putativos. Se observa que las dos especies no logran separarse totalmente. DL, Desierto de los Leones; B, cerro Burro; A, Amecameca; G, Garnica; H, híbridos; T, Tequila; S, Sinaloa; Fm, *F. microphylla*; Ft, *F. thymifolia*.

5.4.4 Correlación entre distancias genéticas, morfológicas y geográficas Distancias morfológicas y geográficas

Las pruebas de Mantel entre las distancias morfológicas (Manhattan) y geográficas, se llevaron a cabo por especie para cada estructura, es decir, hojas, tubo floral, pétalos y sépalos (Tabla 15) usando las distancias genéticas como matriz indicadora. No se encontró ninguna correlación significativa entre morfología y distancia geográfica, la cual podría estar indicando de manera indirecta diferencias en las condiciones ambientales de cada sitio.

Tabla 15. Pruebas de Mantel entre matrices de distancias morfológicas y geográficas, con la distancia genética como indicador.

		<i>F. microphylla</i>		<i>F. thymifolia</i>	
	Estructura	r	p	r	p
Normal	hojas	0.82	0.88	-1.00	1.00
log morf	hojas	0.20	0.60	-1.00	1.00
log geo	hojas	0.84	0.97	-1.00	0.82
log/log	hojas	0.78	0.27	-1.00	0.82
Normal	pétalos	0.34	0.60	1.00	0.66
log morf	pétalos	0.14	0.48	1.00	0.66
log geo	pétalos	0.45	0.67	1.00	1.00
log/log	pétalos	0.04	0.54	1.00	1.00
Normal	sépalos	0.05	0.50	1.00	1.00
log morf	sépalos	-0.20	0.73	1.00	0.82
log geo	sépalos	0.21	0.57	1.00	1.00
log/log	sépalos	-0.14	0.70	1.00	1.00
Normal	tubos	0.34	0.61	-1.00	1.00
log morf	tubos	0.30	0.74	-1.00	1.00
log geo	tubos	0.59	0.77	-1.00	1.00
log/log	tubos	0.33	0.71	-1.00	1.00

Normal, se refiere al cálculo de la correlación con los datos crudos; log geo/morf, a una de las distancias se les calculó el logaritmo; log/log, a ambas distancias se les calculó el logaritmo.

Distancias genéticas y geográficas

Las pruebas de Mantel entre las matrices de distancias genéticas (F_{ST}) estimadas con cinco y tres microsatélites en *F. microphylla* y *F. thymifolia* respectivamente, contra las distancias geográficas se llevaron a cabo por especie (Tabla 16) y por estructura debido a que se utilizaron las distancias morfológicas como matriz indicadora. Se encontraron distintas correlaciones pero todas fueron no significativas estadísticamente, rechazándose la hipótesis de aislamiento por distancia.

Tabla 16. Pruebas de Mantel entre matrices de distancias genéticas y geográficas, con la distancia morfológica como indicador.

		<i>F. microphylla</i>		<i>F. thymifolia</i>	
	Estructura	r	p	r	p
Normal	hojas	0.91	0.91	1.00	1.00
Log gen	hojas	0.48	0.84	1.00	0.83
log geo	hojas	0.95	1.00	1.00	0.83
log/log	hojas	0.73	0.89	1.00	0.83
Normal	pétalos	0.76	0.87	1.00	0.66
log gen	pétalos	0.58	0.81	1.00	0.66
log geo	pétalos	0.79	0.87	1.00	0.48
log/log	pétalos	0.72	0.82	1.00	0.49
Normal	sépalos	0.68	0.86	1.00	1.00
log gen	sépalos	0.44	0.85	1.00	0.83
log geo	sépalos	0.71	0.87	1.00	0.83
log/log	sépalos	0.59	0.80	1.00	0.83
Normal	tubos	0.77	0.81	1.00	0.82
log gen	tubos	0.67	0.84	1.00	0.84
log geo	tubos	0.78	0.83	1.00	0.84
log/log	tubos	0.78	0.93	1.00	0.82

Normal, se refiere al cálculo de la correlación con los datos crudos; log gen/geo, a una de las distancias se les calculó el logaritmo; log/log, a ambas distancias se les calculó el logaritmo.

Distancias morfológicas y genéticas

Al utilizar las distancias morfológicas (Manhattan) y genéticas (F_{ST}) empleando la matriz de distancias geográficas como indicador, nuevamente se encontró una ausencia de correlaciones estadísticamente significativas a pesar de la variación en los grados de correlaciones negativas (Tabla 17).

Tabla 17. Pruebas de Mantel entre matrices de distancias genéticas y morfológicas, con la distancia geográfica como indicador.

		<i>F. microphylla</i>		<i>F. thymifolia</i>	
	Estructura	r	p	r	p
Normal	hojas	-0.97	0.97	1.00	0.85
log gen	hojas	-0.96	1.00	1.00	0.83
log morf	hojas	-0.98	0.95	1.00	0.83
log/log	hojas	-0.93	0.96	1.00	0.84
Normal	pétalos	-0.74	0.79	-1.00	1.00
log gen	pétalos	-0.70	0.75	-1.00	1.00
log morf	pétalos	-0.75	0.83	-1.00	1.00
log/log	pétalos	-0.74	0.83	-1.00	1.00
Normal	sépalos	-0.59	0.76	-1.00	1.00
log gen	sépalos	-0.52	0.77	-1.00	1.00
log morf	sépalos	-0.64	0.75	-1.00	0.83
log/log	sépalos	-0.58	0.75	-1.00	0.83
Normal	tubos	-0.72	0.88	1.00	0.85
log gen	tubos	-0.84	0.91	1.00	1.00
log morf	tubos	-0.70	0.87	1.00	0.67
log/log	tubos	-0.82	0.91	1.00	0.68

Normal, se refiere al cálculo de la correlación con los datos crudos; log geo/morf, a una de las distancias se les calculó el logaritmo; log/log, a ambas distancias se les calculó el logaritmo.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Morfometría geométrica

Las comparaciones de la forma de hojas, tubos florales, pétalos y sépalos entre las especies *F. microphylla*, *F. thymifolia* y sus híbridos putativos muestran que cada uno de estos caracteres evaluados tienen un sentido distinto de similitud entre sí. Es decir, al hablar de la forma de hojas de los híbridos putativos se encontró que forman un grupo aparte pero muy cercano a *F. thymifolia*. En cuanto a los tubos florales, los híbridos poseen una morfología intermedia, respecto a progenitores alopatricos mientras que con las poblaciones simpátricas están más cercanos a *F. thymifolia*. Los pétalos permiten diferenciar las dos especies pero los híbridos se unen a *F. microphylla*. Finalmente con los sépalos se separan los tres taxa, sin embargo, los híbridos vuelven a quedar más cercanos a su parental *F. microphylla*. Estos resultados son similares a los de Quiroga *et al.* (2005) y Jacquemyn *et al.* (2012), en donde los caracteres medidos de flores y hojas respectivamente, poseen distintos valores como puede ser intermedios, extremos y/o cercanos a algún parental en especial.

Rieseberg (1995), hace énfasis en que los híbridos no tienen que ser morfológicamente intermedios, y se basa en una revisión de 35 trabajos donde los híbridos generalmente no se comportan así. Esto podría explicarse debido a que la expresión de los caracteres en los híbridos dependerán de la naturaleza del control genético de cada uno (Ishida *et al.* 2003), así como de la interacción con el ambiente; por lo que concluye que los híbridos más que intermedios son un mosaico de caracteres progenitores, intermedios y extremos. Por ejemplo, Field *et al.* (2009) mencionan que los caracteres intermedios son de herencia aditiva y los caracteres sesgados hacia algún parental son de herencia dominante o parcialmente dominante.

Lihová *et al.* (2007) señalan que la morfología intermedia, la esterilidad del polen y el número de cromosomas se han considerado como indicadores de hibridación, no obstante, la intermediación de caracteres parece presentarse principalmente en individuos híbridos F1 (Kamiya *et al.* 2011, Lee *et al.* 2014; Liao *et al.* 2015). En el género *Shorea* al estar ausente la intermediación de los caracteres morfológicos se sugiere que las retrocruzas no están ocurriendo (Kamiya *et al.* 2011). Por el contrario, según Albert (1997), los sistemas donde la hibridación y las retrocruzas son comunes se relacionan con una gran variación morfológica, situación que encontró entre *Carpobrotus chilensis* y *C. edulis*, en donde a pesar de poder distinguir a estas especies, los híbridos formaban un continuo de variación entre ambos progenitores. Estos escenarios son similares a los encontrados en el presente estudio y apoyarían la hipótesis de que los híbridos putativos de Garnica son resultado de la cruce interespecífica entre *F. microphylla* y *F. thymifolia*. Además es probable que estén ocurriendo retrocruzas, lo que puede dificultar el reconocimiento de estos individuos que no suelen presentar una morfología intermedia en la mayoría de sus caracteres evaluados, similar a lo reportado por Field *et al.* (2009).

Respecto a las hojas de los híbridos sintéticos, solamente los de progenitores simpátricos (de Garnica) presentan una morfología intermedia mientras que los F1 de progenitores alopátricos son muy parecidos a *F. microphylla*. En la Figura 5, donde se aprecian las categorías de los híbridos se observa que pocos híbridos adultos de Garnica presentan la intermediación morfológica como la de los F1 sintéticos de origen simpátrico. Al igual que con la morfometría geométrica, Rodríguez (2011), a través de medidas lineales de hojas y flores, coincidió en que el tubo floral (largo) permiten diferenciar las muestras tanto por morfo, especie y condición poblacional; e incluyendo algunas hojas de híbridos F1 (*F.*

thymifolia como receptora x *F. microphylla* como donadora) encontró que los híbridos sintéticos se parecen más a *F. thymifolia* en lo largo y ancho de la lámina foliar de condición simpátrica.

Con el ACP se determinó que la forma de las hojas y los tubos florales son los mejores caracteres para distinguir tanto a *F. microphylla*, como a *F. thymifolia* de los híbridos. De manera similar, Cattel y Karl (2004), encontraron que los caracteres de hojas de *Borrchia frutescens* y *B. arborescens* fueron mejores que los de las flores para discriminar a estas especies; por el otro lado, para Archibald *et al.* (2004), los rasgos como orientación de las flores, indumento, simetría floral y longitud del tubo funcionaron mejor para separar *Zaluzianskya microsiphon* de *Z. natalensis*. Finalmente también utilizando morfometría geométrica Viscosi *et al.* (2009) y Peñaloza-Ramírez *et al.* (2010) lograron diferenciar especies de *Quercus* con la forma de las hojas.

6.2 Identificación de especies progenitoras e híbridos

Con la información de cinco microsatélites se encontró una gran estructura genética entre las poblaciones de *F. microphylla* estudiadas, dejando a los híbridos putativos como pertenecientes a una u otra población. Después, al intentar identificar mediante tres microsatélites a las especies progenitoras y los híbridos putativos, el programa de STRUCTURE sugiere la existencia de dos grupos genéticos, los cuales no permiten separar a *F. microphylla* de *F. thymifolia* y los híbridos se asignan en su mayoría como pertenecientes a un grupo genético que está presente en ambos progenitores simpátricos de Garnica. Esto dificulta el reconocimiento de los híbridos putativos como F1 o cualquier otra filial. Sin

embargo, el gráfico de valores Delta K presenta la formación de un segundo pico muy pequeño que sugiere la existencia de cuatro grupos genéticos, mediante los cuales, es más fácil reconocer a cada especie parental y determinar que los híbridos putativos son genéticamente más parecidos a *F. microphylla*, pero debido a los pocos microsatélites utilizados en este análisis los resultados tienen que considerarse con cautela. Algo similar reporta Archibald *et al.* (2004) con *Zaluzianskya microsiphon* y *Z. natalensis*, donde dada la similitud genética sus datos moleculares son poco concluyentes pero que combinados con los datos morfológicos se apoya el caso de la introgresión. Por su parte, Ishida *et al.* (2003), determinó que la diferenciación genética entre *Quercus dentata* y *Q. crispula* es muy baja, sin embargo, los insectos minadores sirven para identificar a los híbridos. En el presente estudio es muy probable que los individuos considerados híbridos en Garnica sí lo sean, y seguramente está ocurriendo la introgresión sesgada hacia *F. microphylla*, por dos razones: la primera es que los resultados de estructura genética indican que los híbridos son genéticamente más similares a individuos de *F. microphylla* de las poblaciones alopátricas que de las simpátricas (lo mismo pasa con la morfología en ocasiones). La segunda razón, es que de los siete microsatélites que amplificaron en *F. microphylla* todos funcionaron mucho mejor en los híbridos putativos que en *F. thymifolia*, muy probablemente debido al mayor parecido genético entre estos.

En los casos donde además de ocurrir la hibridación también se lleva a cabo la introgresión resulta ser generalmente unidireccional, como se muestra en la Tabla 1 donde en 12 de 25 estudios sus autores concluyen que existe hibridación introgresiva hacia algún parental en específico, dejando como situaciones raras o poco frecuentes las retrocruzas hacia el otro parental (Albert 1997; Milne *et al.* 1999; Harding *et al.* 2000; Cattel y Karl, 2004; Heather

et al. 2004; Stecconi *et al.* 2004; Quiroga *et al.* 2005; Zalapa *et al.* 2009; Jacquemyn *et al.* 2010; Brunet *et al.* 2013; Furches *et al.* 2013; Fogelqvist *et al.* 2015). En poblaciones donde la hibridación se encuentra en etapas tempranas, se ha visto que los híbridos poseen en general una morfología intermedia, por otro lado, en poblaciones donde las retrocruzas ya han sido muy extensas y frecuentes se llega a un punto donde incluso los mismos híbridos ya no son reconocidos en campo y pueden ser confundidos con alguno de sus progenitores. En el caso de *F. microphylla* y *F. thymifolia*, los híbridos putativos aparentemente aún se pueden diferenciar de los dos progenitores, pero a su vez los resultados de la morfología sugieren que aunque se mantienen como un grupo aparte estos individuos son muy cercanos morfológicamente a su parental *F. thymifolia*, sin ignorar la posibilidad de que algunos híbridos de generaciones posteriores podrían estar confundiendo ya con alguno de sus progenitores. De confirmarse esta situación (ampliando el número de marcadores moleculares), tendríamos una incongruencia entre la genética y la morfología similar al caso de Archibald *et al.* (2004) comentado anteriormente quienes proponen como hipótesis que los híbridos están contribuyendo en el flujo genético entre sus progenitores moviendo material genético de *Z. microsiphon* dentro de *Z. natalensis* mediante las retrocruzas con estos últimos. Otro estudio similar de incongruencia entre datos morfológicos y genéticos es el realizado por Lihová *et al.* (2007) en el género *Cardamine* donde encontró individuos con morfología de *C. pratensis* que genéticamente representan individuos introgresados, e individuos morfológicamente intermedios que corresponden a individuos genéticos de *C. raphanifolia*.

6.3 Diversidad genética de especies progenitores e híbridos

De acuerdo con los parámetros de diversidad genética y los valores de diferenciación genética calculados entre las poblaciones de *F. microphylla* y los híbridos, estos son muy similares a su parental de Garnica, pero presentan un problema de endogamia señalado con el índice de fijación. Ahora bien, los mismos parámetros estimados para *F. microphylla*, *F. thymifolia* y los híbridos, indican que los híbridos son superiores a sus progenitores en cuanto a número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o) e índice de información (I). En cambio, los híbridos poseen 0.57 alelos privados cuando solo se comparan con *F. microphylla* y se pierde al incluir en el análisis a *F. thymifolia*. Esto se puede interpretar como la contribución de este segundo parental en los híbridos. En algunos trabajos (Quiroga *et al.* 2005, Zalapa *et al.* 2009 y Brunet *et al.* 2013), al comparar los niveles de diversidad genética en términos de H_o e I (índice de información) encuentran que los híbridos poseen un mayor valor respecto a sus progenitores, a su vez coinciden en que estos resultados subrayan la presencia de híbridos F1. Para Brunet *et al.* (2013) su importancia radica en que puede estar reflejando el estado de introgresión y conllevando a que en los individuos F2 se presentara aún más de esta variabilidad genética.

Esta variabilidad adquirida por los híbridos puede conducir al aumento de la adecuación de los mismos aún sobre sus progenitores desarrollando fenotipos y genotipos más competitivos, aunque se tiene que recordar que la mayoría de los híbridos, identificados por su morfología intermedia en campo, son hembras por lo que requieren de algún parental para reproducirse, de lo contrario, tendrán que utilizar la reproducción asexual, la cual es probable que esté presente (obs.pers.). Cabe mencionar que en la población simpátrica de Garnica las plantas

de *F. thymifolia* poseen un mayor tamaño comparado con las plantas de otras poblaciones alopátricas, lo cual requiere de más estudios al respecto.

6.4 Análisis de Coordenadas Principales

El PCoA entre poblaciones de *F. microphylla* al igual que el realizado entre poblaciones tanto de *F. microphylla* como de *F. thymifolia*, explican con los dos primeros ejes apenas un 30% de la variación genética, contrario al ACP de morfología el cual explica un 98% de la variación morfológica, remarcado así que la diferenciación morfológica está más desarrollada y que falta aumentar el número de marcadores empleados. Por el contrario, Brunet *et al.* (2013) al realizar un ACoP con base en la asignación morfológica de los individuos no logran identificar a sus especies progenitores tan claramente como cuando se basaba en la asignación genética. De igual manera, Zalapa *et al.* (2009) y Jacquemyn *et al.* (2012) consiguieron separar a sus especies progenitoras de los híbridos putativos con la información de 9 microsatélites y 113 marcadores AFLP respectivamente.

6.5 Correlación entre matrices morfológicas, genéticas y geográficas

La hipótesis de aislamiento genético por distancia se verificó con la prueba de Mantel entre las distancias genéticas y geográficas, encontrándose una moderada correlación positiva en *F. microphylla*, la cual, disminuyó para *F. thymifolia*, sin embargo para ambas especies dicha correlación fue no significativa. Por el contrario, Archibald *et al.* (2004), observaron una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica y proponen que si la hibridación está ocurriendo en unas pocas poblaciones simpátricas, y los efectos podrían expandirse a las poblaciones alopátricas cercanas.

Todas las correlaciones entre morfología y genética para las estructuras evaluadas en *F. microphylla* y *F. thymifolia* fueron estadísticamente no significativas. En cambio, McIntosh *et al.* (2013), encontraron una baja pero significativa correlación entre genética y morfometría cuando realizaron la correlación a través de todos los sitios. Una posible interpretación es que la asociación de caracteres morfológicos con complejos de genes se podría estar rompiendo como resultado de la hibridación (Albarrán-Lara *et al.* 2010) o debido a que las poblaciones se están diferenciando genéticamente esto conlleva a un cambio en su morfología sumado al ambiente de cada sitio.

Las correlaciones negativas y no significativas entre distancias morfológicas y geográficas están indiciando que entre más cercanas geográficamente están las poblaciones menos parecidas son, coincidiendo con las tablas de asignación posteriori donde los híbridos se llegan a asignar a una población alopátrica más que a una simpátrica, sin embargo, estos resultados solo son producto del azar.

VII. CONCLUSIONES

Con la morfometría geométrica fue posible separar a las especies *F. microphylla* y *F. thymifolia*. Mediante la comparación de la forma de las hojas, el tubo floral, pétalos y sépalos.

Las estructuras que mejor se diferencian entre las especies y los híbridos putativos son las hojas y el tubo floral, por lo que estos órganos pueden servir para identificar a los híbridos de sus progenitores. Por el contrario, los pétalos y sépalos presentan una gran variación morfológica que hace difícil la diferenciación incluso entre especies.

El patrón de introgresión parece ser totalmente unidireccional hacia el parental *F. microphylla*; sin embargo, se debe recordar que en la *F. thymifolia* no funcionaron el mismo número de microsatélites que en la *F. microphylla* y los híbridos putativos, por lo que se requiere incluir un mayor número de microsatélites.

La diversidad genética de los híbridos putativos parece ser ligeramente mayor que la de *F. microphylla* cuando solamente se compara con este parental, e incluso cuando se incluye a *F. thymifolia* los híbridos poseen mayor diversidad genética relativa con respecto a sus progenitores.

En general, los híbridos putativos de Garnica parecen ser morfológicamente más similares a su parental *F. thymifolia* y genéticamente más parecidos a *F. microphylla*.

LITERATURA CITADA

- Albarrán-Lara, A. L., L. Mendoza-Cuenca, S. Valencia-Avalos, A. González-Rodríguez and K. Oyama. **Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico.** *Int. J. Plant Sci.* 171(3):310-322.
- Albert, M. E., C. M. D'Antonio and K. A. Schierenbeck. 1997. **Hybridization and introgression in *Carpobrotus* spp. (Aizoaceae) in California. I. Morphological evidence.** *American Journal of Botany*, 84(8): 896-904.
- Álvarez, B. A. 2012. **Aislamiento reproductivo entre *Fuchsia microphylla* y *F. thymifolia* (ONAGRACEAE), dos especies simpátricas.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Archibald, J. K., A. D. Wolfe and S. D. Jhonson. 2004. **Hybridization and gene flow between a day- and night-flowering species of *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae s.s., tribe Manuleae).** *American Journal of Botany* 91(9):1333-1344.
- Arroyo, M.T.K. and P.H. Raven. 1975. **The evolution of subdioecy in morphologically gynodioecious species of *Fuchsia* section *Encliandra* (Onagraceae).** *Evolution* 29: 500-511.
- Balvino, O. F. J. 2012. **Desarrollo de primers microsatélite para la evaluación de problemas ecológicos en la calabaza silvestre "*Cucurbita argyrosperma* ssp *sororia*" (Cucurbitaceae).** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Berry, P. E., W. J. Hahn, K. J. Sytsma, J. C. Hall and A. Mast. 2004. **Phylogenetic relationships and biogeography of *Fuchsia* (Onagraceae) based on noncoding nuclear and chloroplast DNA data.** *American Journal of Botany* 91(4): 601-614.
- Bradshaw, H. D. Jr., K. G. Otto, B. E. Frewen, J. K. McKay and D. W. Schemske. 1998. **Quantitative Trait Loci Affecting Differences in Floral Morphology Between Two Species of Monkeyflower (*Mimulus*).** *Genetics Society of America*, 149:367-382.
- Breedlove, D. E. 1969. **The systematic of *Fuchsia* section *Encliandra* (Onagraceae).** University California Publisher Botany, 53: 1-69.
- Brunet, J., J. E. Zalapa, F. Pecori and A. Santini. 2013. **Hybridization and introgression between the exotic Siberian elm, *Ulmus pumila*, and the native Field elm, *U. minor*, in Italy.** *Biologicals Invasions* 15:2717-2730.
- Brys, R., A.V. Broeck, J. Mergeay and H. Jacquemyn. 2014. **The contribution of mating system variation to reproductive isolation in two closely related *Centaurium* species (Gentianaceae) with a generalized flower morphology.** *Evolution*, 68-5: 1281-1293.

- Cattell, M. and S. A. Karl. 2004. **Genetic and morphology in a *Borrchia frutescens* and *B. arborescens* (Asteraceae) hybrid zone.** American Journal of Botany, 91(11): 1757-1766.
- Chybicki, I. J., & Burczyk, J. 2009. **Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients.** Journal of Heredity. 100(1), 106-113.
- Dell'Olivo, A., M. E. Hoballah, T. Gübitz and C. Kuhlemeier. 2011. **Isolation barriers between *Petunia axillaris* and *Petunia integrifolia* (Solanaceae).** Evolution 65-7: 1979–1991.
- Eguiarte, L. E., V. Souza and X. Aguirre. 2007. **Ecología Molecular.** Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. 592 pp.
- Ellstrand, N. C., R. Whitkus and L. H. Rieseberg. 1996. **Distribution of spontaneous plant hybrids.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 93: 5090-5093.
- Field, D. L., D. J. Ayre, R. J. Whelan and A. G. Young. 2009. **Molecular and morphological evidence of natural interspecific hybridization between the uncommon *Eucalyptus aggregata* and the widespread *E. rubida* and *E. viminalis*.** Conserv. Genet 10: 881-896.
- Fogelqvist, J., A. V. Verkhozina, A. I. Katyshev, P. Pucholt, C. Dixelius, A. C. Rönneberg-Wästljung, M. Lascoux and S. Berlin. 2015. **Genetic and morphological evidence for introgression between three species of willows.** Evolutionary Biology 15:193.
- Furches, M. S., L. S. Randall and A. Furches. 2013. **Hybridization leads to interspecific gene flow in *Sarracenia* (Sarraceniaceae).** American Journal of Botany 100:2085-2091.
- Hammer, O., D.A.T. Harper and P. D. Ryan, 2001. **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis.** Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp.
- Hardig, T. M., S., J. Brunfeld, R. S. Fritz, M. Morgan and C.M. Orians. 2000. **Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone.** Molecular Ecology, 9,9-24.
- Heather, K., M. A. Macel, P. G. L. Klinkhamer and K. Vrieling. 2004. **Natural hybridization between *Senecio jacobaea* and *Senecio aquaticus*: molecular and chemical evidence.** Molecular Ecology, 13, 2267-2274.
- Ishida, T. A., K. Hattori, H. Sato and M. T. Kimura. 2003. **Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): insights from morphological traits, Amplified Fragment Length Polymorphism markers, and leafminer composition.** American Journal of Botany 90(5): 769-776.

- Jacquemyn, H., R. Brys, O. Honnay and I. Roldán-Ruiz. 2012. **Asymmetric gene introgression in two closely related *Orchis* species: evidence from morphometric and genetic analyses.** *Evolutionary Biology* 12:178.
- Jensen, R. J., K. M. Ciofani and L. C. Miramontes. 2002. **Lines, outlines, and landmarks: morphometric analyses of leaves of *Acer rubrum*, *Acer saccharinum* (Aceraceae) and their hybrid.** *Taxon* 51: 475-492.
- Jensen, J. L., Bohonak, A. J., and S. T. Kelley. 2005. **Isolation by distance.** Web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23.
- Kamiya, K., Y. Y. Gan, S. K. Y. Lum, M. S. Khoo, S. C. Chua and N. N. H. Faizu. 2011. **Morphological and molecular evidence of natural hybridization in *Shorea* (Dipterocarpaceae).** *Tree Genetics & Genomes* 7:297-306.
- Kay, K. M. 2006. **Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers.** *Evolution*, 60(3): 538-552.
- Lee, J.H., D. P. Jin and B.H. Choi. 2014. **Genetic differentiation and introgression among Korean evergreen *Quercus* (Fagaceae) are revealed by microsatellite markers.** *Ann. Bot. Fennici* 51: 39-48.
- Levin, G. A. 1999. **Evolution in the *Acalypha gracilens/monococca* Complex (Euphorbiaceae): Morphological Analysis.** *Systematic Botany*, 23(3): 269-287.
- Liao, R.L., Y.P. Ma, W.C. Gong, G. Chen, W.B. Sun, R.C. Zhou and T. Marczewski. 2015. **Natural hybridization and asymmetric introgression at the distribution margin of two *Buddleja* species with a large overlap.** *Plant Biology* 15: 146.
- Lihová, J., J. Kucera, M. Perny and K. Marhold. 2007. **Hybridization between Two Polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) Species in North-western Spain: Discordance between Morphological and Genetic Variation Patterns.** *Annals of Botany* 99: 1083-1096.
- Lowry, D. B., J. L. Modliszewski, K. M. Wright, C. A. Wu and J. H. Willis. 2008. **The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants.** *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological*, 363, 3009-3021.
- Mallet, J. 2007. **Hybrid speciation.** *Nature, Reviews*, Vol. 446: 279-283.
- McIntosh, E. J., M. Rossetto, P. H. Weston and G. M. Wardle. 2013. **Maintenance of strong morphological differentiation despite ongoing natural hybridization between sympatric species of *Lomatia* (Proteaceae).** *Annals of Botany* 1-12.
- Milne, R. I., R. J. Abbott, K. Wolff and D. F. Chamberlain. 1999. **Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence.** *American Journal of Botany* 86(12): 1776-1785.

- Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. **GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update.** *Bioinformatics* 28, 2537---2539.
- Peñaloza-Ramírez, J. M., A. González-Rodríguez, L. Mendoza-Cuenca, H. Caron, A. Kremer and K. Oyama. 2010. **Interespecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico.** *Annals of Botany* 105:389-399.
- Pinheiro, F., F. Barros, C. Palma-Silva, D. Meyer, M. F. Fay, R. M. Suzuki, C. Lexer and Salvatore. 2010. **Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae).** *Molecular Ecology* 19, 3981-3994.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Quiroga, P., R. V. Russel y A. C. Premoli. 2005. **Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patgónico.** *Bosque* 26(2): 25-32.
- Ramsey, J., H. D. Bradshaw and D. W. Schemske. 2003. **Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae).** *Evolution*, 57 (7): 1520-1534.
- Rhymer, J. M. and D. Simberloff. 1996. **Extinction by hybridization and introgression.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:83–109.
- Rieseberg, L. H. 1995. **The role of hybridization in evolution: old wine in new skins.** *American Journal of Botany*, 82(7): 944-953.
- Rieseberg, L. H. 1997. **Hybrid origins of plant species.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28: 359-89.
- Rodríguez, R. J. 2011. **Comparación morfológica de *Fuchsia microphylla* H.B.K. y *Fuchsia thymifolia* H.B.K. (Onagraceae) en poblaciones simpátricas y alopátricas.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Schlotterer, C. 2004. **The Evolution of Molecular markers – just a matter of fashion?.** *Nature Reviews*. 5:63-69.
- Selkoe, K. A. and R. J. Toonen. 2006. **Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers.** *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Soltis, P. S. and D. E. Soltis. 2009. **The Role of Hybridization in Plant Speciation.** *Annual Review of Plant Biology*. 60:561–88.
- Stecconi, M., P. Marchelli, J. Puntieri, P. Picca and L. Gallo. 2004. **Natural hybridization between a Deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and a Evergreen**

- (*N. dombeyi*) Forest Tree Species: Evidence from Morphological and Isoenzymatic Traits.** *Annals of Botany* 94:775-786.
- Surget-Groba, Y. and K. M. Kay. 2013. **Restricted gene flow within and between rapidly diverging Neotropical plant species.** *Molecular Ecology* 22, 4931–4942.
- Talluri, R. S. 2009. **Advances in interspecific hybridization in *Fuchsia*.** *International Journal Agriculture and Cop Sciences*. Vol., 1(1), 14-20.
- Talluri, R. S. 2012. **Barriers to gene flow in interspecific hybridization in *Fuchsia L.* (Onagraceae).** *Journal of Genetics*, Vol. 91, N° 1.
- Toro, I. M. V., S. G. Manríquez and G. I. Suazo, 2010. **Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa.** *International Journal of Morphology*, 28(4):977-990.
- Viscosi, V., O. Lepais, S. Gerber and P. Fortini. 2009. **Leaf morphological analyses in four European oak species (*Quercus*) and their hybrids: A comparison of traditional and geometric morphometric methods.** *Plant Biosystems*, 3:564-574.
- Viscosi, V. and A. Cardini. 2011. **Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners.** *PLoS ONE* 6(10): e25630.
- Widmer, A., C. Lexer and S. Cozzolino. 2009. **Evolution of reproductive isolation in plants.** *Heredity*, 102, 31-38.
- Yakimowski, A. B. and L. H. Rieseberg. 2014. **The role of homoploide hybridization in evolution: a century of studies synthesizing genetics and ecology.** *American Journal of Botany* 101(8): 1247-1258.
- Zalapa, J. E., J. Brunet and R. P. Guries. 2009. **Patterns of hybridization and introgression between invasive *Ulmus pumila* (Ulmaceae) and native *U. rubra*.** *American Journal of Botany* 96(6): 1116-1128.

ANEXO 1: NOTA DE LOS MICROSATÉLITES

Caracterización de siete loci microsatélites para *Fuchsia microphylla* (Onagraceae)

Cervantes-Díaz, C.I., Cuevas-García, E., Quesada-Avedaño, M.

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; IIES, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los marcadores microsatélites fueron desarrollados para la especie *F. microphylla*, con la finalidad de investigar patrones de hibridación y flujo genético así como diversidad genética dentro y entre sus poblaciones. Siete microsatélites fueron identificados y evaluados en cuatro poblaciones de México, en las cuales, se encontraron patrones de diversidad genética muy similares entre sí, además 4/7 primers amplificaron en *F. thymifolia* lo que subraya la importancia de estos microsatélites para estudiar procesos como la hibridación.

El género *Fuchsia* pertenece a la familia Onagraceae (Orden Myrtales), comprende aproximadamente 110 especies, es el único género de la familia con frutos carnosos y polen en gran medida biporado, cuyas flores generalmente son polinizadas por colibríes. Dentro del género se han reconocido 12 secciones, de las cuales cerca de tres cuartas partes se concentran en los Andes tropicales, y el resto se encuentran en México, América Central, La Española, el sureste de Brasil y los Andes del sur (Berry, 2004).

La sección *Encliandra* es común en bosques templados de América Central y México, en la Sierra Madre del Sur de Michoacán y en las montañas del Eje Volcánico Transmexicano, a altitudes que van de los 2000 a los 3400 m. (Breedlove 1969; Arroyo y Raven 1975). Las seis especies que reconoce Breedlove (1969) en esta sección son: (*Fuchsia microphylla*, *F. thymifolia*, *F. raveni*, *F. encliandra*, *F. obconica*, y *F. parviflora*) especies dimórficas, ya sean subdioicas, como las tres primeras o dioicas como el resto de las especies.

Además autores como Breedlove (1969), Talluri (2009, 2012) y Álvarez (2012) señalan que la hibridación entre especies de este género llega a ser común, por lo que, el desarrollo de estos marcadores podrá ayudar a la investigación sobre fenómenos como la hibridación.

Materiales y métodos: se extrajo el ADN usando el “DNeasy Plant Mini Kit” de QIAGEN, en 20 individuos por cada una de las cuatro poblaciones muestreadas. Los 80 individuos muestreados fueron genotipados usando los siguientes 7 microsatélites: fus 27, fus 52, fus 35, fus 48, fus 31, fus 47 y fus 33 (todos marcados con un fluoróforo, Tabla 18). De estos pares de primers cuatro amplificaron en la especie *F. thymifolia* (fus 27, fus 52, fus 35, fus 48). La reacción de PCR tenía un volumen total de 8 µl conformada por: 1X Quiagen multiplex, primer al 0.25 µM, 1-2 µl de ADN (~13 ng/ µl), y además a los individuos de *F. thymifolia* se les agregó entre 0.5-1 mM de Mg₂ adicional. Se utilizó el siguiente programa en el termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler: una temperatura inicial de 95 °C durante 15 minutos, seguida por 35 ciclos que se conformaban por 30 segundos a 94 °C, después 1 minuto a una temperatura variable (60, 61, 62 °C), enseguida un minuto a 72°C, para terminar con una extensión final de 72°C por 15 minutos. Los productos de PCR fueron primeramente visualizados en geles de agarosa al 1.5% y después secuenciados en el analizador genético ABI PRISM 3100- *Avant* (Applied-Biosystems), con un volumen total de 13.75 µl compuesto por: Formalmida (Hi-Di) 12.5 µl; Liz 0.25 µl (Liz 500) y Producto de PCR de 1-3 µl. Finalmente el tamaño de los alelos se observó en el programa Peak Scanner Software versión 1.0 (Applied Biosystems).

Tabla 18. Locus, secuencia del primer, motivos de repetición, tamaño en pares de bases, número de alelos, temperatura de alineamiento y especie en la cual amplificaron los 7 microsatélites desarrollados para *F. microphylla*.

Locus	Secuencia primer	Motivo	Tamaño (pb)	Ta (°C)	Especie
fus 47 F	TCGACCTCAATTCTCAATACC	(TC)19	174-224	61	Fm, Ft*
fus 47 R	TGAGATGGGCAAATAAAGA				
fus 48 F	TGGTTTTATGTGTGAAATGGA	(TG)9	117-121	60	Fm, Ft
fus 48 R	ACTTAGGCGGATCACAAAAC				
fus 27 F	CACTGGAAGAGAAAGGGAAA	(AG)23	122-176	60	Fm, Ft
fus 27 R	GGTGATGAATTCTGTCTTTGC				
fus 35 F	TGGATTTTTGGATGAAGTTGC	(GT)13	129	60	Fm, Ft
fus 35 R	TCACGCAATCGTCTCTCACT				
fus 52 F	CCTGCCATAACCTCTGTCATC	(TG)9	191-197	60	Fm, Ft
fus 52 R	TTGCATTGAAATTCTTAGCTTGA				
fus 31 F	GGGAACCCGATTTTCATTCT	(TGA)9	126-159	62	Fm
fus 31 R	TCTTCTTGGGGACCTTGATG				
fus 33 F	GGGAAGACCACCATTTTCCT	(GA)21	185-225	60	Fm
fus 33 R	ACCCGAACTTTCACCTCCTT				

* No amplificó correctamente en todos los individuos; Fm, *F. microphylla*; Ft, *F. thymifolia*; Ta, Temperatura de alineamiento.

Tabla 19. Parámetros de diversidad de 7 microsatélites para cuatro poblaciones de *F. microphylla*.

Población	Alopátricas						Simpátricas					
	Desierto de los Leones (n=20)			Cerro Burro (n=20)			Amecameca (n=20)			Garnica (n=20)		
Locus	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He	Na	Ho	He
fus47	2	0.05	0.05	9	0.70	0.79	5	0.35	0.50	7	0.33	0.66
fus52	3	0.20	0.65	1	0.00	0.00	1	0.00	0.00	2	0.25	0.22
fus31	6	0.67	0.69	2	0.37	0.45	3	0.37	0.39	3	0.20	0.40
fus33	7	0.65	0.70	12	0.90	0.85	7	1.00	0.70	8	0.78	0.84
fus27	7	0.80	0.71	8	0.80	0.73	10	0.85	0.85	5	0.70	0.60
fus48	2						monomórfico					
fus35	1						monomórfico					

Na, número de alelos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada.

Algunos parámetros de diversidad genética como el número de alelos, la heterocigosidad observada y esperada fueron calculados en GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012; Tabla 19) para 80 individuos provenientes de cuatro diferentes poblaciones. El número de alelos va

de 1 a 12, la He de 0.05 a 0.85 y la Ho de 0.05 a 1. Solamente cinco microsatélites fueron polimórficos para los 80 individuos, los otros dos son monomórficos. Por lo tanto, se han desarrollado 5 microsatélites polimórficos para *F. microphylla* que pueden ayudar en futuros estudios genéticos.

Referencias

- Álvarez, B. A. 2012. **Aislamiento reproductivo entre *Fuchsia microphylla* y *F. thymifolia* (ONAGRACEAE), dos especies simpátricas.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Arroyo M.T.K. and P.H. Raven. 1975. **The evolution of subdioecy in morphologically gynodioecious species of *Fuchsia* section *Encliandra* (Onagraceae).** *Evolution* 29: 500-511.
- Berry, P. E., W. J. Hahn, K. J. Sytsma, J. C. Hall and A. Mast. 2004. **Phylogenetic relationships and biogeography of *Fuchsia* (Onagraceae) based on noncoding nuclear and chloroplast DNA data.** *American Journal of Botany* 91(4): 601–614.
- Breedlove, D.E. 1969. **The systematic of *Fuchsia* section *Encliandra* (Onagraceae).** University California Publisher Botany, 53: 1-69.
- Talluri, R. S. 2009. **Advances in interspecific hybridization in *Fuchsia*.** *International Journal Agriculture and Cop Sciences*. Vol., 1(1), 14-20.
- Talluri, R. S. 2012. **Barriers to gene flow in interspecific hybridization in *Fuchsia* L. (Onagraceae).** *Journal of Genetics*, Vol. 91, N° 1.
- Peakall, R. and Smouse P.E. 2012. **GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update.** *Bioinformatics* 28, 2537---2539.

ANEXO 2: MÉTODO DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

Hojas: a las fotografías originales se les colocaron dos landmarks de referencia (Fig. 2b) uno en la base de la lámina y otro en el ápice de la hoja para construir un “Fan” (abanico) con el programa MakeFan6, este se conformaba por 30 líneas radiales con igual espacio angular que cubría todo el contorno de las hojas (Circle 1-2 de acuerdo al programa). Cada una de estas líneas fue utilizada en el programa tpsdig2 para digitalizar un total de 28 semilandmarks, dos landmarks, y dos puntos extras fueron agregados sobre la regla de referencia. En seguida, se utilizó el programa CoordGen6f.exe para obtener un archivo en formato TPS ya con formato de coordenadas X1Y1 usando el Procrustes Superimpositioning (PB), el cual, finalmente fue introducido en el programa AVCGen7 donde se utilizó el método de Análisis de Variantes Canónicas para conocer cuántos ejes AVC son necesarios para formar dos o más grupos en la muestra.

Para el procesamiento de las fotografías de las flores se siguió el mismo método que con las hojas, la única diferencia es el tipo de fan que se construyó para cada uno.

Pétalos: se colocó un landmark en el ápice de uno de los cuatro pétalos y otro en la base del pétalo para realizar un abanico con 12 líneas radiales con igual espacio angular que cubría todo el contorno del pétalo (Fig. 2e, nombrado en el programa como Circle 1→2) y a partir de estas se le colocaron 12 puntos, de los cuales dos eran landmarks y diez semilandmarks, señalados en la Figura 2f.

Sépalos: se creó el “abanico comb 1→2” en un sépalo por flor a partir de un landmark en el ápice del sépalo y otro en la parte media de la base del sépalo formado por 5 líneas. Y se

colocaron 7 puntos (seis semilandmarks y un landmarks) uno en la línea 0 y dos en las líneas 1,2 y 3 tal como se observa en la Figura 2h.

Tubos florales: se elaboró el “abanico comb 1→2” a partir de dos landmarks, uno en la base del ovario y otro en la parte media donde finaliza el tubo floral, con estos se construyeron 14 líneas verticales que cortaban al tubo en secciones iguales (Fig. 2j), después los semilandmarks se colocaron de la siguiente manera: tres en la línea 0 y dos en las líneas 1,2,3,5,7,9,11 y 13 haciendo un total de 19 representado en la Figura 2k.

En cada una de las secciones descritas tanto para las flores como para las hojas se agregaron dos puntos extras sobre el papel milimétrico o regla referenciando un centímetro de longitud.