



**ESTUDIO DE LAS POSIBILIDADES DE HIBRIDACIÓN EN EL GENERO *PRUNUS*
L. PARA LA MEJORA GENETICA DE PATRONES.**

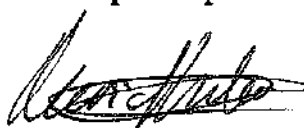


M^a JOSE RUBIO CABETAS

UNIVERSIDAD DE LLEIDA

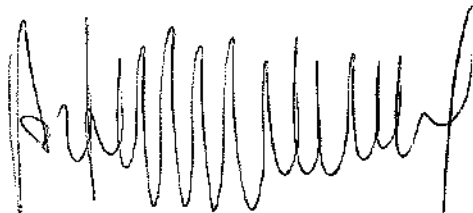
**ESTUDIO DE LAS POSIBILIDADES DE HIBRIDACIÓN EN EL GENERO *PRUNUS*
L. PARA LA MEJORA GENETICA DE PATRONES.**

Memoria que presenta la Licenciada en
Ciencias Biológicas M^a José Rubio Cabetas
para aspirar al Grado de Doctor.



Fdo. M^a José Rubio Cabetas

V^o B^o DIRECTOR DEL TRABAJO



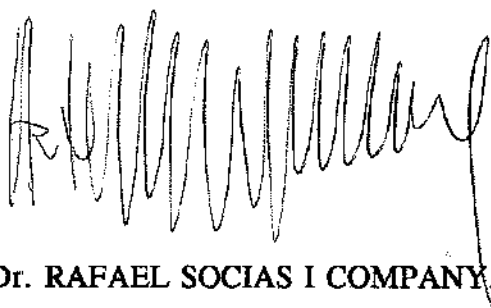
Fdo. Dr. Rafael Socias I Company



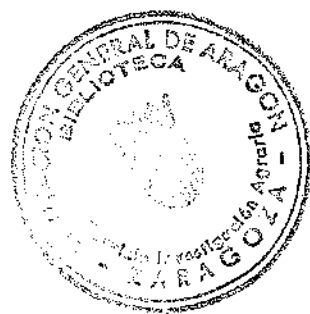
El presenta trabajo: "ESTUDIO DE LAS POSIBILIDADES DE HIBRIDACIÓN EN EL GENERO *PRUNUS* L. PARA LA MEJORA GENETICA DE PATRONES" que presenta M^a José Rubio Cabetas para aspirar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección, en la Unidad de Fruticultura del Servicio de Investigación Agraria de la D.G.A. (Zaragoza).

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

Zaragoza, Mayo 1993.



Dr. RAFAEL SOCIAS I COMPANY
Investigador del S.I.A. (D.G.A.)



*A mis padres Pilar y Leopoldo,
por su apoyo constante.*

*A Jacinto, Luis y M^a José de Ben
por su confianza.*



Agradecimientos:

Al Dr. D. Rafael Socías i Company, por su labor de dirección y ayuda prestada en la realización de esta tesis.

Al Ministerio de Educación y Ciencia y al Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón que han financiado esta tesis, y especialmente a la Unidad de Fruticultura, donde se ha realizado todo el trabajo.

Al Dr. D. Valero Urbina por su labor de tutoria.

Un agradecimiento especial al Dr. D. Antonio J. Felipe por su interés y apoyo en todo el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Maria Herrero, por sus acertados comentarios, así como a todo el personal de la Unidad de Fruticultura, que en las diferentes fases del desarrollo de este trabajo han contribuido de forma especial a él. Especialmente a mis compañeras becarias: Rosario, Esther, Pilar y a las chicas solidarias en los momentos críticos de la primavera: Isabel, Rosa, M^a Cruz, Olga, o que en algún momento con su experiencia han hecho el trabajo más llevadero: Pilar, Amalia, Teresa y Reyes, así como a Pilar B. Sin olvidar por ello a personas de otras unidades que han colaborado y apoyado de forma especial, Rosa, Juan e Ignacio.

Un agradecimiento especial al personal del Instituto Agronómico Mediterraneo que contribuyó en la formación desde el principio y durante toda esta andadura científica; y especialmente a Manoli y Maite por su ayuda prestada.

Por ultimo, y no así menos importante, a mis hermanos y amigos, que en los últimos momentos han soportado la impaciencia, neuras y con su soliralidad y ánimo han hecho posible que esto llegara a su fin.





RESUMEN



RESUMEN

Con el objeto de estudiar la posibilidades de hibridación dentro del género *Prunus* L. se plantearon una serie de cruzamientos entre distintas especies de este género. Con ello se pretenden establecer las relaciones de compatibilidad y las relaciones genéticas entre estas especies con el fin de conocer los cruzamientos que se podrían plantear con mayor facilidad para obtener patrones frutales híbridos, los cuales, al reunir las buenas características que se encuentran dispersos entre los distintos parentales, serían capaces de resolver una serie de problemas de adaptación a suelos diversos que plantea el cultivo de los frutales de hueso. Para ello se han utilizado clones de especies que actualmente se utilizan como patrones o están en proceso de selección, así como especies que podrían aportar algún carácter interesante desde el punto de vista de la mejora genética para los patrones frutales.

Se realizaron polinizaciones tanto en laboratorio como en campo de una serie de cruzamientos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, para establecer el nivel al cual se podría manifestar la incompatibilidad en cada caso. El estudio se realizó en cuatro fases, con el fin de determinar los procesos en los que se establecen las barreras a la hibridación, ya sea antes de la fecundación (barreras prezigóticas) o por el contrario después de la fecundación (barreras postzigóticas).

La primera fase fue la observación con microscopía de fluorescencia del crecimiento de los tubos polínicos en cruzamientos realizados en laboratorio a dos temperaturas controladas de 12 y 22° C. Se estableció la velocidad de crecimiento y la distancia recorrida por los tubos polínicos hasta la base del estilo tanto en los cruzamientos intraespecíficos como en los interespecíficos.

La segunda fase fue el estudio mediante técnicas de histoquímica del proceso detallado de la fecundación para determinar el día en que ésta tiene lugar. Este estudio se limitó a cuatro cruzamientos, dos intraespecíficos y dos interespecíficos, en los que se estableció el crecimiento del tubo polínico en los tejidos del ovario y la entrada de éstos en el óvulo,

Resumen

haciendo referencia al tiempo aproximado en que tiene lugar la fecundación porque se haya observado la entrada del tubo polínico en la nucela, o por el contrario, por constatar la incompatibilidad de la polinización al observar su detención a nivel del ovario.

Debido a los bajos niveles de cuajado que se obtienen habitualmente en los cruzamientos interespecíficos, se hizo un ensayo de cultivo de óvulos "in vitro", con el objeto de recuperar en el subsiguiente subcultivo del embrión aislado un mayor número de embriones híbridos. Para ello se estudió el estado del óvulo en el momento en que se realizó el cultivo "in vitro" y se determinó el porcentaje de fecundación en todos los cruzamientos mediante la técnica del aclareo de óvulos que permite una observación más rápida y de un número de muestras mayor a las que se pueden realizar mediante las técnicas de histoquímica. También se estableció el porcentaje de degeneración de los óvulos al observarse depósitos de callosa en la calaza, lo que indica el inicio de la degeneración del óvulo, para poder evaluar los resultados obtenidos en el cultivo "in vitro". Sólo se pudo recuperar un porcentaje muy pequeño de embriones cultivados "in vitro" en un cruzamiento intraespecífico, poniéndose de manifiesto la variabilidad en la respuesta al cultivo "in vitro" según el tipo de cruzamiento. En la mayoría de los cruzamientos se observó la formación de callo, tanto en los cruzamientos en los que se había producido la fecundación del óvulo como en los que no se tuvo evidencia de la presencia de endospermo ni embrión como prueba de la fecundación.

Por último en los cruzamientos realizados en campo se estableció el nivel de cuajado en los cruzamientos que resultaron compatibles y los niveles de caída de frutos en las flores polinizadas y no polinizadas para ver las diferencias debidas a la polinización.

Con estos resultados se ha establecido la compatibilidad en los cruzamientos intraespecíficos, así como en algunas hibridaciones, incluso en algunas de especies de diferentes subgéneros. Las condiciones ambientales y el estado de la planta madre son determinantes para el éxito de los cruzamientos. El cultivo "in vitro" para la recuperación de embriones híbridos requiere la profundización de los requisitos específicos para cada tipo de planta madre.

SUMMARY



SUMMARY

A series of crosses among different species of the genus *Prunus* L. was planned to study the possibilities of hybridization inside this genus. The objective was to establish the compatibility and genetic relations among these species in order to know which crosses could be more easily made to obtain new fruit hybrid rootstocks, which, gathering in one clone the good traits dispersed among different parents, would be able to solve some of the soil adaptation problems of stone fruits. This has induced the inclusion as parents of several clones used as rootstocks or being selected at present, as well as other species which could contribute with some useful traits in a rootstock breeding program.

Both intra and interspecific pollinations in the field and in the laboratory were made to establish the level at which incompatibility could be evinced in each case. The study was made at four stages to follow the steps at which the hybridization barriers could act, either before fertilization (pre-zygotic barriers) or after fertilization (post-zygotic barriers).

The first stage was the study of pollen tube growth in laboratory crosses at two constant temperatures of 12° C and 22°C. The observations by fluorescent microscopy allowed to establish the rate of pollen tube growth and the extent of style traversed by pollen tubes until their arrival at the style base.

The second stage was the study of the detailed process of fertilization by histochemical techniques to establish the day when fertilization occurs. This study was limited to four crosses, two intraspecific and two interspecific, where pollen tube growth in the ovary and its entry into the ovule was followed. The time of fertilization was determined by the entrance of the pollen tubes into the nucellus or incompatibility was assessed when the pollen tubes stopped in the ovary.

"In vitro" ovule culture was assayed to recover a higher number of hybrid embryos due to the low level of fruit set usually obtained in interspecific crosses. The state of the ovule at the

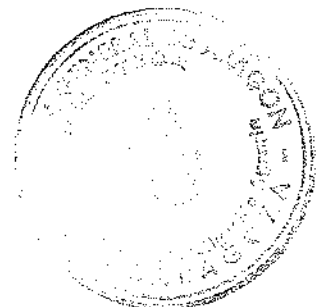
Summary

right moment of its "in vitro" culture was determined. The percentage of fertilization was assessed in all crosses by the ovule clearing technique, which allows a quicker observation of a higher number of samples than with the histochemical techniques. The percentage of ovule degeneration was established by the observation of callose deposits at the chalaza end, as an indication of this degeneration, in order to evaluate the results of "in vitro" culture. A low percentage of embryos was recovered from "in vitro" culture in a single intraspecific cross, showing the high variability of responses to "in vitro" culture according to the type of cross. Callus formation was observed in most crosses, both in those where fertilization was assessed and in those where neither endosperm nor embryo was observed.

Fruit set was measured in the field for compatible crosses. The different patterns of fruit drop were observed both in pollinated and unpollinated flowers to establish the differences due to pollination.

These results allow to establish the compatibility of the intraspecific crosses as well as of some hybridizations, including one between species from different subgenera. The environmental conditions and the plant status are of paramount importance to be successful in the crosses. "In vitro" culture to rescue hybrid embryos require more deepening of the specific requirements for each type of mother plant.

INTRODUCCION GENERAL



INTRODUCCION GENERAL.

I. PATRONES FRUTALES

El árbol frutal consta generalmente de dos partes, el patrón y la variedad, cumpliendo cada una de ellas un papel crucial en la producción frutal. Sin embargo, estas dos partes reciben una atención diferente, siendo la variedad la parte más conocida, especialmente a través del consumo de sus frutos, que la caracterizan. El patrón es el soporte material de la variedad y le suministra los nutrientes del suelo, pero no trasciende de los límites de la plantación frutal, aunque en ella cumple una función básica.

La propagación de los árboles frutales, y en concreto de los patrones, se realiza de dos formas diferentes. Una forma es la sexual, por medio de la siembra de semillas, de la cual derivan los patrones denominados francos, y la otra es la vía asexual o vegetativa, mediante el enraizamiento de las partes vegetativas de la planta, como son trozos de ramas, raíces, etc. Existen diversos procedimientos para lograr partes enraizadas de una planta: estaquillas, acodos, etc. A los patrones así obtenidos, cuando son procedentes de una sola planta inicial, se les denomina patrones clonales.

El uso de patrones en el cultivo frutal viene obligado por la dificultad de enraizamiento de la mayoría de las variedades, por lo que para su multiplicación vegetativa clonal se requiere el injerto sobre otro pie. El injerto se hizo imprescindible para mantener las buenas variedades, ya que rápidamente los agricultores de hace más de 2000 años se dieron cuenta de que las buenas características de una variedad no se conservaban en las plantas que nacían de la siembra de sus semillas. Así se empezó por injertar los árboles de semilla que presentaban alguna deficiencia con varetas de árboles vecinos satisfactorios. Posteriormente se generalizó el injerto para mantener de forma comercial estos genotipos destacados. Así Columela en el siglo I de nuestra era describe ya varios tipos de injerto.

El uso de los patrones francos ha sido el tradicional en la fruticultura pues son en general

más baratos y más fáciles de obtener. Por otra parte no todas las especies permiten una propagación vegetativa asequible. Sin embargo, varios factores se han aunado para favorecer el uso de patrones clonales frente a los francos en casi todas las especies, como son el excesivo vigor inducido en general por los francos, el avance en las técnicas de propagación, y la falta de homogeneidad de los francos. Ello hace que cada vez se utilicen más los patrones clonales.

Dentro de los patrones clonales está surgiendo un grupo de especial interés, como es el de los híbridos, fundamentalmente en el campo de los frutales de hueso. Muy conocido en este grupo es el de los híbridos almendro x melocotonero, que llevan ya bastantes años de uso satisfactorio y en superficies importantes tanto para el almendro como para el melocotonero.

Los frutales de hueso forman parte del género *Prunus* L. Con la diversidad de las especies que constituyen los frutales de hueso, este género probablemente representa el conjunto más importante de la fruticultura. La capacidad de cruzamiento de todas ellas es todavía poco conocido, pero se tienen ya algunas experiencias en determinados cruzamientos, tanto espontáneos como artificiales, de los que se han obtenido descendencias que están ya siendo utilizadas como patrones.

L1. DISTRIBUCION DE PATRONES.

De los 20,5 millones de hectáreas que España dedica a los distintos cultivos, algo más de 270.000 Has. se destinan a especies leñosas productoras de fruta dulce (PUERTA, 1984), de las cuales 101.092 corresponden a especies de hueso, lo que supone un 37,3 % de toda la producción de fruta dulce. Entre los frutos secos, aproximadamente unas 615.000 Has. están destinadas al cultivo del almendro, lo que supone un 3.04% del total destinado a los distintos cultivos (M.A.P.A. 1989).

PATRONES DE MELOCOTONERO	Has.	%
Francos de melocotonero	34.985	62.3
Pollizos y otros ciruelos	13.800	24.6
Francos de almendro	4.100	7.3
Híbridos almendro x melocotonero	2.380	4.2
Sin identificar y otros	910	1.6
TOTAL	56.175	100.0

FUENTE: CARRERA (1987).

PATRONES DE ALBARICOQUERO	Has.	%
Francos de albaricoquero	8.345	53.6
Ciruelos	6.300	40.5
Francos de almendro	677	4.4
Sin identificar y otros	237	1.5
TOTAL	15.559*	100.0

FUENTE: PUERTA (1984).

* En el momento actual esta superficie es de unas 22.100 Has. (FELIPE, 1991)

PATRONES DE CIRUELO	Has.	%
Mirobolan	5.462	41.8
Pollizos	3.140	24.0
Franco de almendro	2.950	22.6
Franco de albaricoquero	430	3.3
Otros ciruelos	728	5.6
Sin identificar y otros	351	2.7
TOTAL	13.061*	100.0

FUENTE: PUERTA (1984).

* En el momento actual esta superficie es de unas 19.500 Has. (FELIPE, 1991)

PATRONES DE CEREZO	Has.	%
Rebollo	7.470	47.8
Prunus mahaleb	6.551	41.9
Prunus avium	1.074	6.9
Otros	547	3.4
TOTAL	15.642	100.0

FUENTE: PUERTA (1984).

PATRONES DE ALMENDRO	Has.	%
Franco de almendro	623.000	99.68
Híbridos almendro x melocotonero	1.000	0.16
Otros y sin identificar	1.000	0.16
TOTAL	625.000	100.0

FUENTE: FELIPE, Comunicación personal.

I.2. SISTEMÁTICA. GÉNERO *PRUNUS* L.

El género *Prunus* L., forma parte de la subfamilia *Prunoidea* de la Familia *Rosaceae*. Este género comprende 77 especies, agrupadas en 5 subgéneros (REHDER, 1940). El número cromosómico base es $x=8$ y la ploidía dentro del género varía de $2x$ a $22x$. Los 5 subgéneros son:

- PRUNOPHORA* Focke
- CERASUS* Pers.
- AMYGDALUS* (L.) Focke
- PADUS* (Moench) Koehne
- LAUROCERASUS* Koehne

El subgénero *PRUNOPHORA* Koehne se divide a su vez en 3 secciones:

- Euprunus* Koehne (13 spp.)
- Prunocerasus* Koehne (15 spp.)
- Armeniaca* (Lam.) Koch (5 spp.)

El subgénero *CERASUS* Pers. incluye 7 secciones:

- Eucerasus* Koehne (3 spp.)
- Pseudocerasus* Koehne (14 spp.)
- Microcerasus* Webb (6 spp.)
- Lobopetalum* Koehne (2 spp.)
- Mahaleb* Focke (4 spp.)
- Phyllomahaleb* Koehne (2 spp.)
- Phyllocerasus* Koehne (1 spp.)

El subgénero *AMYGDALUS* (L.) Focke comprende 2 secciones:

- Euamygdalus* Schneid (15 spp.)
- Chamaeamygdalus* Focke (2 spp.)



Los subgéneros **PADUS** y **LAUROCERASUS** no tienen secciones y contienen especies más alejadas del conjunto de los frutales de hueso.

I.2.1. ESPECIES CULTIVADAS:

Las 10 especies que se cultivan para aprovechamiento de sus frutos, y por tanto las más extendidas y conocidas son:

- P. domestica* L. (ciruelo europeo)
- P. insititia* L. (pollizos, Damas y San Julián)
- P. cerasifera* Ehrh. (ciruelo mirobolán)
- P. salicina* Lindl. (ciruelo japonés)
- P. americana* Marsh. (ciruelo americano)
- P. armeniaca* L. (albaricoquero)
- P. persica* (L.) Batsch (melocotonero)
- P. amygdalus* Batsch (almendro)
- P. avium* L. (cerezo)
- P. cerasus* L. (guindo).

I.2.2. ESPECIES PATRON:

Dentro de este género son muchas las especies utilizadas como patrones. Consideraremos primero los patrones francos de todas las especies cultivadas, a continuación los patrones clonales y por último los híbridos interespecíficos, tanto francos como clonales.

Patrones francos:

- P. armeniaca*: albaricoquero
- P. amygdalus*: almendro
- P. domestica*: ciruelo

- P. cerasifera*: mirobolán
- P. avium*: cerezo
- P. mahaleb*: cerezo Santa Lucia
- P. cerasus*: guindo
- P. persica*: melocotonero

Dentro de los patrones francos se pueden distinguir los procedentes de mezcla de semillas de distinta procedencia, en general de la industria conservera, y los procedentes de variedades especialmente obtenidas y cultivadas para la obtención de semillas: INRA GF-305, Rubira, Lovell, Higama, Montclar, Siberian-C.

Patrones clonales:

- P. avium*: F-12/1, Pontaris, Pontaleb.
- P. mahaleb*: INRA-S.L. 64
- P. cerasus*: F-350, 'Stockton Morello', Mastro de Montañana, Vladimir.
- P. canescens*: Camil
- P. dawydensis*: Damil
- P. domestica*: Brompton, INRA-GF-43
- P. insititia*: San Julián-A, INRA.S.J.-655-2, Pixy, Pollizos de Murcia (Monpol, Montizo, Puebla de Soto-101-AD)
- P. cerasifera*: Mirobolan-B-E.M. Mirobolan 29-C.

Híbridos francos:

- P. davidiana* x *P. persica*: Nemaguard
- Nemaguard x *P. persica*: Nemared
- INRA San Julián nº 1 y nº 2

Híbridos clonales:

- P. incisa* x *P. serrulata*: 'Inmil'
- P. avium* x *P. mahaleb*: 'MaxMa', 'OCR'
- P. fruticosa* x *P. cerasus*: 'Oppenheim'

- P. avium* x *P. pseudocerasus*: 'Colt'
P. domestica x *P. spinosa*: Damas-1869
P. cerasifera x *P. salicina*: Mirobolan GF-31
P. cerasifera x *P. munsoniana*: Mariana-GF-8-1, Mariana-2624.
P. amygdalus x *P. persica*: INRA-GF-557, INRA-GF- 677, Adafuel, Hansen-2.168, Hansen-536.
P. cerasifera x *P. persica*: Yumir, Myran.
P. cerasifera x (*P. cerasifera* x *P. persica*): Ishtara
P. persica x *P. davidiana*: 'Cadaman' (Avimag).

II. INCOMPATIBILIDAD EN ANGIOSPERMAS.

II.1. AUTOINCOMPATIBILIDAD.

Muchas especies de Angiospermas no son capaces de producir semilla cuando son autopolinizadas mientras que sí las producen después de una polinización cruzada. Esto no se debe a ningún tipo de esterilidad masculina o femenina, sino simplemente a que el polen y el óvulo no se encuentran en la combinación adecuada (LEWIS, 1949b). SCOTT (1865) y EAST (1929) (citado por ARASU, 1968) ya hicieron referencia a este fenómeno, y llamaron al fracaso del polen en penetrar en el tejido estilar femenino, 'autoesterilidad' o 'esterilidad'. El término 'autoincompatibilidad' fue propuesto por STOUT (1917) y aunque EAST (1929) consideró este último término mas apropiado continuó haciendo referencia en sus publicaciones al término 'autoesterilidad' (ARASU, 1968). La 'autoincompatibilidad' puede ser definida como la incapacidad de una planta que produce gametos funcionales para producir semilla cuando es autopolinizada (BREWBAKER, 1957). KÖLREUTER (1764) fue el descubridor de la autoincompatibilidad en plantas en sus estudios con *Verbascum pheoniceum* (citado por ARASU, 1968). DARWIN (1876), estudió la autoincompatibilidad en 5 especies, señalando que la incompatibilidad es un mecanismo favorecedor de la alogamia para prevenir la fecundación cuando los dos elementos sexuales son idénticos (ARASU, 1968).

Este último término de **autoincompatibilidad** ha sido el más usado en la literatura hasta la actualidad (ARASU, 1968; DE NETANCOURTT, 1977; LEWIS, 1979; MULCAHY y MULCAHY, 1983; HARING *et al.*, 1990) para hacer referencia al control ejercido por los alelos del locus S de autoincompatibilidad, utilizándose el termino de **autoesterilidad** en un sentido más amplio de esterilidad debida a varias causas, ya sea por anormalidades cromosómicas por la producción de gametos no funcionales y por fallos después de la fecundación (ARASU, 1968; DE NETTANCOURT, 1977; PICKERSGILL, 1991).

La autoincompatibilidad en las Angiospermas puede ser fundamentalmente de dos tipos: **Heteromórfica**, asociada a diferencias en la estructura floral, como la longitud del estilo y el

nivel de las anteras; y **homomórfica** que no depende de la estructura floral (LEWIS, 1949b). La **heteromórfica** puede ser **distílica** con dos tipos de flores, uno con estilo corto y anteras altas y otro con pistilo largo y anteras cortas; o **tristílica** con tres tipos de flores, con estilo largo, medio o corto. Las primeras diferencias asociadas con la incompatibilidad heteromórfica fueron ya descritas por DARWIN (1877, citado por LEWIS, 1949b). El control genético es por un solo gen S con dos alelos en la distílica o por dos genes, con dos alelos cada uno en la tristílica. La reacción de incompatibilidad del polen está determinada solamente por el genotipo del tejido somático y no por el genotipo del grano de polen individual (LEWIS, 1949b).

En la autoincompatibilidad **homomórfica** existe un control genético que condiciona las reacciones de incompatibilidad y que fue descubierto independientemente por EAST y MANGELSDORF (1925) en *Nicotiana sanderae*, y por FILZER (1926) en *Veronica syriaca* (LEWIS, 1949b). Este control es por un gen simple, que tiene un número indeterminado de alelos diferentes $S_{1,2,3,\dots,n}$, que se encuentran y operan tanto en el grano de polen como en el estilo. PREEL (1921) ya adelantó una hipótesis de mecanismo oposicional, adoptando la terminología $O_{1,2,3,\dots,n}$, pero no tuvo mucha aceptación y fue el trabajo posterior de EAST y MANGELSDORF (1925) al que se reconoce como pionero de esta hipótesis (ARASU, 1968). El concepto básico de esta hipótesis de alelos oposicionales es que la incompatibilidad está gobernada por una serie de alelos, de manera que los tubos polínicos que posean un particular tipo de alelo crecen lentamente o se inhiben en los estilos que poseen el mismo tipo de alelo y crecen rápidamente en los que no (ARASU, 1968). Por el contrario, la hipótesis de mecanismo complementario, formulada posteriormente (BATEMAN, 1952), implica un sistema pasivo en el que los tubos incompatibles no pueden activarse o fracasan en la obtención de los nutrientes necesarios para su crecimiento.

PREEL, EAST y MANGELSDORF, proponen que la reacción de incompatibilidad del grano de polen está controlada por el alelo S del grano de polen, es decir, que la reacción de compatibilidad del polen viene determinada por el genotipo del gameto, por lo que cada grano de polen funciona como una unidad independiente dando lugar a la incompatibilidad **homomórfica gametofítica**. Por el contrario, existe otro grupo de plantas en la que la reacción de incompatibilidad del polen viene determinada por el genotipo S de la planta que lo produce,

por lo que son dos los alelos que determinan la posible compatibilidad de la polinización, dando lugar a la incompatibilidad **homomórfica esporofítica**. Este tipo de incompatibilidad fue descrita simultáneamente por GERSTEL (1950) y HUGHES y BABCOCK (1950) trabajando con *Parthenium argentatum* y *Crepis foetida* respectivamente (ARASU, 1968). Los dos alelos que intervienen en este tipo de reacción se hallan situados en el mismo locus. En trabajos posteriores mostraron este tipo de sistema en especies de *Cruciferae* y más familias (BATEMAN, 1954, 1955). Sin embargo el sistema más extendido es el sistema gametofítico con más de 60 familias de Angiospermas (CROWE, 1964; HARING *et al.*, 1990).

En algunas especies, como en las *Ranunculaceas*, este locus se ha duplicado, por lo que se complica el estudio de las posibilidades de polinización, agravado en estas especies porque puede haber dominancia de uno de los dos alelos sobre el otro. La única especie frutal importante con sistema de incompatibilidad esporofítica es el avellano (THOMPSON, 1979).

A pesar de haber sido ampliamente aceptada la hipótesis de la autoincompatibilidad en las Angiospermas, proponiendo de 1 a 4 locus de incompatibilidad multialélicos, recientes observaciones indican que puede haber muchos locus. Esto ha dado lugar al desarrollo de una última teoría de autoincompatibilidad como la del modelo de la heterosis (MULCAHY y MULCAHY, 1983), que propone que tanto el polen como el estilo poseen alelos diferentes, y habría interacciones heteróticas entre ellos, lo que incrementaría o no la tasa de crecimiento del tubo polínico.

CHARLESWOOD (1982, 1985) propuso que los dos sistemas de autoincompatibilidad, gametofítico y esporofítico, no tienen el mismo origen; estudios moleculares posteriores de las glicoproteínas asociadas a la autoincompatibilidad, muestran una composición diferente en uno y otro sistema (HARING *et al.*, 1990), lo que avalaría la hipótesis de que el origen es diferente.

II.2. INCOMPATIBILIDAD INTERESPECÍFICA.

Los cinco sistemas de incompatibilidad sexual en angiospermas, entre ellos la incompatibilidad interespecífica, difieren sustancialmente en su control fisiológico y genético (LEWIS Y CROWE, 1958).

DE NETTANCOURT (1977) define la incompatibilidad interespecífica como 'un proceso de post-polinización que previene que determinadas especies, bien sea por falta de germinación del grano de polen o bien por un comportamiento anormal de los tubos de polen, puedan formar cigotos híbridos que combinen los genomas de dos especies fértiles diferentes o de dos ecotipos fértiles. Este fenómeno previene el flujo de genes entre especies y en oposición a los mecanismos de la autoincompatibilidad que restringen la autogamia, establece la panmixia dentro de una población determinada. Así contribuye al aislamiento de las poblaciones y favorece la especiación y el incremento gradual del polimorfismo dentro de los géneros y las especies'.

Otros autores, como HOGENBOON (1973) prefieren hablar de incongruencia interespecífica, haciendo referencia a 'una ausencia de funcionamiento de la relación de pareja que resulta de la falta de información genética en uno de los dos individuos de la pareja sobre el otro, mientras que la incompatibilidad juega un papel secundario. La acción de la selección natural puede, directa o indirectamente, dirigir un cambio en uno de los individuos de la relación, resultando en una incongruencia entre los individuos de una subpoblación. Esta correspondencia genética en el otro individuo de la pareja bajo la presión de selección, puede ser dirigida a reparar la incongruencia'.

Por ello se concluye que la incompatibilidad y la incongruencia son dos fenómenos diferentes y que sólo el resultado final es similar, al inhibir en las angiospermas el crecimiento del tubo polínico o, posteriormente, la falta de formación de un cigoto híbrido.

No se han definido tipos de incompatibilidad interespecífica, sin embargo DE NETTANCOURT (1977) caracteriza ciertos tipos de incompatibilidad bajo tres criterios: 1) el estado de determinación, según que el modo de control sea gametofítico o esporofítico; 2) el

sitio de la expresión, ya sea porque el pistilo bloquea la germinación o el crecimiento del grano de polen y 3) la dependencia del sistema de reproducción, que a veces queda restringido a ciertas combinaciones.

Los sistemas de incompatibilidad suelen distribuirse en grupos taxonómicos. En general familias enteras manifiestan un único sistema de incompatibilidad, como ocurre en *Gramineas*, *Solanaceas* y *Rosaceas*, que poseen un sistema homomórfico gametofítico y en las *Crucíferas* y *Compuestas*, etc. que poseen un sistema homomórfico esporofítico (LEWIS y CROWE, 1958). Así la incompatibilidad interespecífica estaría bajo control esporofítico en las familias en las que la autoincompatibilidad es esporofítica y bajo control gametofítico en las familias con autoincompatibilidad gametofítica (DE NETTANCOURT, 1977). Existe evidencia de que el alelo S de incompatibilidad esporofítica puede operar también en el caso de cruzamientos interespecíficos como se ha observado en chopos (KNOX *et al.*, 1972), en los que presumiblemente la misma sustancia de reconocimiento que condiciona la autoincompatibilidad sea la que lo haga en la incompatibilidad interespecífica, con la posibilidad de que estas sustancias sean las proteínas de la pared del polen (KNOX *et al.*, 1972). En las especies de autoincompatibilidad gametofítica también hay alguna evidencia de que pueda estar gobernada por un alelo especial del locus S de autoincompatibilidad. Al menos en especies de las *Solanaceas*, como en *Nicotiana*, ambos tipos de incompatibilidad serían efectos pleiotrópicos del gen S (PANDEY, 1969, 1970) con dos reacciones diferentes: una reacción de especificidad primaria que controla la incompatibilidad interespecífica y una secundaria que controla la autoincompatibilidad (PANDEY, 1958). En *Lycopersicon* también se observó que el crecimiento del tubo polínico era bastante similar tanto en la autopolinización de especies autoincompatibles como en los cruzamientos incompatibles interespecíficos (DE NETTANCOURT *et al.*, 1973, 1974).

Otra teoría posterior reseñada por MARTIN (1961, 1968) propone que la incompatibilidad interespecífica estaría gobernada por el alelo S y uno o dos genes reguladores, señalando con ello que el alelo S no es el único responsable de la incompatibilidad.

Otros autores no están de acuerdo con la participación del locus de autoincompatibilidad

en la incompatibilidad interespecífica (HOGENBOOM, 1973), y proponen otra teoría que supone que dentro del pistilo habría genes barrera y dentro del polen genes penetración. Si los genes barrera y los genes penetración están presentes en correspondencia uno a uno el cruce es compatible; por otra parte, la falta de apareamiento o incompatibilidad se debería a la no correspondencia de los genes que gobiernan el proceso de germinación de polen, crecimiento del tubo polínico, fecundación, formación del endospermo y formación del embrión. Así serían los genes dominantes en el estilo los que aceptarían o rechazarían el polen extraño, aunque HOGENBOOM (1975), no especifica si este rechazo sería determinado gametofíticamente o esporofíticamente.

La incompatibilidad interespecífica se manifiesta generalmente por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estilo. Esta inhibición es estilar en las especies cuya autoincompatibilidad se expresa en el estilo y estigmática cuando la autoincompatibilidad se expresa en el estigma (DE NETTANCOURT, 1977). En observaciones hechas en *Solanaceas* la inhibición del tubo polínico en cruzamientos interespecíficos es más temprana y más marcada que la inhibición del propio polen (LEWIS y CROWE, 1958); en *Nicotiana* la inhibición parece ser más temprana y se considera como estigmática (PANDEY, 1968). Los primeros estudios de cruzamientos interespecíficos en este género entre una especie diploide y otra hexaploide mostraron que el polen de las especies hexaploides se detienen antes en el estilo de las especies diploides que en el caso contrario (ROY, 1938). KURSAKOW en sus trabajos de hibridación interespecífica en el género *Prunus* L. concluyó que cuando el crecimiento del tubo polínico es completo no se produce el aborto del embrión (KURSAKOW y DUBOVITSKAYA, 1971; KURSAKOW y SEDYSHEVA 1975). Sin embargo, no puede considerarse que éste sea el comportamiento general en los cruzamientos interespecíficos, ya que es muy frecuente que el tubo polínico alcance la base del estilo sin que por ello quede asegurada la fecundación (WILLIAMS *et al.*, 1982), lo que muestra que la incompatibilidad interespecífica es un problema más complejo.

LEWIS y CROWE, (1958) describieron la incompatibilidad interespecífica unilateral como el fenómeno básico y más común de la incompatibilidad interespecífica. En estos casos el polen de especies autocompatibles (SC) es inhibido en el estilo de especies autoincompatibles

(SI), pero no cuando el cruzamiento es recíproco. Señalan también que las excepciones a esta regla (SI x SC) de que el polen de las especies autocompatibles fuera rechazado en el pistilo de las autoincompatibles, serían especies que habrían mutado recientemente desde un sistema autoincompatible a otro autocompatible (Sc), mientras que en las especies que habrían sufrido esta mutación hace mucho tiempo (SC) seguirían esta regla.

Los autores contrarios a la implicación del locus S de autoincompatibilidad en la reacción interespecífica (HOGENBOOM, 1973, 1975), cuestionan la universalidad de esta regla, argumentando que la incompatibilidad unilateral también puede ocurrir entre especies autocompatibles (ABDALLA y HERMSEN, 1972, citado por DE NETTANCOURT, 1977) y entre poblaciones de especies autoincompatibles (PANDEY, 1962, 1968); e incluso en casos de polen de especies autoincompatibles creciendo en el pistilo de plantas autocompatibles (PANDEY, 1968, 1969). Sin embargo, es de señalar que en muchos de estos casos la incompatibilidad fue establecida por una falta de cuajado, no por un análisis detallado de la germinación y el crecimiento del tubo polínico (DE NETTANCOURT, 1977).

La autoincompatibilidad en el género *Prunus* es del tipo homomórfico gametofítico, controlada por el locus S (CRANE y LAWRENCE, 1929; LEWIS y CROWE, 1958). La incompatibilidad que se manifiesta en el caso de los cruzamientos interespecíficos no está clara, ya que no se puede asegurar que sea por efectos pleiotrópicos del gen S (PANDEY, 1958) o que se trate de incompatibilidad unilateral (LEWIS y CROWE, 1958) y tampoco que esta incompatibilidad venga determinada por los mismos alelos S que operan en el caso de la autoincompatibilidad (LEWIS, 1949b).

Los estudios en cruzamientos entre diferentes especies de este género parecen indicar que las relaciones de compatibilidad podrían venir determinadas por el fenómeno de la incompatibilidad unilateral (PEREZ y MOORE, 1985; LAYNE y SHERMAN, 1986; COYLE, 1982). Sin embargo, la función del alelo S puede ser o no la causa de la incapacidad de dos especies para cruzarse, ya que pueden estar implicados una multitud de factores: fallo en la germinación de polen, para lo cual es necesario conocer la calidad y cantidad necesaria para obtener el mayor número de frutos posibles (WEINBAUM *et al.*, 1986; CHAPARRO y

SHERMAN, 1988), la receptividad del estigma y el período efectivo de polinización (WILLIAMS, 1966), la interacción polen-pistilo (KNOX, 1984), el fallo en la fecundación debido a la longevidad del óvulo (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; PIMIENTA y POLITO, 1983) y finalmente el fallo en el desarrollo del embrión, caso en el cual sería mas conveniente hablar de esterilidad interespecífica (DE NETTANCOURT, 1977; LAYNE y SHERMAN, 1986).

II.3. HIBRIDACION INTERESPECIFICA.

En la naturaleza, las hibridaciones entre especies son un factor importante de evolución (BERNHARD, 1981). La hibridación interespecífica natural tiene una larga historia y se conocen casos prácticos. El hombre ha intentado en muchas ocasiones la obtención de híbridos, pero los métodos utilizados en las hibridaciones, durante largo tiempo aleatorios, sólo recientemente se han beneficiado de importantes progresos.

La comprensión de los mecanismos de la evolución, de los procesos de especiación y de las relaciones genéticas entre las especies hacen que la hibridación interespecífica sea un instrumento útil en la mejora genética vegetal, tanto en el campo de los cultivos herbáceos como en el de leñosos (CAUDERON, 1981).

Las primeras experiencias sobre hibridación experimental fueron en polinizaciones en maíz, descritas por CAMERARIUS (1694) en su tratado sobre la sexualidad en las plantas; y las primeras variedades de fresa de jardín fueron seleccionadas a partir de un cruzamiento interespecífico realizado hacia 1700 (citado por CAUDERON, 1981).

En el campo de los cultivos leñosos, los avances en materia de multiplicación vegetativa mediante el cultivo 'in vitro' de tejidos vegetales, iniciados en 1937 por GAUTHERET (BERNHARD, 1981), facilitan la utilización directa de las formas estériles que se obtienen por la hibridación de especies distintas. Ello ha contribuido a la utilización de la hibridación interespecífica por los mejoradores para transferir genes de una especie a otra, con el fin de

reunir determinadas características deseadas que faltan o no se expresan a nivel intraespecífico, tanto en los frutales de hueso (LAYNE y SHERMAN, 1986), como los frutales de pepita, *Pyrus* (BELL y HOUGH, 1986), y *Malus* (KORBAN, 1986). Así, con la obtención de híbridos interespecíficos se pueden conseguir individuos que aporten unas características que actualmente no se tienen al utilizar como patrones a clones pertenecientes a las especies puras cultivadas en uso (MEHLENBACHER, 1986).

Los híbridos interespecíficos se obtienen con mayor dificultad que los cruzamientos intraespecíficos, porque las barreras genéticas para la hibridación crecen con la distancia genética que separa a los parentales (LAYNE y SHERMAN, 1986). Las hibridaciones controladas entre especies estrechamente relacionadas tienen un alto grado de éxito, tanto en la obtención de semillas como en vigor de las plantas, mientras que especies más alejadas fallan en la hibridación, indicando que hay mecanismos que previenen la hibridación entre especies (ELLIS *et al.*, 1991).

Una vez conocida la naturaleza de tales mecanismos se pueden desarrollar métodos y técnicas especiales para romper las barreras y permitir la hibridación. Estas técnicas pueden ser desde la polinización 'in vitro' (ZENTKELER, 1990; VAN TUYL *et al.*, 1991), a la polinización de yemas (GRADZIEL y ROBINSON, 1991; BROWN *et al.*, 1991), y al cultivo 'in vitro' de óvulos (STEWART y HSU, 1978; ZHANG y LESPINASSE, 1988; BINO *et al.*, 1989; MATHIAS *et al.*, 1990). Incluso se puede conseguir la hibridación somática de especies leñosas sexualmente incompatibles (OCHATT *et al.*, 1987, 1989; GROSSER *et al.*, 1988).

La esterilidad total o parcial frecuente en los híbridos interespecíficos debido a la esterilidad femenina de las flores o a la incapacidad de producir polen viable no es óbice en el caso de la mejora de patrones (COYLE, 1982), ya que su reproducción clonal es vegetativa.

III. CRUZAMIENTOS INTERESPECIFICOS EN EL GENERO *PRUNUS* L.

Las hibridaciones entre especies pueden tener lugar espontáneamente en zonas donde las dos especies parentales crecen en proximidad; es el caso de ciertos híbridos naturales como los ya conocidos en el género *Prunus* de almendro x melocotonero (*P. amygdalus* x *P. persica*) en la zona mediterránea, de *P. cerasus* (*P. avium* x *P. fruticosa*) en el Sureste de Europa y del Damas de Toulouse (*P. domestica* x *P. spinosa*) en Francia (BERNHARD, 1981).

La obtención de híbridos artificiales puede permitir el estudio de la naturaleza específica probable de los padres de numerosos híbridos naturales, actualmente de ascendencia dudosa. Los híbridos interespecíficos F1 pueden manifestar una velocidad de crecimiento y un desarrollo superior a los de las especies parentales, pero no es una regla general: un mismo melocotonero polinizado por cinco variedades diferentes de almendro puede dar cuatro descendencias muy vigorosas y una muy débil (BERNHARD, 1981). Ciertas características, como una mayor aptitud a la rizogénesis, órganos más grandes (hojas, flores), no son quizás más que otro efecto general de la heterosis. El cruzamiento de 'Garfi' x 'Nemared' (*P. amygdalus* x *P. persica*) han dado tipos diversos en la F₁ (Felipe, comunicación personal).

La capacidad de cruzamiento entre las especies del género *Prunus* es todavía poco conocida, pero se tiene ya alguna experiencia en determinados cruzamientos de los que se han obtenido descendencias que están ya siendo utilizadas como patrones y se han puesto a disposición del sector productor de plantas, tanto procedentes de hibridaciones espontáneas como dirigidas entre distintas especies de este género.

En el género *Prunus* L., como en otros que existen series poliploides, los híbridos de ploidía impar (tri y pentaploide), producen menos frutos que los tetra y hexaploides, aunque hay que tener en cuenta si estos últimos son formas aloploides que puedan presentar un comportamiento diploide. Así estos poliploides tendrían la heterozigosis de un cruzamiento interespecífico unida a las ventajas fisiológicas inherentes a la poliploidización, debido a la supresión de factores letales recesivos y a la posesión de un número más grande de factores dominantes. Sin embargo, los resultados más favorables que demuestran el vigor híbrido han

sido obtenidos por cruzamientos diploides y no poliploides (BERNHARD, 1981).

III.1. Hibridaciones en el Subgénero *Amygdalus* (L.) Focke

El subgénero *Amygdalus* (L.) Focke comprende sus especies más conocidas en la sección *Euamygdalus*, en la cual se incluyen el melocotonero (*P. persica*) y especies relacionadas: *P. davidiana*, *P. ferganensis*, *P. kansuensis*, *P. andersoni*, *P. mira*, (HESSE, 1975) y el almendro (*P. amygdalus* Batsch), así como una gran gama de especies silvestres cercanas pertenecientes a algunas de estas especies: *P. fenzliana*, *P. argentea*, *P. ulmifolia*, *P. communis*, *P. nana*, *P. ledebouriana*, *P. georgica*, *P. petunnikowii*, (KESTER y ASAY, 1975).

Los híbridos almendro x melocotonero han sido muy estudiados y se han seleccionado varios clones, (BERNHARD, 1949; KESTER y HANSEN, 1966; CAMBRA, 1990). Es muy frecuente encontrar híbridos naturales dentro de estas dos especies por ser muy próximas, y que pueden ser originados por la polinización de una flor de almendro con polen de melocotonero o por la de una flor de melocotonero con polen de almendro (JONES, 1969). La semillas híbridas muestran mucha heterogeneidad en su comportamiento como patrones (FELIPE, 1989).

En hibridaciones artificiales, sin embargo, es más fácil lograr individuos procedentes de la polinización de flores de almendro con polen de melocotonero. Parece que la autoincompatibilidad del almendro facilita la aceptación del polen de otra especie (GRASSELLY y DAMAVANDY, 1974). El cruzamiento con melocotonero como receptor del polen es más viable si se utiliza una variedad androestéril, con necesidad, por tanto, de ser polinizado por otra variedad (GRASSELLY y DAMAVANDY, 1974; MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982).

Los primeros híbridos melocotonero x almendro fueron seleccionados en Francia a mediados de los años 40: 'GF-677' y 'GF-557' (BERNHARD, 1949). 'GF-557', es un híbrido obtenido por cruzamiento entre *P. amygdalus* y *P. persica* 'Shallil'; 'GF-677', es un híbrido

natural entre *P. persica* y *P. amygdalus*.

Un estudio llevado a cabo en estos dos híbridos (SALESSES, 1968) confirma la gran homología entre cromosomas de *P. persica* y *P. amygdalus*, observando y analizando la meiosis en los híbridos 'GF-557' y 'GF-677', en comparación con un híbrido de $4n = 32$ cromosomas, obtenido por tratamiento con colchicina.

Los híbridos interespecíficos F_1 muestran una cierta dominancia para algunas características de uno y otro parental, lo que da al conjunto de híbridos F_1 , independientemente de cuales sean las variedades de cada especie parental utilizada, una heterogeneidad relativamente reducida en comparación con las generaciones siguientes; los híbridos F_1 almendro x melocotonero suelen tener los estambres de tipo almendro y las hojas y flores de tipo melocotonero (BERNHARD, 1981). Estos híbridos se propagan vegetativamente, para mantener las características deseadas (FELIPE, 1989). La producción de semilla híbrida F_1 está limitada por la tasa de fecundación cruzada natural y la diferencia de floración entre las dos especies, aunque en California se ha desarrollado la obtención natural de híbridos de 'Titan', con plantaciones aisladas de este almendro, de floración muy tardía, coincidente con el melocotonero. Así los frutos de 'Titan', al ser autoincompatible, deben proceder de la polinización con el melocotonero (JONES, 1969). La producción y utilización de semillas híbridas F_2 no es recomendable por tener una heterogeneidad más marcada que en la F_1 (EGEA y BURGOS, 1991).

Otros híbridos seleccionados y patentados de almendro x melocotonero, se utilizan ya como patrones: 'Hansen 2168' y 'Hansen 536' (KESTER y ASAY, 1986). Estos también fueron seleccionados a partir de una población de plantas de un cruzamiento de Almendra B x melocotonero 1-8-2. La selección de melocotonero 1-8-2 fue originada de un cruce del cultivar 'Okinawa' x H91. Este cultivar H91 fue originado en una línea en la cual estaba implicada otra especie, *P. davidiana*.

Estos híbridos, conocidos desde hace algún tiempo como patrones para melocotonero, son actualmente considerados como unos de los mejores patrones para almendro (FELIPE,

1989), y pueden ser utilizados también como patrones de melocotonero, ciruelo y albaricoquero (FELIPE, 1990).

Parece ser que *P. davidiana*, una especie de melocotonero silvestre, con resistencia a clorosis y gran vigor, se cruza fácilmente con *P. persica* y con almendro. 'Nemaguard', seleccionado en California de entre plantas de semillas procedentes de Extremo Oriente (KESTER y GRASSELLY, 1983), se supone que es un híbrido entre *P. davidiana* y *P. persica*. Posteriormente se han realizado más cruzamientos, con el fin de seleccionar y utilizar la F_2 de semilla como patrones. Las dos especies son muy próximas y los individuos F_2 muestran una disyunción más débil que la F_2 de híbridos melocotonero x almendro, aunque el vigor híbrido de la F_1 es próximo al de la F_1 de melocotonero x almendro. Cuando el cruzamiento se ha realizado entre 'Nemaguard' x *P. davidiana* la descendencia es más homogénea (GRASSELLY y OLIVIER, 1988; PISANI y ROSELLI, 1983). A partir de 'Nemaguard', se han seleccionado nuevos patrones, como 'Nemared', seleccionado de plántulas F_2 de 'Nemaguard' x melocotonero de hoja roja (RAMMING y TANNER, 1983).

Una mayor distancia genética entre las especies de melocotonero y almendro se pone de manifiesto cuando se analiza la descendencia de cruzamientos entre *P. davidiana* x *P. amygdalus*, ya que la F_2 muestra mayor disyunción que la de *P. davidiana* x *P. persica* (GRASSELLY y OLIVIER, 1988).

Con *P. kansuensis*, otra especie de melocotonero, se han obtenido buenos resultados, con gran vigor híbrido, en el cruzamiento con *P. persica* (BERNHARD, 1962; HESSE, 1975; GRASSELLY y OLIVIER, 1987). Otros híbridos están en estudio de los que se pueden citar *P. persica* x *P. mira* (GRASSELLY y OLIVIER, 1988).

Otra especie silvestre implicada en hibridaciones dentro de este subgénero es *P. webbii* una especie de almendro silvestre que se puede utilizar como patrón para el almendro en terrenos calizos. De esta especie se ha obtenido un patrón por hibridación con una especie de melocotonero silvestre de maduración tardía que se utiliza como patrón de melocotonero (VLASIC, 1977).

III.2. Hibridaciones en el Subgénero *Prunophora* Focke.

El subgénero *Prunophora* es sin duda el más amplio del género *Prunus*, y el que encierra mayor variabilidad, ya que incluye todos los ciruelos europeos, japoneses, mirobolanes y el albaricoquero.

Las especies más estudiadas pertenecen a la sección *Euprunus* (ciruelos y mirobolán) con distintos grados de ploidía; diploides: *P. cerasifera* y *P. salicina*; tetraploide: *P. spinosa*; y hexaploides: *P. domestica* y *P. insititia*. La sección *Armeniaca*, generalmente diploide, incluye *P. armeniaca* (albaricoquero) y especies relacionadas: *P. brigantiaca*, *P. ansu*, *P. mume*, *P. sibirica*, *P. dasycarpa*; éste último considerado híbrido natural entre *P. armeniaca* y *P. cerasifera* (BAILEY y HOUGH, 1975).

De acuerdo con la hipótesis de CRANE y LAWRENCE (1931) los ciruelos hexaploides cultivados serían anfiploides entre *P. spinosa* (4x) y *P. cerasifera* (2x), existiendo relaciones de homología entre las especies hexaploides de una parte y de *P. spinosa* y *P. cerasifera* por otra. Estudios citogenéticos de híbridos interespecíficos permitieron estudiar la homología de especies tetra y hexaploides (SALESSES, 1973). Esta hipótesis ha sido ampliamente aceptada por los evolucionistas y fruticultores (WEINBERGER, 1975; WATKINS, 1979). SALESSES (1977a), sin embargo, cuestionó la participación de *P. spinosa* en la génesis de las especies hexaploides basándose en sus estudios citológicos (SALESSES, 1973) que muestran la homología entre los genomas de *P. spinosa* y *P. cerasifera*, y esta teoría ha sido reforzada por comparación de RFLPs de *P. spinosa* y *P. cerasifera* (REYNDERS y SALESSES, 1990). Sin embargo esta teoría no está ampliamente aceptada y recientemente, ZOHARY (1992), vuelve a cuestionar la participación de *P. spinosa* en la génesis de *P. domestica*, sugiriendo que se habrían originado directamente de *P. cerasifera*.

Otros híbridos realizados artificialmente, han sido estudiados en este subgénero mostrando las homologías cromosómicas (SALESSES, 1977b):

Híbridos triploides:

P. spinosa (4x) x *P. cerasifera* y *P. salicina* (2x)

P. domestica y *P. insititia* (6x) x *P. spinosa* (4x)

Híbridos pentaploides:

P. domestica y *P. insititia* (6x) x *P. spinosa* (4x)

Híbridos hexaploides:

P. domestica x *P. insititia* (6x)

Su comportamiento es parecido al de las dos especies consideradas como aloploidoides. La cercanía entre estas dos especies viene confirmada por el hecho de que botánicamente no está totalmente definido si *P. insititia* es una especie independiente o una subespecie de *P. domestica*.

Híbridos diploides:

P. cerasifera x *P. salicina* (2x)

Estos híbridos tienen un comportamiento regular y fertilidad normal, lo cual prueba alguna homología entre los dos genomas.

Algunos patrones ya comercializados desde hace varios años tienen todavía un origen impreciso; es el caso de 'INRA GF 8-1' y 'INRA GF 1869', (SALESSES, 1981).

'INRA GF 8-1' o 'Mariana GF-8-1': es un híbrido triploide de origen controvertido. Parece cierto que el ciruelo diploide (2x) 'Mariana' es su parental femenino, ya que la fecundación libre de este ciruelo 'Mariana' da una descendencia muy heterogénea, de ploidía variable, lo cual podría hacer aparecer el triploide (3x) 'Mariana GF-8-1' (SALESSES, 1977a). Se han propuesto varias hipótesis para su origen: *P. cerasifera* x *P. hortulana* o *P. angustifolia*, *P. cerasifera* x *P. munsoniana*, *P. cerasifera* x *P. injuncunda*. Estos tres orígenes posibles son citados por SALESSES, (1977a) quien propone otras dos hipótesis, teniendo en cuenta al diploide 'Mariana' como parental femenino: 'Mariana' (2x) x *P. cerasifera* (2x) no reducido y 'Mariana' no reducido x *P. cerasifera* (2x) normal. La segunda hipótesis parece más razonable, habida cuenta de la predominancia de caracteres del 'Mariana' (2x) en el híbrido triploide (3x).

'INRA GF 1869' o 'Damas 1869': es un híbrido pentaploide, que podría resultar de las

hibridaciones siguientes: ciruelo hexaploide (*domestica* o *insititia*) x *P. spinosa* (4x); ciruelo hexaploide x *P. cerasifera* (2x) no reducido y *P. spinosa* (4x) no reducido x *P. cerasifera*. Las dos hipótesis últimas parecen menos plausibles por el hecho de intervenir gametos no reducidos, hecho menos frecuente (SALESSES, 1973).

Estos dos patrones se utilizan para variedades de ciruelo europeo, con algunas excepciones, para ciruelo japonés y en el caso de 'Damas 1869' es compatible con muchas variedades de melocotonero (FELIPE, 1989).

La genética de la incompatibilidad del melocotonero en el caso de injerto sobre 'Damas de Toulouse' es de los pocos casos conocidos en este género. Así el comportamiento de diversas variedades de melocotonero, está en dependencia de dos genes, aparentemente independientes, llamados I_1 e I_2 . El modo de acción es tal que toda variedad que posee al menos dos alelos dominantes I_1 o I_2 , es incompatible con 'Damas de Toulouse 1869' (SALESSES *et al.*, 1988).

Híbridos espontáneos entre *P. cerasifera* y *P. armeniaca* han sido descritos en la literatura (KNIGHT, 1969) y de algunos de ellos se comercializan sus frutos, como es el caso del albaricoquero púrpura o *P. dasycarpa* (REHDER, 1990). Desde entonces se han obtenido y estudiado cruzamientos entre estas dos especies (RAMMING, 1976), hasta que se han llegado a seleccionar de una población de híbridos entre un mirobolán y el albaricoquero 'NJAI' plantas que han dado frutos y que se han comercializado con el nombre de 'Plumcot' (MUSACCHI, 1992).

Los cruzamientos de *P. armeniaca* x *P. cerasifera* o *P. salicina*, con *P. armeniaca* como parental femenino, son viables (BAILEY y HOUGH, 1975) al igual que *P. salicina* x *P. armeniaca* (RAMMING, 1976). Generalmente los cruzamientos en los que *P. cerasifera* es la receptora del polen suelen dar mejores resultados (GRASSELLY y OLIVIER, 1988). Híbridos interespecíficos resultantes del cruzamiento *P. salicina* Lindl. y *P. mume* Sieb. et Zucc. han dado plantas viables obtenidas por cultivo de embriones (KYOTANI y YOSHIDA, 1988).

Una especie silvestre de albaricoquero 'Chulli', utilizada como patrón para albaricoquero

y ciruelo (PARMAR y SHARMA, 1992), podría resultar interesante para ampliar la base genética de selección de caracteres interesantes debido a que es una especie resistente al frío y a la sequía.

Los cruzamientos interespecíficos entre *P. armeniaca* y otras especies, entre ellas especies del subgénero *Amygdalus*, han sido puestos de manifiesto (MEHLENBACHER *et al.*, 1990). Así, la cruzabilidad interespecífica no está restringida dentro de un subgénero, es decir, que el conjunto de especies del género *Prunus* son susceptibles de cruzarse, si no operan barreras genéticas insalvables. Cruzamientos intersubgenéricos son conocidos desde hace mucho tiempo, como *P. nigra* Aiton x *P. tenella* Batsch (= *P. nana* Stokes; almendro ruso) (CUMMING, 1963). Este híbrido resulta fértil y presenta caracteres de los dos parentales, ciruelo y almendro ruso, pero híbridos de *P. amygdalus* x ciruelos resultan estériles (BERNHARD, 1962).

Una posibilidad en la hibridación interespecífica es utilizar especies como puente genético para facilitar la transmisión de caracteres; *P. davidiana* podría considerarse como puente para transmitir caracteres al albaricoquero y viceversa; con *P. armeniaca* como receptor de polen y el híbrido *P. persica* x *P. davidiana* como donante, se obtienen plantas híbridas (BAILEY y HOUGH, 1975). Estos autores señalan que usar *P. davidiana* como puente podría ser bueno si se explotara la variabilidad genética en las especies de melocotonero.

El potencial de cruzamiento de *P. persica* fue puesto de manifiesto cuando se seleccionaron los primeros patrones de híbridos entre *P. cerasifera* y *P. persica*. Dos selecciones de este grupo son 'Myran' (Mirobolán x melocotonero Yunnan) e 'Ishtara' (Mirobolán x (Mirobolán x melocotonero)), patrones en un principio para melocotonero (BERNHARD, 1962; GRASSELLY y OLIVIER, 1987) y actualmente ensayados para almendro (GRASSELLY y OLIVIER, 1988; RENAUD *et al.*, 1988).

Igualmente las descendencias del cruzamiento de Mirobolán P.2032 x almendro se están estudiando como patrones para almendro. Las primeras selecciones de estos híbridos *P. cerasifera* x *P. amygdalus* fueron resultado de fecundación libre de mirobolán en medio de

parcelas de almendro. Estos resultan incompatibles como patrón para las variedades de almendro que son incompatibles con el ciruelo mirobolán (GRASSELLY y OLIVIER, 1988).

III.3. Hibridaciones en el Subgénero *Cerasus* Pers.

Los híbridos de *Prunus*, utilizados para la mejora de patrones de cerezo, incluyen cruces dentro y entre las dos secciones de cerezos: *Eucerasus* (E) y *Pseudocerasus* (P) (SCHMIDT y GRUPPE, 1988):

Eucerasus: *P. cerasus*, *P. fruticosa*; tetraploides (4x)
P. avium, *P. canescens*, *P. mahaleb*; diploides (2x)

Pseudocerasus: *P. concinna*, *P. incisa*, *P. nipponica*,
P. subhirtella, *P. pseudocerasus*; diploides (2x)

Los híbridos dentro de la sección *Eucerasus* pueden dar diferentes grados de ploidia:

Diploide: *P. avium* x *P. canescens*

Triploides: *P. avium* x *P. cerasus*

P. avium x *P. fruticosa*

P. canescens x *P. cerasus*

P. canescens x *P. fruticosa*

Tetraploide: *P. cerasus* x *P. fruticosa* y presumiblemente también *P. gondunii*, resultado de la polinización de *P. cerasus*, no reducido x *P. avium* (FOGLE, 1975).

En la sección *Pseudocerasus* la mayoría de los híbridos son diploides. También se han producido híbridos por cruzamientos entre las dos secciones; sin embargo la incongruencia polen-pistilo unilateral y bilateral a menudo inhibe la producción de fruto (SCHMIDT y GRUPPE, 1988).

La citología de este subgénero no ha sido bien estudiada, así como tampoco su comportamiento meiótico, aunque existen algunos híbridos utilizados como patrones. La mayoría de los híbridos producidos lo han sido por la polinización de tetraploides de *Eucerasus*

por especies de *Pseudocerasus*. Muchos de estos híbridos son triploides; algunos diploides proceden de cruces de *P. avium* con determinadas especies de *Pseudocerasus*.

El patrón de cerezo 'Santa Lucía-64' pertenece a la especie *P. mahaleb*, y fue seleccionado de una población de semillas en la estación francesa de la Gran Ferrade del INRA. La especie *P. fontanesiana* Schneid aparentemente es un híbrido de cerezo silvestre y *P. mahaleb*. También se han realizado cruzamientos que incluyen a ciruelos y cerezos del grupo de los guindos que dieron como resultado 'Nicollet' (*P. avium* x *P. pensylvanica*) x *P. besseyi*, híbrido estrechamente ligado al tipo *P. cerasus*, el cual polinizado con 'Nicollet' tiene algún potencial como patrón (FOGLE, 1975).

Los híbridos interespecíficos más recientes para ser utilizados como patrones son los que están siendo estudiados en la estación de Gembloux (Bélgica): 'Immil', seleccionado de plantas obtenidas del cruzamiento de *P. incisa* x *P. serrulata*, 'Camil', selección de *P. canescens*, y 'Damil', selección de *P. Dawyckensis*. Otros híbridos en estudio incluyen a los híbridos entre *P. avium* x *P. mahaleb* (clones OCR y MA x MA) y *P. fruticosa* x *P. cerasus* ('Oppenheim').

El patrón 'Colt' fue seleccionado de una serie de híbridos interespecíficos entre *P. avium* y *P. pseudocerasus*; de esta misma población se ha seleccionado más recientemente otro patrón, 'Cob'. Estos últimos híbridos son compatibles con variedades tanto de cerezo como de guindo. Una especie de la sección *Microcerasus*, *P. besseyi*, forma parte de la selección de híbridos BBX-1, obtenidos por cruzamiento con *P. salicina*, para la selección de patrones para albaricoquero (CUMMINS, 1985).

IV. OBJETIVOS GENERALES

El presente trabajo tiene por objetivo, en vista de los conocimientos y de las experiencias más recientes, el establecimiento de las relaciones genéticas existentes entre las especies del género *Prunus* L. para concretar las posibilidades de realizar hibridaciones interespecíficas entre ellas.

Establecidas las relaciones de compatibilidad entre las distintas especies se pueden conocer los cruzamientos que se podrían plantear con mayor facilidad para obtener nuevos patrones frutales híbridos. Estos nuevos patrones deberían añadir a su polivalencia las buenas características dispersas entre los distintos parentales para resolver los problemas de compatibilidad y adaptación a situaciones diversas que plantea el cultivo de los frutales de hueso.

Se ha planteado una serie de cruzamientos interesantes desde el punto de vista agronómico para dilucidar la naturaleza de la incompatibilidad que se pueda presentar al comparar cruzamientos intraespecíficos e hibridaciones. Igualmente se pretende determinar a qué nivel, prezigótico o postzigótico, esta incompatibilidad se pueda expresar en cada uno de ellos, así como las técnicas que podrían utilizarse para superar la incompatibilidad en los cruzamientos en los que se manifiesta.

V. MATERIAL VEGETAL.

Las especies objeto de estudio y los cruzamientos a realizar se eligieron con los siguientes criterios: igual número de cromosomas en las combinaciones (2x o 6x), clones de diferentes especies de *Prunus*, utilizados como patrones o que presenten gran potencial como tales por encontrarse en proceso de selección (*P.cerasifera*, *P.insititia*), especies de importancia económica (*P.armeniaca*, *P. domestica*, etc.) y especies silvestres (*P.tomentosa*) que muestran algún carácter deseable (resistencia a nematodos, etc).

El cuadro IV muestra las especies utilizadas y su nivel de ploidía:

CUADRO V. Especies utilizadas y nivel de ploidía:

Especie	Autor	2n
<i>P.amygdalus</i>	Batsch	16
<i>P.armeniaca</i>	L.	16
<i>P.cerasifera</i>	Ehrh.	16, 24
<i>P.domestica</i>	L.	48
<i>P.insititia</i>	L.	48
<i>P.persica</i>	(L.) Batsch	16
<i>P.salicina</i>	Lindl	16
<i>P.tomentosa</i>	Thunb.	16



V.1. CRUZAMIENTOS INTRAESPECÍFICOS.

- 1) Albaricoquero (*P.armeniaca*): 'MONIQUI' X 'CANINO'
- 2) Mirobolanes (*P.cerasifera*): 'MIROBOLAN AD605' X 'MIROBOLAN B'
- 3) Ciruelos hexaploides
(*P. insititia*): 'PUEBLA DE SOTO 101' X 'MONTIZO'
- 4) Híbridos almendro x melocotonero (*P. amygdalus x P. persica*)
'CACHIRULO' X 'BALONES'

V.2. CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS.

- 1) 'CACHIRULO' (*P. amygdalus x P. persica*) X *P. tomentosa*
- 2) 'CACHIRULO' (*P. amygdalus x P. persica*) X
'MIROBOLAN AD 605' (*P. cerasifera*)
- 3) 'CACHIRULO' (*P. amygdalus x P. persica*) X
'MIRANDIER 617' (*P. amygdalus x P. cerasifera*)
- 4) 'MIROBOLAN B' (*P. cerasifera*) X 'MONIQUI' (*P. armeniaca*)
- 5) 'GF-31' (*P. cerasifera x P. salicina*) X *P. tomentosa*
- 6) 'REINA CLAUDIA' (*P. domestica*) X 'MONTIZO' (*P. insititia*)

V.3. DESCRIPCION DE LOS CLONES UTILIZADOS EN LOS CRUZAMIENTOS.

'MONIQUI'

Variedad de albaricoquero *P. armeniaca*, se trata de un clon obtenido de una variedad población en Murcia. El árbol es vigoroso, de porte abierto y producción irregular (GUERRIERO *et al.*, 1988). Junto con 'Paviot', es la variedad de albaricoquero más importante en la región de Zaragoza (FELIPE, 1990). Presenta incompatibilidad localizada frente a un gran número de patrones, especialmente los mirobolanes y marianas. Sólo con albaricoquero franco no ha desarrollado incompatibilidad (AUDERGON *et al.*, 1988). En los últimos años se ha comprobado que con el patrón obtenido en esta unidad, 'Montizo', no ha presentado por el momento problemas de roturas en la unión, síntoma de incompatibilidad, e igualmente con los híbridos de almendro x melocotonero el porcentaje de rotura es muy reducido (ERREA, 1991). Esta variedad no ha sido utilizada como patrón franco, al no tratarse de una variedad que va a la industria transformadora de frutos, de donde frecuentemente provienen las semillas que luego pueden ser utilizadas en cantidades grandes para la selección de patrones (FELIPE, 1990).

'CANINO'

Variedad de albaricoquero *P. armeniaca* procedente de semilla. Junto con 'Moniqui' son las dos variedades más importantes de España (FELIPE, 1990), con buena resistencia a la manipulación y transporte (GUERRIERO *et al.*, 1988). Presenta problemas de incompatibilidad con la mayoría de los patrones, especialmente con mirobolán, y menos acusado con melocotonero franco.

Sus semillas son utilizadas como patrones francos de albaricoquero, ya que se utiliza en la industria. Estos patrones son compatibles con todas las variedades de albaricoquero, aunque deben reservarse para suelos sueltos y bien drenados, ya que tienen un sistema radicular con tendencia a profundizar en el suelo cuando las condiciones de éste se lo permiten (FELIPE,

1989).

Los francos de albaricoquero son resistentes a los nematodos *Meloidogyne* y a *Pratylenchus* (CROSSA-RAYNAUD y AUDERGON, 1987) y poco resistentes a *Agrobacterium* (FELIPE, 1990). Resistentes a clorosis y bastante a la sequía (CROSSA-RAYNAUD y AUDERGON, 1987). Estos francos son sensibles a la asfixia de cuello y de la raíz, a la podredumbre de cuello debida a *Phytophthora*, a *Armillaria* y a *Verticillium* (FELIPE, 1989). Su propagación vegetativa es muy difícil, por lo que comercialmente no se aplica.

'MIROBOLAN 605- A.D.'

Es un ciruelo de 'crecimiento rápido' (*P. cerasifera* Ehrh.). Procede de una selección realizada en la EE de Aula Dei, aunque no ha llegado a comercializarse. Es más resistente a la asfixia radicular que el albaricoquero franco, también es resistente a la caliza y a la sequía (CAMBRA, 1983). Susceptible al chancro bacteriano (CROSSA- RAYNAUD y AUDERGON, 1987). Tiene afinidad muy deficiente con 'Canino' y 'Moniquí' y excelente con 'Luizet' (ERREA, 1991). Retrasa la entrada en fructificación del albaricoquero (CAMBRA, 1983).

'MIROBOLAN-B-E.M.'

También es un ciruelo de 'crecimiento rápido' (*P. cerasifera* Ehrh.) Seleccionado en la estación inglesa de East Malling (Reino Unido). Patrón muy utilizado para albaricoquero, no retrasa la maduración, propiedad muy importante en variedades muy productivas (FELIPE, 1989). Es moderadamente resistente a *Verticillium*, a *Phytophthora* y al chancro bacteriano del cuello (CROSSA-RAYNAUD y AUDERGON, 1987), relativamente resistente a la sequía. Sensible a los nematodos *M. incognita*, *M. javanica* y *P. vulnus*, así como a *Armillaria* y *Agrobacterium*. Es compatible con los ciruelos europeos y japoneses, pero incompatible con el melocotonero y el almendro y algunas variedades de albaricoquero, entre las que se encuentran, 'Moniquí', 'Canino', etc (HERRERO, 1969; FELIPE, 1990), siendo su compatibilidad excelente

con 'Luizet'. Propaga aceptablemente por estaquilla leñosa hecha en otoño y temprano en invierno (FELIPE, 1989).

'MONTIZO'

Es un ciruelo "Pollizo de Murcia" *P. insititia* perteneciente al grupo de 'ciruelos de crecimiento lento' (San Julián y Damas). Seleccionado en la Unidad de Fruticultura de Zaragoza, a partir de una población de semillas en 1975 (FELIPE, 1990). Parece haber heredado la polivalencia de los 'Pollizos de Murcia', ya que no muestra incompatibilidad con almendro, albaricoquero ni melocotonero y por supuesto con ciruelo. Los pollizos en general son resistentes a la asfixia radicular y a suelos compactos, calizos y salinos, pero son sensibles a la sequía. Propaga bien por estaquilla leñosa (FELIPE, 1989; MORENO, 1991), su sistema radicular no es tan superficial como en otros 'Pollizos' por lo que hasta los ocho años ha emitido pocas sierpes (FELIPE, 1990). Resistente a nematodos del grupo *Meloidogyne* (PINOCHET *et al.*, 1990).

'PUEBLA DE SOTO-101-AD'

Es un clon del ciruelo "Pollizo de Murcia" *P. insititia*, ciruelo de crecimiento lento. Seleccionado en la EE de Aula Dei, a partir de una población de sierpes recogida en diferentes localidades de la región de Murcia (CAMBRA, 1979). Tiene compatibilidad generalizada con albaricoquero, almendro, melocotonero y nectarina (CAMBRA, 1983). La propagación por estaquilla leñosa es mediocre (FELIPE, 1989). Actualmente se propaga aceptablemente mediante cultivo 'in vitro'. El sistema radicular es superficial y serpea bastante (CAMBRA, 1979; FELIPE, 1989; MORENO, 1991).

'INRA- REINA CLAUDIA-1380'

Es un *P. domestica*. Clon de Reina Claudia, 'ciruelo de crecimiento lento'. Seleccionado por la estación francesa de La Gran Ferrade. Su morfología se corresponde con el grupo de variedades 'Reina Claudia'. Es moderadamente resistente a *Verticillium*, *Agrobacterium* y clorosis (CROSSA- RAYNAUD y AUDERGON, 1987). Es muy compatible con muchas de las variedades de albaricoquero que son poco compatibles con otros ciruelos: 'Canino', etc. (FELIPE, 1989; CAMBRA, 1983). El mejor sistema de propagación es por acodo de tallo y no por estaquilla leñosa, (FELIPE, 1989).

'CACHIRULO'

Híbrido de almendro x melocotonero, *P. amygdalus* Batsch. x *P. persica* L. Batsch. Clon procedente de una selección llevada a cabo en la Unidad de Fruticultura del S.I.A., de la polinización dirigida de flores del almendro 'Belle d'Aurons' con polen del melocotonero 'Rutgers Red leaf'. El carácter 'hoja roja', es un carácter morfológico diferencial de interés con vistas a vivero, lo que ha llevado a la búsqueda de patrones que presenten esta propiedad. Es un clon que se encuentra en fase de selección, tanto por su facilidad de propagación como por sus caracteres agronómicos y morfológicos (FELIPE, 1989).

'BALONES'

Híbrido de almendro x melocotonero, *P. amygdalus* Batsch. x *P. persica* (L.) Batsch. Es un clon procedente de Murcia seleccionado a partir de una población de hibridación espontánea (RODRIGUEZ-NAVARRO, 1983).

'MIROBOLAN INRA GF 31'

Híbrido de *P. cerasifera* Ehrh. x *P. salicina* Lindl. Selección procedente de la estación de la Gran Ferrade (Francia). Vegeta bien en suelos superficiales, calizos y secos (BERNHARD y DUQUERNE, 1961). Susceptible a la asfixia de raíces (FELIPE, 1989) y menos resistente a la clorosis que el albaricoquero franco (CAMBRA, 1983). Más vigoroso que los mirobolán (BERNHARD y DUQUERNE, 1961). Su comportamiento con 'Canino' es bastante irregular (HERRERO, 1969), mostrando mejor afinidad que el resto de los mirobolanes.

'MYRANDIER 617'

Híbrido de *P. cerasifera* Ehrh. x *P. amygdalus* Batsch. Selección proveniente de Francia, de la estación del INRA de Montfavet. Resultado de una serie de polinización libre de Mirobolán P.2023 en medio de parcelas de almendro (GRASSELLY y OLIVIER, 1988). Esta selección tiene un comportamiento interesante. En general este tipo de híbridos son resistentes a la clorosis y sensibles a *Agrobacterium* (GRASSELLY y OLIVIER, 1987). Resultan incompatibles como patrón con las variedades de almendro que son incompatibles con ciruelo mirobolán (GRASSELLY y OLIVIER, 1988).

***P. tomentosa* Thunb.**

Especie perteneciente a la sección *Microcerasus* Webb, también ha sido descrita como *Cerasus tomentosa* Wall., y *P. trichocarpa* Bge. Es una especie de cerezo silvestre, originario de China, Japón y la cordillera del Himalaya. Se ha observado su resistencia a nemátodos (MARULL, 1992).

INTERACCION POLEN-PISTILO

1. INTERACCION POLEN-PISTILO.

1.1.INTRODUCCION

1.1.1. La flor en el Género *Prunus* L.

El género *Prunus* L. pertenece a la familia Rosáceas, y se caracteriza por poseer flores en general hermafroditas con un cáliz gamosépalo de 5 sépalos, corola de 5 pétalos blancos o con diferentes tonalidades rosáceas y una media de 25 a 30 estambres insertos en el borde de un receptáculo floral que tiene forma de copa, en general poco profundo y en el que se inserta un carpelo único.

La fase haploide o gametofítica del ciclo vital de las angiospermas queda reducida al interior de su flor, mientras que en las plantas inferiores adquiere una gran importancia. Esta fase haploide comienza después de la meiosis y consiste en el grano de polen, del que procede el tubo polínico, y en la ovocélula. Tras el crecimiento del tubo polínico por el estilo y su entrada en el saco embrionario, donde se produce la fecundación, se inicia la fase diploide o esporofítica con la formación del embrión que al final de su desarrollo da lugar a una semilla, la cual puede dar origen a una planta que en sus flores, tras las divisiones meióticas, dará lugar a una nueva fase gametofítica. La fase gametofítica es de especial importancia pues centra todos los procesos de la fecundación, especialmente en las plantas cultivadas por sus frutos. En el proceso de la fecundación adquiere una importancia específica la interacción polen-pistilo, que tiene lugar en la denominada fase progámica, definida como el tiempo que transcurre desde la polinización hasta la fecundación y en la que tiene lugar esta interacción entre los tejidos femeninos y masculinos (HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON, 1975). En esta fase se ponen de manifiesto las relaciones de compatibilidad o incompatibilidad en el caso de que haya barreras prezigóticas que impidan la fecundación, determinando como consecuencia la ausencia de una semilla o el desarrollo normal del fruto. Estos procesos ponen en evidencia que la polinización es un proceso vital para la supervivencia de las plantas. En los cultivos frutícolas una cosecha comercial depende muchas veces de una polinización eficaz.



1.1.2. Grano de polen.

El grano de polen se forma dentro de las anteras, donde se desarrolla la fase gametofítica masculina. Las células madres del polen, tras una división meiótica, dan lugar a cuatro microsporas haploides, que después de una división mitótica originan el núcleo vegetativo y el núcleo generativo del grano de polen. El núcleo generativo sufre otra división mitótica, dando lugar a las dos espermátidas o gametos masculinos; esta división puede tener lugar en el grano de polen antes de germinar o una vez iniciado el crecimiento del tubo polínico, lo que diferencia las especies de polen trinucleado o binucleado. El género *Prunus* posee polen del tipo binucleado.

El tubo polínico es el camino de progresión de los dos gametos masculinos o espermátidas al saco embrionario para que se lleve a cabo la doble fecundación (KNOX, 1984). El gametofito masculino haploide es simple, pero su objetivo funcional demanda una considerable sofisticación fisiológica que se expresa en un complejo de adaptaciones asociadas, cuyo conocimiento es indispensable para la comprensión de su función: interacciones con el estigma y el estilo, germinación, nutrición y crecimiento (HESLOP-HARRISON, 1987).

Todos los aspectos relacionados con la producción de polen, así como los relativos al mantenimiento de su calidad y conservación (LINSKENS, 1974) son importantes en todos los estudios que impliquen la fecundación y por ende el cuajado de una especie. A este respecto son cuestiones de interés la mayor o menor producción de polen por las distintas especies, la cantidad de polen que puede depositarse sobre los estigmas (WEINBAUN *et al.*, 1986) y el porcentaje de estos granos de polen que germina sobre el estigma de una flor.

Quizás el aspecto más importante sea la **viabilidad**, concepto que hace referencia a la capacidad para vivir o continuar desarrollándose (RIEGER *et al.*, 1976), así como también la competencia entre individuos de una población determinada para liberar los gametos masculinos en el saco embrionario (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1984), concepto diferente de la **fertilidad** que se define como una medida de la habilidad de un individuo para producir descendencia viable, y de la **esterilidad**, igualmente una medida de la capacidad de producir gametos anormales

(RIEGER *et al.*, 1976).

La viabilidad del polen puede ensayarse "in vivo" o "in vitro". Los métodos utilizados para comprobar la viabilidad "in vitro" comprenden la germinación en gota suspendida, el ensayo de manchas, el ensayo de pocillo, el ensayo de agar o sacarosa y el soporte de membrana (STANLEY y LINSKENS, 1974). El método más fácil para la observación "in vivo" de la germinación es la técnica de fluorescencia (LINSKENS y ESSER, 1957). Posteriormente se desarrolló otro método basado también en la reacción de fluorescencia como es la técnica citológica de reacción fluorocromática (FCR) de HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON (1970). Este método, aunque rápido, es destructivo y los granos de polen no pueden ser utilizados para la fecundación. Otro método es el de la resonancia magnética nuclear (RMN) (DUMAS *et al.* 1983).

Durante el período final de la maduración en la antera, el grano de polen, junto con el tejido de las tecas, se deshidrata (STANLEY y LINSKENS, 1974). Sin embargo, el grano de polen debe rehidratarse para poder ser capaz de germinar, fenómeno que tiene lugar cuando alcanza la superficie del estigma (HESLOP-HARRISON, 1987).

Los granos de polen poseen proteínas extracelulares en las capas que forman su envoltura: en la capa interna de celulosa, llamada intina, y en la cavidad de la capa externa, exina (MATTSON *et al.*, 1974). La germinación se produce cuando se emite el tubo polínico como una prolongación de la intina (CRESTI *et al.*, 1977) que se adentra en la cutícula del estigma (HESLOP-HARRISON, 1977). La adhesión del grano de polen al estigma implica tanto la intercepción del polen como la subsiguiente formación de lazos de unión entre moléculas del polen con moléculas del estigma (KNOX, 1984).

1.1.3. Pistilo y receptividad del estigma.

El pistilo, órgano femenino de la planta, está compuesto por tres elementos: el estigma que actúa como soporte para la recepción del polen y su germinación; el estilo, por donde crece

el tubo polínico; y el ovario, que contiene el óvulo donde tiene lugar la gametogénesis femenina y la fecundación, y que además sostiene el desarrollo de los estados tempranos del nuevo esporofito y el embrión.

El estigma de la rosáceas es de tipo húmedo, por lo que su superficie se encuentra recubierta por un exudado (HESLOP-HARRISON, 1975). La composición del exudado ha sido estudiado en algunas especies y consiste en lípidos, compuestos fenólicos, carbohidratos y agua (HESLOP-HARRISON y SHIVANA, 1977). La función del exudado es variada (KNOX, 1984), desde controlar la adhesión del polen a través de un balance osmótico, proteger al pistilo de infecciones bacterianas y de la deshidratación de la cutícula, hasta servir de nutrición al grano de polen y al tubo polínico (HERRERO y DICKINSON, 1980). La adhesión del grano de polen se lleva a cabo por unas proteínas arabinogalactanas (DUMAS *et al.*, 1985).

Tras la llegada del grano de polen al estigma se produce su hidratación y posteriormente la reacción de reconocimiento de las proteínas de compatibilidad, llamadas proteínas S según el modelo propuesto por LEWIS (1960). En el caso de que exista incompatibilidad, el rechazo puede tener lugar en la superficie del estigma antes de la formación del tubo polínico o en el estilo durante la progresión del tubo polínico. En el primer caso, el sistema de incompatibilidad es esporofítico y las proteínas están localizadas en la cubierta polínica y en la superficie del estigma (KNOX y HESLOP-HARRISON, 1969) y posiblemente algunas proteínas son precursores de enzimas como la cutinasa, que es activada por un factor de la secreción del estigma y que se almacena en el mismo durante su maduración para formar un enzima activo (HESLOP-HARRISON, 1977). En *Crocus* el grano de polen contiene en su exudado varias hidrolasas ácidas pero son incapaces de romper por sí solas la pared del estigma por lo que el tubo polínico no penetra, y ha de ser con la ayuda de los precursores que la cutícula del estigma se rompa y que el tubo polínico pueda crecer entre las células hacia el estilo (HESLOP-HARRISON, 1987). En el segundo caso de rechazo en el estilo, se trata del sistema gametofítico, en el cual las proteínas S son sintetizadas por el núcleo vegetativo del polen que forma parte del gametofito.

Para que se produzca la germinación es preciso que el estigma se encuentre receptivo.

La receptividad depende tanto del momento preciso en el desarrollo del estigma como de la superficie receptiva. La aparición de glicoproteínas, proteínas S, en el estigma coincide con su período de receptividad (ROBERTS y DICKINSON, 1981), lo que debe coincidir también con la presencia de glicoproteínas del grupo de las lectinas en el grano de polen (GAUDE *et al.*, 1983). También se han observado en este período secreciones con actividad enzimática, en especial con actividad esterasa y ácido fosfatasa (HESLOP-HARRISON, 1977; HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON, 1981), actividad que sirve de marcador para el área receptiva (MATTSON *et al.*, 1974).

También en los sistemas de incompatibilidad gametofítica del género *Prunus*, como en cerezo, se han identificado diferentes antígenos; uno de ellos se ha llamado antígeno S, que se ha comprobado que sólo está presente justo antes de la eclosión (CLARKE *et al.*, 1981) en el período de receptividad del pistilo, y que no se encuentra en ninguna otra estructura de la flor. Este antígeno es capaz de inhibir el crecimiento de los tubos polínicos de los granos de polen de donde es extraído (WILLIAMS *et al.*, 1986). Otro antígeno ha sido llamado P y se ha detectado en estilos de albaricoquero, melocotonero y peral (DUMAS *et al.*, 1985), aunque de momento se desconoce su función. Posteriormente se han identificado otras proteínas en el estilo de algunas *Solanáceas* asociadas con el sistema de incompatibilidad gametofítico (MAU *et al.*, 1986).

El período de receptividad del estigma varía según las especies desde unas horas a varios días: en los distintos frutales se han indicado 7 días en peral (BINI y BELLINI, 1971); 6 en cerezo (TOYAMA, 1980, MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982); 5 en albaricoquero (TOYAMA, 1980, MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; PEREZ y MOORE, 1985), 5-6 días en melocotonero (PEREZ y MOORE, 1985) y hasta 12 días en alguna variedad de melocotonero (TOYAMA, 1980) y en el olivo (BINI, 1984). Los parámetros que condicionan la receptividad son la temperatura y la humedad.

El estilo de las *Rosáceas* es de tipo cerrado o sólido (KNOX, 1984) y a través de éste pasa el tubo de polen hacia el ovario, creciendo entre los espacios intercelulares. En estos estilos cerrados se han identificado dos zonas en el camino del tubo hasta el ovario, una zona

estigmática glandular o cuello que da paso al tejido transmisor del estilo (DUMAS, 1974).

1.1.4. Interacciones en el estigma.

Cuando el polen contacta con el estigma puede tener lugar su aceptación o su rechazo, produciéndose entonces la reacción de compatibilidad o de incompatibilidad (HESLOP-HARRISON, 1975). Cuando el polen compatible toma contacto con el estigma, rápidamente absorbe agua del exudado del estigma; por el contrario, el polen incompatible no consigue hidratarse (HESLOP-HARRISON y SHIVANA, 1977; DUMAS *et al.*, 1983).

En el caso de que se produzca su aceptación los granos de polen germinan y emiten el tubo polínico que atraviesa la membrana estigmática y continúa su crecimiento por el estilo, hasta que algunos penetran en el ovario y uno de ellos fecunda el óvulo. En el caso de que se produzca su rechazo, los granos de polen no se adhieren o no se hidratan y no emiten tubo polínico. Puede darse el caso de que el grano de polen emita un tubo polínico que pase al estilo, produciéndose aquí el rechazo con la detención del crecimiento del tubo polínico.

Generalmente, las especies de estigma seco manifiestan incompatibilidad de tipo esporofítico. En este caso los productos de naturaleza proteínica se forman en el tapetum y se añaden a la exina del grano de polen (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1973). Estos productos se establecen libremente en el estigma y están envueltos en una reacción complementaria (VAN WENT y WILLESENSE, 1984; MATTSON *et al.* 1974). Los tubos incompatibles se paran después de que sus ápices tomen contacto con las papilas del estigma (HESLOP-HARRISON, 1978). El origen del ápice polínico proviene de la intina del grano de polen, con un componente microfibrilar de celulosa que es la pared primaria de la célula somática (LINSKENS, 1976).

Los casos de incompatibilidad gametofítica suelen estar relacionados con especies de estigma húmedo (VAN WENT y WILLESENSE, 1984), como es el caso del género *Prunus*. En este tipo de incompatibilidad, los productos implicados en su manifestación se forman en el polen durante su desarrollo y se almacenan en la intina (KNOX y HESLOP-HARRISON, 1969;

HESLOP-HARRISON *et al.*, 1973) y se secretan durante la polinización en el estigma, donde actúan inmediatamente después de la polinización.

HESLOP-HARRISON (1987) atribuye tres funciones a la intina durante la germinación: el control de las aperturas de germinación (colpus), el ser fuente de enzimas y otras proteínas que son transferidas a la superficie del estigma durante la germinación y actuar de progenitor de la pared del tubo polínico. Las aperturas germinales se ponen de manifiesto al hidratarse. Las sustancias de reconocimiento del estigma son las que determinan la reacción de compatibilidad e incompatibilidad (KNOX *et al.*, 1972). Estas mismas sustancias de reconocimiento estarían implicadas en los cruzamientos tanto intraespecíficos como interespecíficos en *Populus*, en los que la reacción de incompatibilidad es de tipo esporofítico (KNOX *et al.*, 1972).

Estas proteínas tienen otras funciones, como indica la presencia de enzimas y alérgenos (KNOX, 1984). En el melocotonero, a los 30 segundos se produce una difusión de proteínas de la exina alrededor del grano de polen y a los 2 minutos lo hacen las de la intina, que fluyen por el colpus. Este debe ser el comportamiento general en el género *Prunus*, sin que el hecho de que el melocotonero sea autocompatible influya en el tipo de proteínas que se difunden, ya que estas proteínas no parecen tener ninguna función en las relaciones de compatibilidad, sino que tendrían un papel más general en el proceso de adhesión y en el contacto con el estigma (ARBEOLA y HERRERO, 1987).

El crecimiento del grano de polen en el estigma es muy similar al crecimiento "in vitro", ya que en una primera fase este crecimiento se realiza de forma autótrofa a expensas de las reservas del grano de polen (HERRERO y DICKINSON, 1979; MULCAHY y MULCAHY, 1983).

1.1.5. Interacciones en el estilo.

Después de atravesar el estigma el crecimiento de los tubos polínicos se produce a través del tejido transmisor del estilo. En el espacio intercelular del tejido transmisor de los

estilos sólidos, se acumula el exudado tanto de las células estigmáticas como de las células secretoras estilares (KNOX, 1984) y a su través van creciendo los tubos polínicos hacia el ovario para llevar a cabo eventualmente la fecundación del óvulo.

En el interior del tubo polínico y cerca de su extremo se forman unas vesículas probablemente esenciales para su crecimiento. Unas vesículas presumiblemente se van depositando sobre la pared del tubo polínico para promover así su crecimiento al favorecer la síntesis de su pared (ROSEN, 1964, citado por STANLEY y LINSKENS, 1974), mientras que otras vesículas estarían implicadas en el mecanismo de crecimiento del ápice (CRESTI *et al.*, 1977).

Uno de los componentes de la pared del tubo polínico son las placas de callosa, componente no fibrilar, que se van sintetizando a medida de que va creciendo, fenómeno que fue descrito por primera vez en 1889 por MANGIN (HESLOP-HARRISON, 1987). Las placas de callosa empiezan a formarse cuando el tubo polínico pasa de ser autótrofo, creciendo a expensas de sus propias reservas, a ser heterótrofo (HERRERO y DICKINSON, 1980).

Las acumulaciones de callosa son mas numerosas en lo que BHATTACHAJYA y LINSKENS (1955) han denominado zona de interferencia; estos depósitos de callosa van disminuyendo hasta casi desaparecer a nivel del ovario y se observan débilmente en la pared (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; TISNE-AGOSTINI y ORSINI, 1990).

Los tubos polínicos crecen a expensas de las reservas de almidón que se van sintetizando a lo largo del estilo, así como de otros elementos, como el calcio (MASCARENHAS, 1975), aunque posteriormente no se haya observado un gradiente de calcio a lo largo del pistilo; también se ha observado un papel activo del boro (ROSEN, 1964; HESLOP-HARRISON, 1987).

En los cruzamientos compatibles se ha observado que el estilo tiene un papel quimiotrófico (ROSEN, 1964), así como un trofismo mecánico (TILTON y HORNER, 1980). El simple hecho de la polinización estimula en algunas especies la síntesis de almidón en el

tejido transmisor (HERRERO y DICKINSON, 1979); igualmente la polinización, tanto de polen compatible como incompatible, estimularía la producción de un mecanismo direccional en el estilo que guiaría los tubos polínicos hacia el ovario (MULCAHY y MULCAHY, 1987).

En los cruzamientos incompatibles el tubo polínico detiene su crecimiento en el estilo (HESLOP-HARRISON, 1975; DE NETTANCOURT, 1977, HERRERO y DICKINSON, 1979). Esto parece deberse a la interrupción en la síntesis de proteínas (DE NETTANCOURT *et al.*, 1973). En *Petunia* se ha observado que los granos de polen incompatibles tienen un efecto sinérgico y ayudan a crecer a los granos de polen compatibles (HERRERO y DICKINSON, 1980), pero los tubos compatibles alcanzan una velocidad mayor que los incompatibles. Estas diferencias en desarrollo están asociadas a cambios estructurales y fisiológicos (HERRERO y DICKINSON, 1981).

En muchas especies se ha observado una expresión morfológica de la incompatibilidad que es el engrosamiento del extremo de los tubos polínicos (ROY, 1938; DE NETTANCOURT *et al.*, 1973; SOCIAS i COMPANYY *et al.*, 1976; WILLIAMS *et al.*, 1982).

DE NETTANCOURT *et al.*, (1973) observaron en cruzamientos de *Lycopersicum peruvianum* que la respuesta de incompatibilidad se localiza en la pared del tubo polínico y señalaron unas arrugas seguidas de la destrucción de la pared interna, indicando que existe una semejanza entre esta descarga y la que se produce en la sinérgida. Las paredes de los tubos polínicos incompatibles en *Lycopersicum* son mas delgadas y por la forma del retículo endoplásmico parece que la síntesis de proteínas está inhibida (DE NETTANCOURT *et al.*, 1974). También se ha observado una diferencia en la síntesis de RNA entre tubos compatibles e incompatibles (CAMPBELL y ASCHER, 1975).

La velocidad de crecimiento de los tubos polínicos es muy variable, dependiendo especialmente de la temperatura, aunque parece ser bastante constante en las diferentes especies; en el género *Prunus* se ha visto que los tubos polínicos tienen velocidades de crecimiento similares a las observadas "in vitro" (PEREZ y MOORE, 1985). La velocidad de los tubos incompatibles parece depender en parte del propio polen, ya que se han señalado diferencias

inherentes a la especie polinizadora (PEREZ y MOORE, 1985). En términos generales la parada del crecimiento de los tubos polínicos incompatibles tienen lugar en el tercio medio del estilo, aunque se han señalado diferencias según se trate de especies diploides o hexaploides (AFIFY, 1933). Así se ha señalado en el primer tercio del estilo en clementinas (TISNE-AGOSTINI y ORSINI, 1990), en la primera mitad del estilo en *Prunus* (ROY, 1938; COYLE, 1982; PEREZ y MOORE, 1985), o en la mitad del estilo en *Capsicum* (ZIJLSTRA *et al.*, 1991).

En relación con las reacciones de incompatibilidad se ha apuntado que los productos de la exina dominan en los sistemas esporofíticos y los de la intina actúan en los sistemas gametofíticos con inhibición estigmática, aunque en las plantas con inhibición estilar, no está claro (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1973).

Consideración aparte merece la incompatibilidad interespecífica, en la que no se han desarrollado estudios moleculares de este tipo para aclarar este concepto. DE NETTANCOURT (1977) describe los dos modelos que explican el sitio de inhibición interespecífica similar al de la autoincompatibilidad. Según la teoría de PANDEY (1969) ambas clases de incompatibilidad son efectos pleiotrópicos del gen S, con dos reacciones diferentes: una especificidad que controla la incompatibilidad interespecífica y una secundaria que controla la autoincompatibilidad, e incluso la segunda puede cambiar sin alterar la primera. La teoría de HOGENBOON (1973) hace referencia a la incongruencia, según la cual la reacción está determinada por genes barrera del estilo y genes penetración del polen.

1.1.6. Barreras y Técnicas.

Cuando se realizan hibridaciones hay que tener en cuenta una serie de factores que aseguren que una vez realizada la polinización el grano de polen germine y supere los estados estilares para llegar a realizar la fecundación del óvulo. En el caso de hibridaciones incompatibles el uso de determinadas técnicas puede ayudar a superar algunas de las barreras presentes desde que se produce la germinación hasta la fecundación, pasando por el crecimiento del tubo polínico hasta el ovario.

Para ello el grano de polen ha de ser transferido al sitio correcto en el estigma. Esto no es problema en las plantas que tienen un estigma grande como *Lycopersicum* (GRADZIEL y ROBINSON, 1989), aunque en algunas especies el área receptiva es muy pequeña y hay que depositar el polen en la parte correcta del estigma (AHMAD y SLINKARD, 1991). La posición y el tamaño del área receptiva puede ser determinada aplicando una apropiada tinción como la de Azul de Comassie que tiñe las proteínas del área receptiva (FISHER, 1968). También el polen ha de ser transferido en el momento exacto en el que el estigma sea receptivo. En las especies de *Prunus* estudiadas este período comprende entre 5 y 8 días (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982). El polen debe hidratarse correctamente una vez rota la cutícula del estigma. Una humedad relativa alta ayuda a la germinación del polen incompatible tanto "in vivo" (GALLETTA, 1983) como "in vitro" (LIU *et al.*, 1992). Una concentración elevada de Ca es importante, pero los requerimientos difieren para cada especie (MASCARENHAS, 1975).

La utilización de una mezcla de polen compatible muerto de la especie que se va a polinizar, llamado polen mentor o de reconocimiento, con polen incompatible de la especie extraña puede ayudar a la germinación del polen extraño. Esta técnica fué utilizada por primera vez por MICHURIN (1948) y ha sido eficaz en chopos para superar la barrera de la incompatibilidad interespecífica (KNOX *et al.*, 1972). En *Malus* se quebró la autoincompatibilidad inactivando el polen con metanol, aunque no se consiguió el mismo resultado en híbridos interespecíficos de *Pyrus*, en los que el polen fue irradiado (STETTLER y AGER, 1984). Una segunda polinización con polen compatible ha sido utilizada en cruzamientos interespecíficos en el género *Solanum*, después de una primera polinización con polen incompatible, para estimular la fecundación y el desarrollo del fruto (IWANAGA *et al.*, 1991).

La polinización "in vitro" ha sido otro método utilizado para superar la autoincompatibilidad gametofítica en dos especies de *Trifolium*. El número de granos de polen fue mayor después de la polinización cruzada en la flores polinizadas "in vitro" que "in situ" (LEDUC *et al.*, 1990). También se ha utilizado para la fecundación interespecífica en *Gossypium* (LIU *et al.*, 1992) utilizando 5 tipos de medios: germinación, fecundación, desarrollo de embrión, etc. y en *Lilium* (VAN TUYL, *et al.*, 1991).

Otro método eficaz para superar la incompatibilidad intra e interespecífica ha sido la polinización de yemas porque en ellas el estigma, aunque inmaduro, se encuentra ya receptivo antes de la antesis y supuestamente todavía no se han formado las proteínas de reconocimiento que se sintetizarían sólo unas horas antes de la antesis (DE NETTANCOURT, 1977). También se pueden superar las barreras de incompatibilidad por la polinización de flores senescentes, en las que ya han desaparecido las proteínas de reconocimiento. Esta práctica se ha demostrado eficaz en *Brassica*, tanto en cruzamientos intra como interespecíficos, en los que la polinización de las yemas más jóvenes y las más viejas han dado el mayor número de frutos (BROWN *et al.*, 1991). También en cruzamientos interespecíficos entre *Fagopyrum*, en los que se observó que los tubos polínicos crecen y alcanzan el saco embrionario, aunque no llega a crecer el embrión (SAMIMY, 1991). En el cruzamiento entre *Solanum lycopersicoide* y *Lycopersicum esculentum*, en el que la incompatibilidad se muestra por una parada del crecimiento del tubo tanto en la parte superior del estilo como en la parte inferior del pistilo, esta incompatibilidad se rompe gracias a la polinización de yemas (GRADZIEL y ROBINSON, 1989). En cruzamientos entre especies de *Lycopersicum* se ha quebrado la incompatibilidad aplicando en el estigma de *Lycopersicum peruvianum* un medio artificial análogo al exudado del estigma que permite la germinación del polen y el crecimiento del tubo en los pistilos inmaduros (GRADZIEL y ROBINSON, 1991). Sin embargo, esta práctica ha resultado negativa para cruzamientos en *Prunus* (COYLE, 1982; PEREZ y MOORE, 1985).

Se ha probado que el uso de altas temperaturas puede desnaturalizar las proteínas para romper así la autoincompatibilidad en *Malus* y *Pyrus* (DE NETTANCOURT, 1977); la aplicación de reguladores de crecimiento puede retrasar la abscisión de la flor y permitir al tubo de polen alcanzar el ovario antes de que el óvulo degenere (MLADENTSEVA, 1974, citado por COYLE, 1982). En Rusia se han señalado varios trabajos sobre hibridaciones interespecíficas en *Prunus*, aplicando varios tratamientos al polen como luz UV, rayos X, campos eléctricos y magnéticos, que han demostrado ser eficaces para aumentar el cuajado. Parece ser que el efecto de todos estos tratamientos es el de mutar o desnaturalizar las sustancias de incompatibilidad (COYLE, 1982).

También es posible romper estas barreras por medio de acortar o eliminar el paso a

través del estilo. Una medida ha sido usar las especies con el pistilo más corto como receptoras del polen. En *Prunus*, los cruzamientos con mirabolán, que tiene una flor pequeña, han dado un buen número de híbridos interespecíficos (GRASSELLY y OLIVIER, 1988). Otro método ha sido cortar el estilo y aplicar el medio de germinación del polen en la superficie del corte (HERMSEN, 1977); este método no ha dado buen resultado en *Prunus* (SCHMIDT, 1972), pero sí en *Nicotiana* (ZHOU *et al.*, 1991). También se ha injertado la porción estigmática directamente en el ovario (DE NETTANCOURT, 1977, SCHMIDT, 1972). Una combinación de estos dos métodos ha dado buenos resultados para romper las barreras de incongruencia en cruzamientos interespecíficos en *Lilium* (VAN TUYL, *et al.*, 1991) y *Allium* (VAN DER VALK *et al.*, 1991).

1.1.7. Incongruencia y Selección Gametofítica.

Un obstáculo muy común a la hora de realizar cruzamientos interespecíficos suele ser la distancia entre las especies. En determinados casos, el sentido del cruzamiento es muy importante ya que la incompatibilidad unilateral es un mecanismo que restringe los cruzamientos y es un fenómeno muy general en las plantas superiores (LEWIS y CROWE, 1958; DE NETTANCOURT, 1977). Existe una evidencia indirecta de que en *Prunus* está presente (COYLE, 1982; LAYNE y SHERMAN, 1986), así como en *Lycopersicum* (HOGENBOON, 1972; GRADZIEL y ROBINSON, 1991). Por este fenómeno las especies autoincompatibles inhiben el crecimiento del tubo polínico de las especies autocompatibles, y deben ser las especies autoincompatibles las utilizadas como polinizadoras de las especies autocompatibles (LEWIS y CROWE, 1958; DE NETTANCOURT, 1977). Esta evidencia es considerada por HOGENBOON (1975) como incongruencia unilateral. La distancia taxonómica ha sido estudiada en *Eucalyptus*, señalando la máxima importancia de esta distancia en establecer el aislamiento entre las especies (ELLIS *et al.*, 1991), ya que la severidad de las anomalías y la probabilidad de la parada de los tubos en el pistilo es proporcional a la distancia taxonómica entre las especies. Este efecto de la distancia no ha sido el mismo en otras especies como *Chamaecrista fasciculata* en la que el crecimiento de los tubos polínicos parece no verse afectado por la distancia genética o por variación fenotípica entre los polinizadores (FENSTER y SORK,

1988), y además parece no haber competición gametofítica, sino más bien una influencia del tejido femenino, que marca la cinética del crecimiento del tubo polínico (HERRERO y ARBELOA, 1989). Una competencia gametofítica en condiciones naturales ha sido señalada como una fuente de selección (MULCAHY y MULCAHY, 1987). Esta competencia y las posibilidades de una selección como instrumento de mejora ha sido ampliamente revisada (HORMAZA y HERRERO, 1992).

1.2. MATERIAL Y METODOS.

1.2.1. Especies polinizadoras estudiadas.

Las variedades utilizadas como polinizadoras fueron los albaricoqueros 'Canino' y 'Moniquí', (*P.armeniaca*); los mirobolanes clones 'Mirobolán 605' y 'Mirobolán B' (*P.cerasifera*); los híbridos 'Balones' (*P.amygdalus* x *P.persica*) y 'Mirandier 617' (*P.cerasifera* x *P.amygdalus*); el ciruelo pollizo 'Montizo' (*P.insititia*) y un clon de *P.tomentosa*.

1.2.1.1. Extracción del polen.

La recolección del polen para el estudio de la viabilidad se realizó en 1992, tanto de ramas forzadas en invernadero, como de recogida directa de los botones florales en campo. Debido a que algunas variedades que han de ser polinizadoras florecen más tarde que la especie que iba a ser polinizada, se procedió al forzado de las ramas en invernadero para obtener el polen. El forzado en invernadero se realizó a una temperatura de 24° C, en ramas cortadas del campo y puestas en un vaso de precipitados con agua. Las bases de las ramas se cortaron cada día para mantenerlas frescas y el agua fue renovada diariamente, hasta la recogida de todas las flores. La recolección de las flores en el campo se llevó a cabo antes de la antesis en flores en estado fenológico D (BAGGIOLINI, 1984). En el laboratorio se procedió a eliminar la corola y con la ayuda de unas pinzas se separaron las anteras del filamento y se depositaron en papel. Se dejaron secar en el laboratorio durante 1 o 2 días a 20 °C, hasta que dehiscieron y posteriormente se colaron a través de una malla fina de 0,26 x 0,26 mm. El polen se introdujo en botes de cristal herméticamente cerrados y que se guardaron en un refrigerador a 4° C, donde el polen se conserva en buenas condiciones. Algunas muestras se conservaron en congelador a -20° C. El polen de 'Canino', 'Moniquí', 'Mirobolán 605', 'Mirobolán B', 'Mirandier 617' y *P.tomentosa* se obtuvo por forzado en invernadero; el polen de 'Montizo' y 'Balones' se obtuvo directamente de yemas recogidas en campo.



1.2.1.2. Estudio del potencial germinativo y viabilidad.

1.2.1.2.1. Medio de cultivo.

El test utilizado para el estudio de la germinación "in vitro" fue el de placa de agar ya utilizado en estudios con polen del género *Prunus* (PARFITT y GANESHAN, 1989). El medio de cultivo está compuesto por una solución de sacarosa al 15% y agar al 1% en agua destilada, que se deposita en un porta donde se deja enfriar y solidificarse. La sacarosa aporta la fuente de energía metabólica y actúa de regulador osmótico a esta concentración, y el agar aporta la hidratación y humedad relativa necesaria para la germinación (STANLEY y LINSKENS, 1974).

1.2.1.2.2. Preparación y siembra del polen.

El polen fue hidratado en un pocillo sobre un papel humedecido introducido en una placa Petri durante una hora. Seguidamente se espolvoreó con un pincel sobre el porta que contiene el medio de cultivo, distribuyéndolo de forma más o menos homogénea para hacer el conteo más fácil y obtener una densidad de siembra similar. Se sembraron 5 portas por cada variedad y se introdujeron en cajas de cristal para mantener una humedad relativa del 100% y evitar el rasgado del agar. Una vez realizada la siembra las placas se colocaron en la incubadora a 22°C en la oscuridad (PARFITT Y GANESHAN, 1989) durante 24 h.

1.2.1.2.3. Observación microscópica y conteo.

Se consideran como germinados a todos los granos cuya longitud del tubo polínico igualó o superó el diámetro del grano de polen (LUZA *et al.*, 1987). Los campos elegidos para el conteo contenían entre 30 y 50 granos de polen, siendo el campo óptico de 0,314 mm², lo que supone una densidad de siembra de 95 a 159 granos/mm². Las observaciones se realizaron en un microscopio Olympus BH-2 de luz normal. Alrededor de 200 granos de polen fueron evaluados para cada repetición, en cada variedad ensayada. El nivel de germinación se ha

estimado como la media de granos germinados en las cinco repeticiones sobre el total observado en cada variedad. Se consideraron los porcentajes medios correspondientes a cada una de las variedades.

1.2.1.3. Tratamiento estadístico de los datos.

Para llevar a cabo el estudio estadístico de los datos obtenidos al determinar la viabilidad, se consideraron los porcentajes medios de los 5 portas analizados correspondientes a cada una de las variedades estudiadas como especies polinizadoras. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de la germinación "in vitro" tras 24 h de incubación, para ver la diferencia entre los cultivares y seguidamente se hizo una separación de medias según el test de Duncan de los porcentajes de germinación de cada uno, para ver qué variedades pueden considerarse iguales desde el punto de vista de la germinación del polen en medio artificial. Los niveles de significación fueron del 5% en todos los análisis realizados. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SAS, versión 6.03, utilizando las funciones de SAS/BASIC y PROC/GLM.

1.2.2. Polinizaciones controladas en laboratorio.

Todos los cruzamientos fueron realizados en el laboratorio para observar mediante microscopía de fluorescencia el crecimiento de los tubos polínicos o su parada en el estilo. Las flores fueron recogidas del campo en estado D, se emascularon, y se colocaron sobre una malla o espuma de florista con el pedúnculo humedecido en una bandeja con agua. Transcurridos 2 días en el laboratorio a una temperatura ambiente, se polinizaron manualmente con polen preparado según el método descrito y se introdujeron en cámara oscura a incubar a dos temperaturas diferentes 12° y 22° C. Los cruzamientos se detallan numerados en numeración romana, atendiendo a la fecha de antesis de la especie utilizada como planta polinizada y diferenciando los cruzamientos intraespecíficos e interespecíficos.

1.2.2.1. Cruzamientos estudiados.

Cruzamientos intraespecíficos.

- I. 'Moniquí' (*P. armeniaca*) X 'Canino' (*P. armeniaca*)
- II. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Balones' (*P. amygdalus* x *P. persica*)
- VII. 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*) X 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*)
- IX. 'Puebla de Soto 101' (*P. insititia*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

Cruzamientos interespecíficos.

- III. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X (*P. tomentosa*)
- IV. 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*) X 'Moniquí' (*P. armeniaca*)
- V. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*)
- VI. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Mirandier 617' (*P. amygdalus* x *P. cerasifera*)
- VIII. 'GF 31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*) X *P. tomentosa*
- X. 'Reina Claudia' (*P. domestica*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

1.2.2.2. Seguimiento en laboratorio a diferentes temperaturas.

Se recogieron muestras de las flores cada 8 horas entre las flores mantenidas a 22° C y cada 24 horas entre las flores a 12° C hasta completar 6 muestras para cada temperatura, ya que a estas temperaturas los tubos polínicos compatibles tienen el tiempo suficiente de llegar hasta el ovario (WILLIAMS, 1970). Los pistilos se fijaron en una solución de FAA (5% de formaldehído al 40%, 5% de ácido acético glacial y 90% de alcohol al 70%). El material así fijado se mantuvo hasta su estudio a 4-5° C. Para el estudio del crecimiento de los tubos

polínicos las flores se lavaron tres veces con agua destilada y se pusieron en una solución de sulfito sódico al 5% para mantenerlas en el autoclave durante 10 minutos a 1,2 kg.cm⁻². Este tratamiento ablanda los tejidos (JEFFERIES y BELCHER, 1974) y facilita la eliminación de las capas celulares que rodean el tejido transmisor por donde crece el tubo polínico así como la tinción de proteínas de los tubos.

1.2.2.3. Observación del tubo polínico con microscopía de fluorescencia.

Para la observación del tubo polínico al microscopio de fluorescencia se procedió a la tinción del tubo polínico con una solución de azul de anilina al 0,1% en fosfato potásico 0,1 N (LINSKENS y ESSER, 1957; MARTIN, 1959; KHO y BAËR, 1968). Para ello se dejaron los pistilos en la solución durante 1 noche. El examen de los pistilos se realizó con el estigma y el estilo. Para la observación al microscopio se procedió a la separación del tejido envolvente con una aguja enmangada, dejando solamente el tejido transmisor, para facilitar la observación de los tubos.

El método de tinción para fluorescencia se basa en la absorción selectiva del azul de anilina por la callosa, depositada a lo largo de la pared del tubo. La callosa es un polímero de glucosa (enlace 1-3, B-D glucopiranososa), que se deposita como una delgada película a lo largo de la pared del tubo (MARTIN, 1959). La observación se realizó en el microscopio con fluorescencia de luz transmitida para luz ultravioleta, con filtro excitador BG 3 y filtro bloqueador K 490.

1.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.

Se midió la longitud alcanzada por el tubo polínico más largo, cada 24 h a una temperatura de 12°C y cada 8 h a una temperatura de 22°C, y se expresó como porcentaje de la longitud total del estilo (LEWIS, 1942). Así mismo, se calculó la distancia real en mm recorrida por el tubo polínico más largo a cada temperatura en los distintos cruzamientos. Esta

medida de la distancia real permitió el cálculo de la velocidad media expresada en μ por hora.

Para llevar a cabo el estudio estadístico de los datos, se realizó el análisis de la varianza del porcentaje recorrido por el tubo polínico, en relación a la longitud total del pistilo a lo largo del tiempo a las dos temperaturas de incubación y expresado como velocidad relativa. El análisis se hizo según un diseño experimental jerarquizando el tiempo respecto a la temperatura para cada cruzamiento. De este modo, habiéndose comprobado que el factor temperatura induce diferencias significativas en la velocidad relativa, se realizó un análisis de tendencias, puesto que la velocidad se comporta como una variable cuantitativa acumulativa con respecto al tiempo, e interesaba determinar cuál era la cinética del crecimiento de los tubos polínicos y ver si se ajustaba a una curva de 1º, 2º ó 3º grado (lineal, cuadrática o cúbica) para cada una de las temperaturas y cada cruzamiento por separado.

Para la comparación de todos los cruzamientos se realizó un análisis de varianza de todos ellos para ver las diferencias significativas respecto a la velocidad relativa de los tubos polínicos. Una separación de medias según el test de Duncan con un nivel de significación del 5% para indicar qué cruzamientos se pueden considerar similares desde el punto de vista de la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos.

Los análisis se realizaron en el programa estadístico SAS, versión 6.03, utilizando las funciones de SAS/BASIC y PROC/GLM.

1.3. RESULTADOS.

1.3.1. Germinación del polen "in vitro". Viabilidad.

El grano de polen deshidratado en *Prunus* tiene forma elíptica y al hidratarse se observan los colpus (Foto 1.1.a). La germinación del grano de polen tiene lugar en general una hora después de la siembra, cuando produce un pequeño tubo y la difusión de proteínas. Un grano se considera germinado cuando su tubo polínico tiene una longitud doble del diámetro del grano de polen.

Los porcentajes de viabilidad variaron notablemente entre cultivares, oscilando entre 76,56% en el cultivar híbrido 'Balones' y 4,06% en el albaricoquero 'Canino'. A su vez éste fue diferente significativamente con respecto al otro cultivar de albaricoquero 'Moniquí'. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de germinación del polen del híbrido 'Mirandier 617', del albaricoquero 'Moniquí', del pollizo 'Montizo' y del 'Mirobolán 605'. Este último sí resultó estadísticamente diferente del otro 'Mirobolán B' que tuvo un porcentaje mayor de germinación. Por último el valor del clon de *P. tomentosa* resultó intermedio entre estos dos últimos mirobolanes. Los cuadros 1.3.1.1. y 1.3.1.2. muestran los resultados del análisis de varianza y la separación de medias según el test de Duncan respectivamente.

CUADRO 1.3.1.1. Análisis de la varianza de la germinación "in vitro" del polen de 8 clones de *Prunus*.

FUENTE	G L	CM	SIGNIFICACION
Cultivar	7	2631.30	0.0001**
Error	32	20.01	

** = Nivel de significación $P < 0.01$.

CUADRO 1.3.1.2. Separación según el test de Duncan de la germinación del polen (%) de 8 clones de *Prunus*.

Variedad	Viabilidad
Balones	76,56 ^a
Mirobolán B	49,20 ^b
P.tomentosa	31,32 ^c
Mirobolán 605	21,00 ^d
Montizo	19,36 ^d
Moniquí	18,74 ^d
Mirandier 617	17,66 ^d
Canino	4,06 ^e

Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en la germinación del polen en medio artificial.

1.3.2. Polinizaciones en laboratorio. Seguimiento de los tubos polínicos.

1.3.2.1. Longitud recorrida por los tubos polínicos.

Los tubos polínicos, una vez originados por el grano de polen, van creciendo a lo largo del pistilo hacia la base del estilo. En todos los cruzamientos examinados se pudo observar que a una temperatura de 12 °C al menos un tubo polínico había alcanzado la base del estilo al 6º día después de la polinización en la mayoría de los pistilos examinados. Al 5º día lo habían hecho en los cruzamientos II, V y VI con el híbrido 'Cachirulo' (Fig. 1.3.1.1.a.), X y IX con los ciruelos hexaploides (Fig. 1.3.1.3.a.) y I con el albaricoquero (Fig. 1.3.1.2.a.). Esta llegada se avanzó al 4º día en los pistilos de mirobolán en los cruzamientos IV y VII (Fig. 1.3.1.2.a.). Los únicos que tardaron 6 días en alcanzar la base fueron los tubos polínicos del clon de *P.tomentosa* en los cruzamientos III y VIII (Fig. 1.3.1.4.a.).

A una temperatura de 22 °C, se observaron tubos polínicos en la base del estilo a las 48 h de la polinización, en los cruzamientos II, V, y VI con el híbrido 'Cachirulo' (Fig. 1.3.1.1.b.), en el VIII con el híbrido 'GF-31' (Fig. 1.3.1.4.b) en los IX y X con los ciruelos hexaploides (Fig. 1.3.1.3.b.), y el I con el albaricoquero I (Fig. 1.3.1.2.b). El único que a las 48 h no había alcanzado la base del estilo fue el cruzamiento interespecífico III que corresponde al híbrido 'Cachirulo' con *P.tomentosa* (Fig. 1.3.1.4.b.). A las 40 h después de la polinización se observaron tubos polínicos en la base del estilo en los cruzamientos IV y VII de los dos mirobolanes (Fig. 1.3.1.2.b.).

Los cuadros 1.2.3.1 y 1.2.3.2. muestran la longitud hasta la base del estilo en cada una de las variedades polinizadas en cada cruzamiento y la longitud media recorrida por el tubo más largo para cada tiempo a una temperatura de 12°C y 22°C respectivamente.

CUADRO 1.3.2.1.1. Longitud media recorrida por los tubos polínicos más largos a intervalos de 24 h y a una temperatura de 12°C.

Longitud media del tubo polínico más largo (mm)

Variedad Polinizada	Estilo (mm)	Variedad Polinizadora	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Moniquí	12	Canino	3.97	4.59	8.64	10.79	12.50	11.94
Cachirulo	11	Balones	3.67	6.50	7.55	9.44	10.29	10.35
Cachirulo	11	Tomentosa	1.76	3.32	4.68	3.51	5.29	7.26
Mirob B	6	Moniquí	1.58	3.30	3.80	5.04	5.41	5.46
Cachirulo	11	MirAD 605	2.69	-	5.56	7.34	6.94	7.79
Cachirulo	11	Mird 617	2.61	6.17	7.42	10.11	10.43	10.94
MirAD605	7	Mirb B	2.67	5.51	7.07	7.45	7.40	7.16
G F 31	8	Tomentosa	2.26	4.44	4.63	4.15	5.96	6.01
Pde S 101	8	Montizo	1.86	5.12	6.64	7.66	7.59	7.68
RCI 1380	9	Montizo	2.61	4.92	8.45	8.80	8.69	8.97

- = Sin datos

CUADRO 1.3.2.1.2. Longitud media recorrida por los tubos polínicos más largos a intervalos de 8 h y una temperatura de 22°C

Longitud media del tubo polínico más largo (mm)

Variedad Polinizada	Estilo (mm)	Variedad Polinizadora	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h	48 h
Moniquí	12	Canino	2.20	3.72	5.47	8.91	10.27	10.61
Cachirulo	11	Balones	4.04	4.49	7.18	9.07	9.20	10.00
Cachirulo	11	Tomentosa	1.98	3.48	5.82	5.40	4.92	5.77
Mir B	6	Moniquí	1.52	3.45	4.99	5.82	5.51	5.32
Cachirulo	11	Mir AD 605	4.36	4.74	6.38	8.69	7.18	7.53
Cachirulo	11	Mird 617	3.22	3.97	4.87	7.23	5.91	9.15
MirAD605	7	Mirb B	2.51	5.30	6.43	7.45	7.47	7.31
G F 31	8	Tomentosa	1.09	3.62	4.95	4.23	6.33	5.77
PdeS 101	8	Montizo	0.87	3.12	6.22	7.00	5.51	8.53
RC 1380	9	Montizo	1.61	3.96	6.36	7.87	6.17	8.40

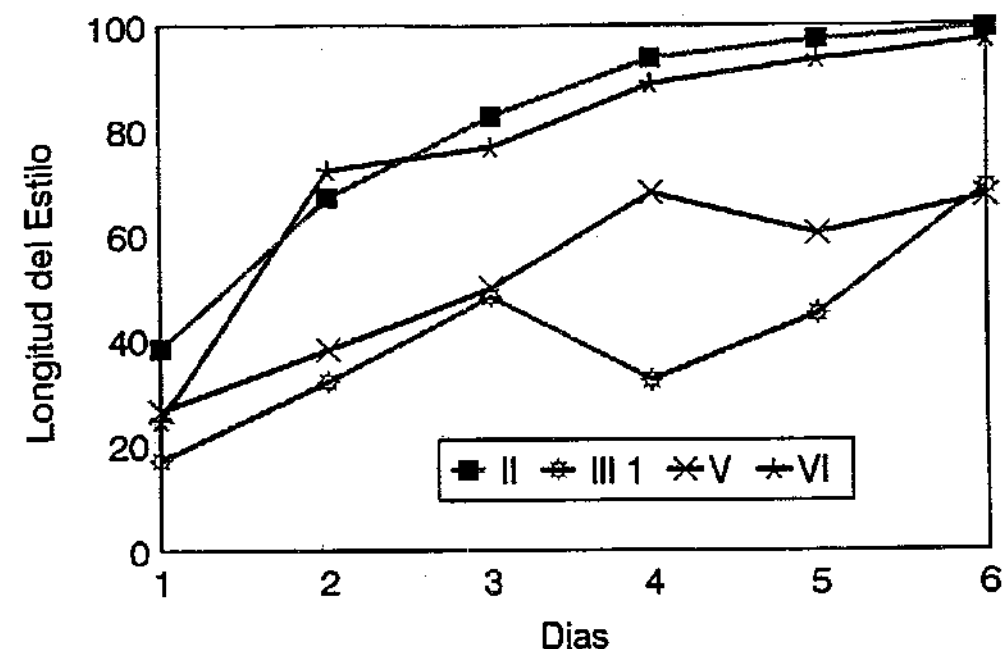


Figura 1.3.1.1.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12°C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'

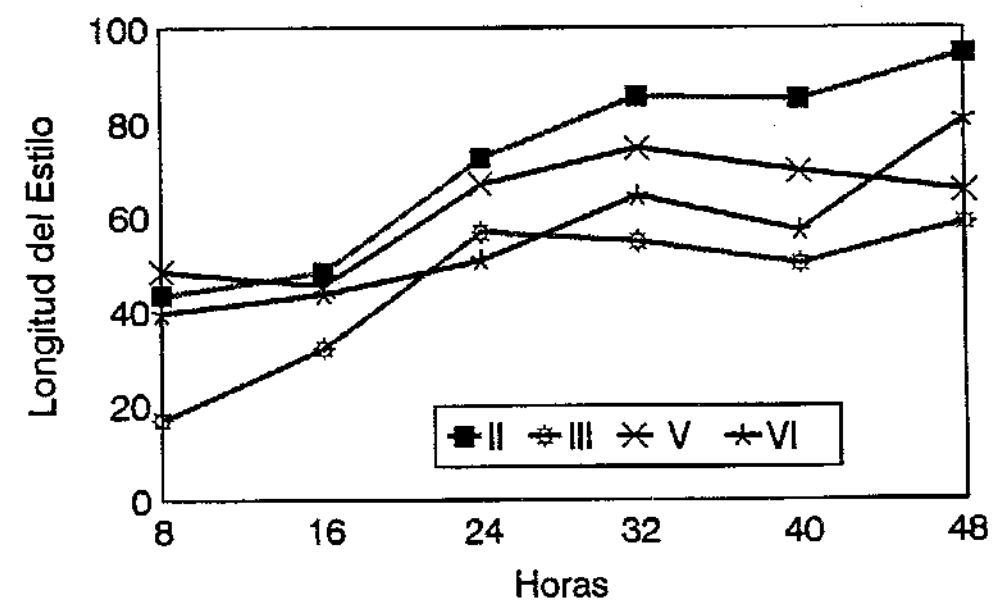


Figura 1.3.1.1.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22°C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'

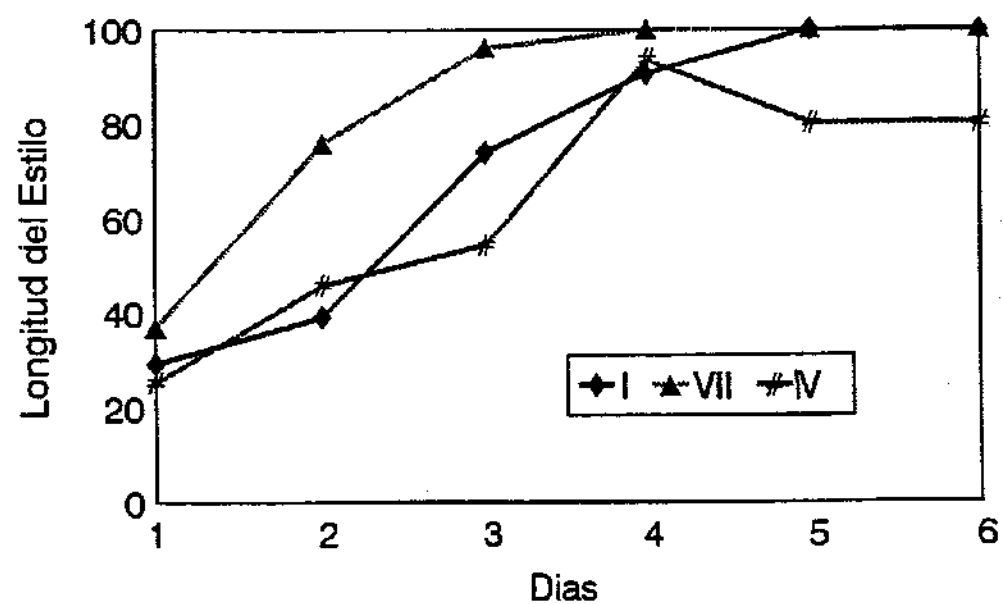


Figura 1.3.1.2.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en el subgenero *Prunophora*: albaricoquero y mirobolanes.

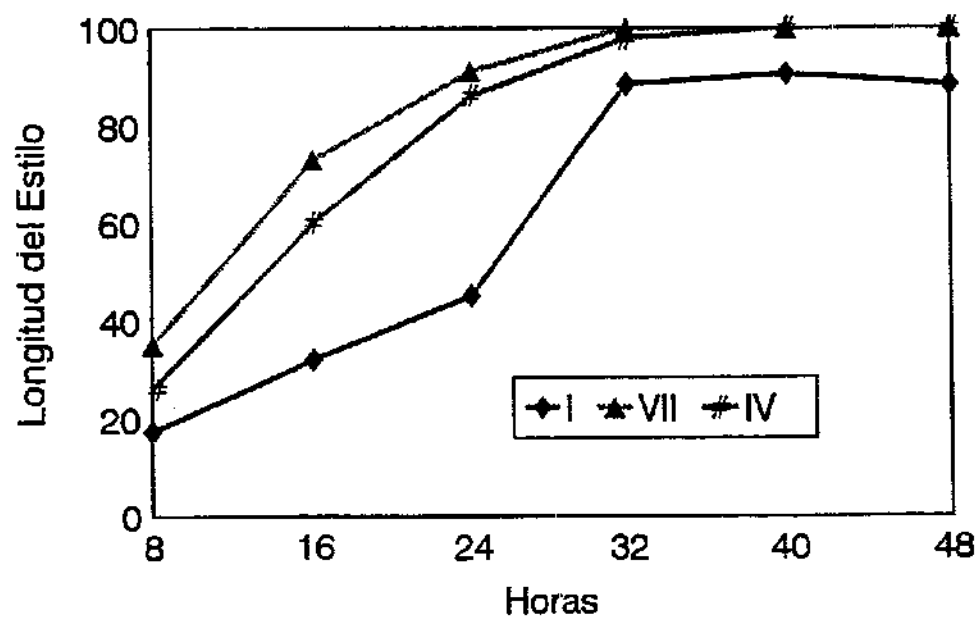


Figura 1.3.1.2.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en el subgenero *Prunophora*: albaricoquero y mirobolanes.

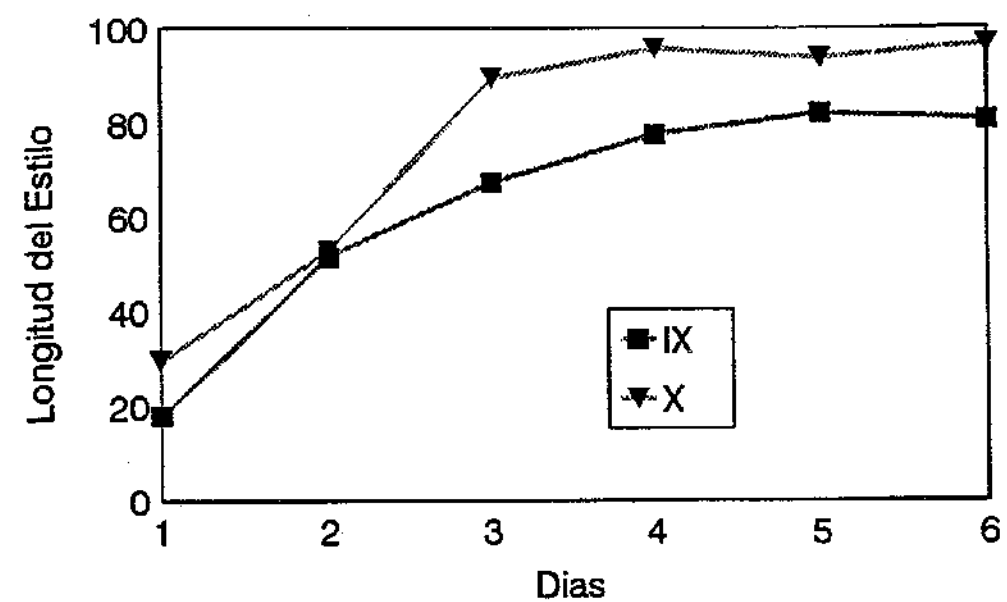


Figura 1.3.1.3.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en los ciruelos hexaploides.

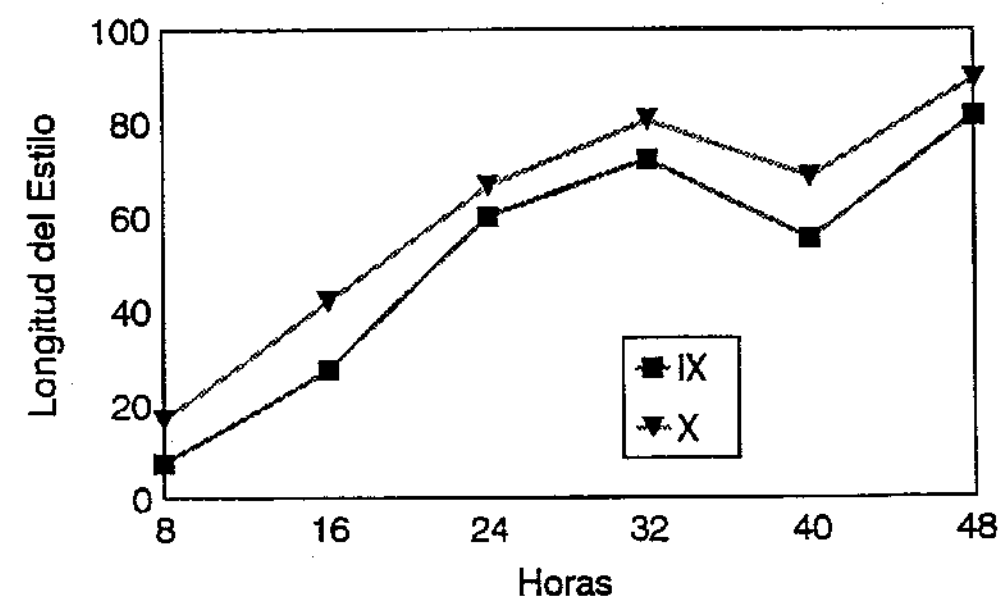


Figura 1.3.1.3.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en los ciruelos hexaploides.

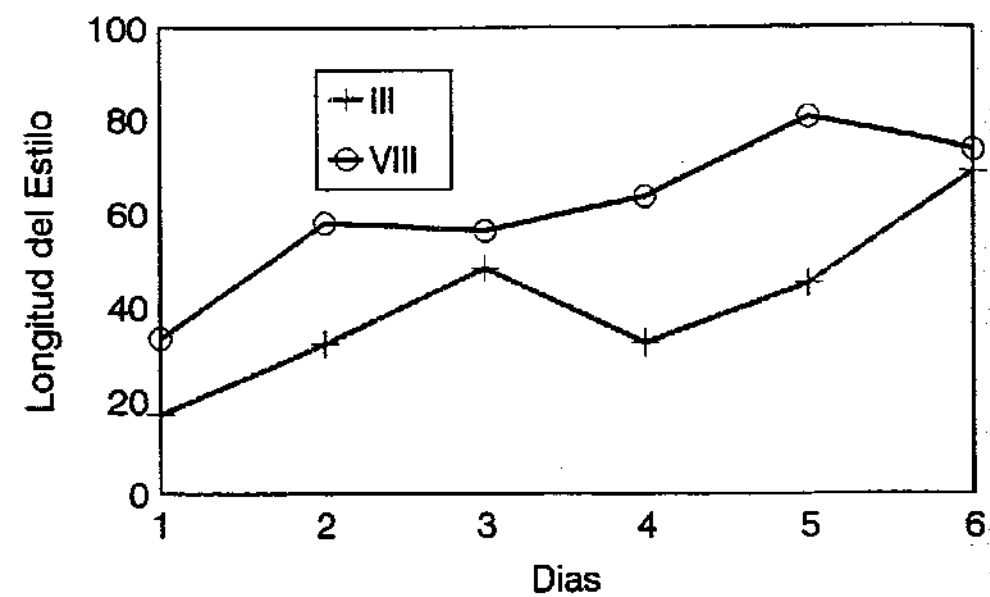


Figura 1.3.1.4.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C de *P.tomentosa* en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31

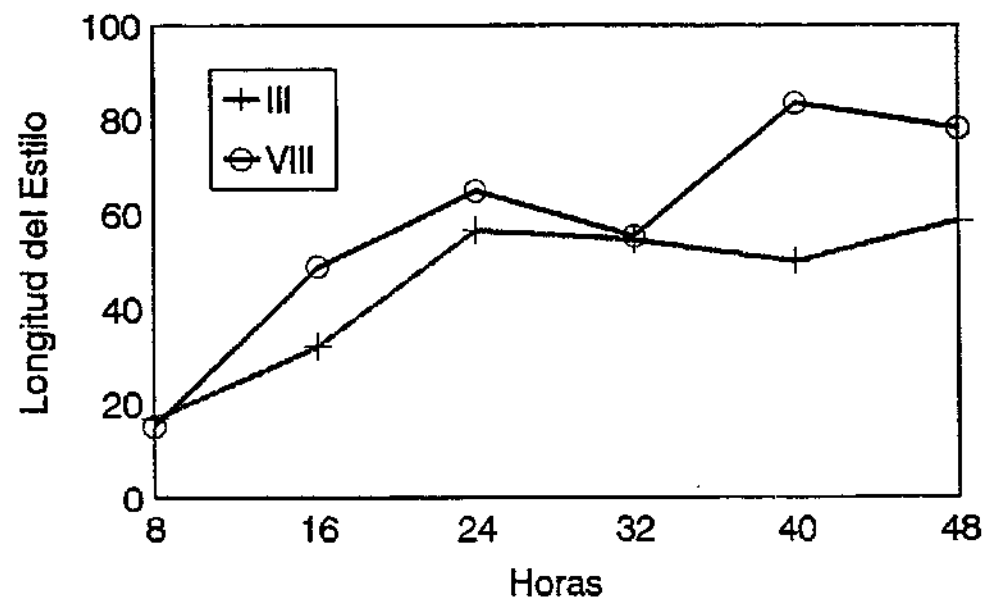


Figura 1.3.1.4.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C de *P.tomentosa* en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31

FOTO 1. 1.

FOTO 1.1. GERMINACION DE POLEN Y CRECIMIENTO DE LOS TUBOS
POLINICOS

FOTO 1.1.a. Germinación del polen de 'Moniquí' en el estigma de 'Mirobolán B' con los
colpus (flechas) y la placa de callosa (flecha) a las 8 h después de la polinización.
Tinción de azul de anilina (219X).



FOTO 1.1.b. Zona de acumulación de placas de callosa en el primer tercio del estilo de
'Mirobolán AD 605'. Tinción de azul de anilina (219X).

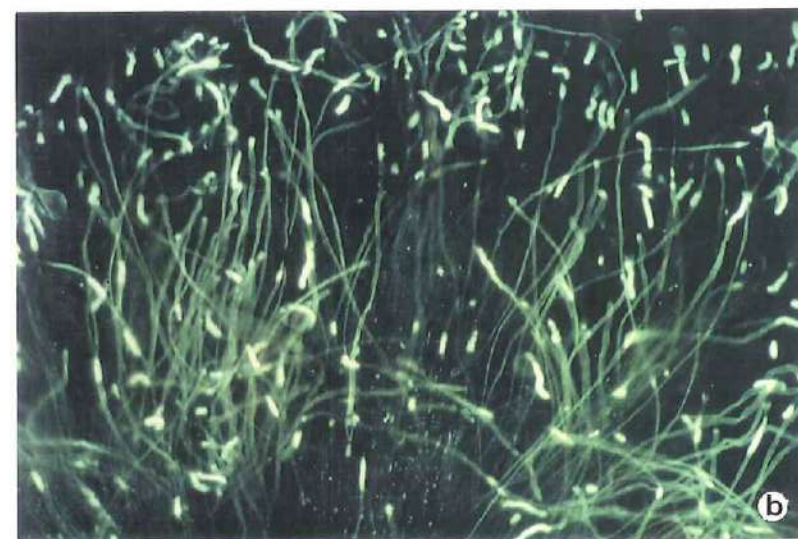
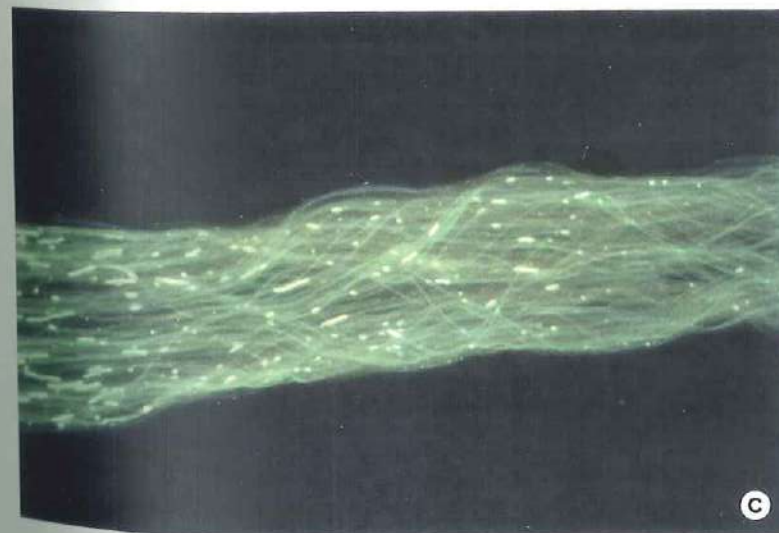


FOTO 1.1.c. Tubos polínicos creciendo en el estilo con las placas de callosa a lo largo del
tejido transmisor y donde hay una reducción de las placas de callosa (flecha). Tinción
de azul de anilina (86.5X).



En el primer muestreo de los pistilos, a las 8 h y a las 24 h, ya se observó la formación de placas de callosa en el extremo del tubo polínico (Foto 1.1.a). La mayoría de los tubos alcanzan el primer tercio del estilo en una zona en la que las acumulaciones de callosa son más numerosas (Foto 1.1.b); el número de tubos que crecen a partir de esta zona es más reducido puesto que a este nivel parece producirse un cribado de los tubos polínicos. Este fenómeno se observa de manera muy similar en la mayoría de los cruzamientos. Los tubos que continúan creciendo siguen emitiendo placas de callosa intermitentes (Foto 1.1.c) y los que detienen su crecimiento lo hacen de diferentes formas que pueden manifestarse tanto como placas de callosa (Foto 1.2.a), como con diferentes morfologías, ya sea en forma de balón (Foto 1.2.b), o en combinaciones como la espiral (Foto 1.2.c) y ciertos arrugamientos en la pared del tubo (Foto 1.2.d) cuando hay muchos juntos, así como tubos de aspecto helicoidal y con ligeros hinchazones hacia el extremo del tubo. Este tipo de parada ha sido observado solamente en pistilos del híbrido 'Cachirulo' cuando han sido polinizados con mirabolán y con el híbrido de mirabolán (Foto 1.2.e). Un grupo de tubos polínicos alcanzando la base del estilo ha sido observado en los pistilos de 'Mirobolán B' polinizado con el albaricoquero 'Moniquí' (Foto 1.2.f).

CUADRO 1.3.2.1.3.: Tasa de crecimiento del tubo polínico "in vitro" mm/día a 12°C y 22°C respectivamente.

Polen ♂	Pistilo ♀			mm/día		
	<i>armeniaca</i>	<i>amygdalus x persica</i>	<i>cerasifera</i>	<i>cerasifera x salicina</i>	<i>insititia</i>	<i>domestica</i>
Temp.	12°---22°	12°---22°	12°---22°	12°---22°	12°---22°	12°---22°
<i>armeniaca</i>	3.97-5.47		1.58-4.99			
<i>amygdalus x persica</i>		3.67-7.18				
<i>cerasifera</i>		2.69-6.38	2.67-6.43			
<i>cerasifera x amygdalus</i>		2.61-4.87				
<i>tomentosa</i>		1.76-5.82		2.26-4.95		
<i>insititia</i>					1.86-6.22	2.61-6.36

La longitud recorrida por los tubos polínicos en las primeras 24 h es bastante superior a 22° C que a 12° C. Cuando el polen de *P.armeniaca* crece en su propio estilo tiene mayor velocidad que cuando lo hace en el estilo de *P.cerasifera*, al igual que el polen de *P.cerasifera* tiene mayor velocidad al crecer en estilos del otro mirobolán que en *P.armeniaca*. El crecimiento del polen de *P.tomentosa* en los dos híbridos es muy similar, siendo mayor a 22° C en el híbrido del subgénero *Amygdalus* (*P.persica* x *P.amygdalus*) que en el híbrido del subgénero *Prunophora*, (*P.cerasifera* x *P.salicina*) mientras que a 12° C la situación es inversa. El polen de *P.insititia* tiene la misma velocidad de crecimiento a 22° C en pistilos de su misma especie que en los de *P.domestica*, mientras que a 12° C es mayor en los de *P.domestica*. En los estilos del híbrido almendro x melocotonero, el polen que mayor velocidad alcanza es el del otro híbrido de almendro x melocotonero, seguido por el de *P.cerasifera* con una velocidad muy parecida a la que tiene en su propio estilo; después lo hace con una velocidad muy similar a 12° C, el híbrido de *P.cerasifera* x *P.amygdalus* y por último *P.tomentosa* que a una temperatura de 12° C crece más lentamente que el híbrido de *P.cerasifera* x *P.amygdalus*, pero a 22° C lo hace más rápidamente.

1.3.2.2. Velocidad de crecimiento a lo largo del pistilo.

La velocidad expresada en μ/h a las dos temperaturas se muestra en las gráficas anexas. En todos los cruzamientos tanto intraespecíficos I, II, VII y IX (Fig. 1.3.2.2. a y b, 1.3.2.1. a y 1.3.2.4. a) como interespecíficos III, IV, V, VI, VIII y X (Fig. 1.3.2.1. b, 1.3.2.3. a y b, 1.3.2.4. b, 1.3.2.5. a y b), se observa que la velocidad media en μ/h es mayor a la temperatura de 22° C que a la de 12° C.

En algunos cruzamientos se aprecia una velocidad mayor durante el primer día, 24 h después de la polinización, como ocurre en la combinación compatible I entre los dos albaricoqueros pero se mantiene constante después de este período (Fig. 1.3.2.2. a). La oscilación media a 12° C está entre 113,38 μ/h en el cruzamiento I, entre los dos albaricoqueros, seguida de 108,22 μ/h en la combinación también compatible II de los dos híbridos de almendro x melocotonero (Fig. 1.3.2.2. b) y la mínima de 44,24 μ/h en el

FOTO 1. 2.

FOTO 1.2. PARADA DE LOS TUBOS POLINICOS Y LLEGADA A LA BASE DEL ESTILO

FOTO 1.2.a. Tubo polínico de *P. tomentosa* parado en el estilo de 'Cachirulo' con la placa de callosa en el extremo del tubo (flecha). Tinción de azul de anilina (219X).

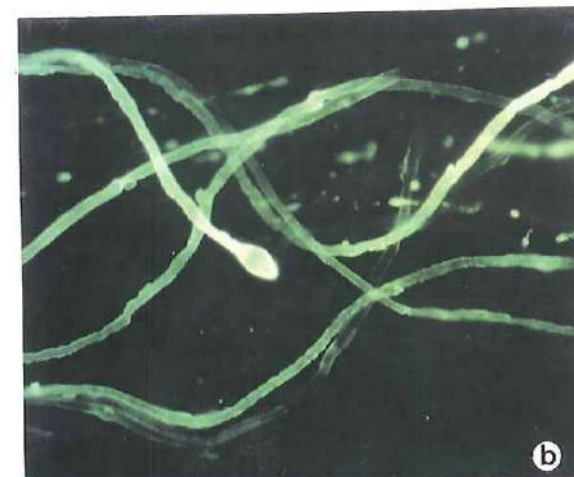


FOTO 1.2.b. Tubo polínico de *P. tomentosa* parado en el estilo de 'GF-31' con forma de balón (flecha) a las 40 h después de la polinización. Tinción de azul de anilina (219X).

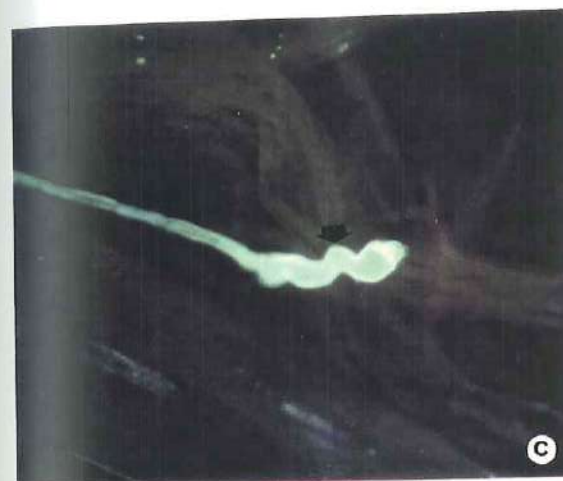


FOTO 1.2.c. Tubo polínico de *P. tomentosa* en el estilo de 'GF-31' con forma de espiral (flecha) a las 48 h después de la polinización. Tinción de azul de anilina (219X).

FOTO 1.2.d. Tubos polínicos de 'Moniquí' detenidos en el estilo de 'Mirobolán B' con arrugamientos en la pared (flecha) a los 3 días después de la polinización. Tinción de azul de anilina (548X).

FOTO 1.2.e. Tubos polínicos de 'Mirandier 617' detenidos cerca de la base del estilo 'Cachirulo' con ligeros hinchamientos en la pared del tubo cerca del extremo (flecha) al 6º día después de la polinización. Tinción de azul de anilina (219X).

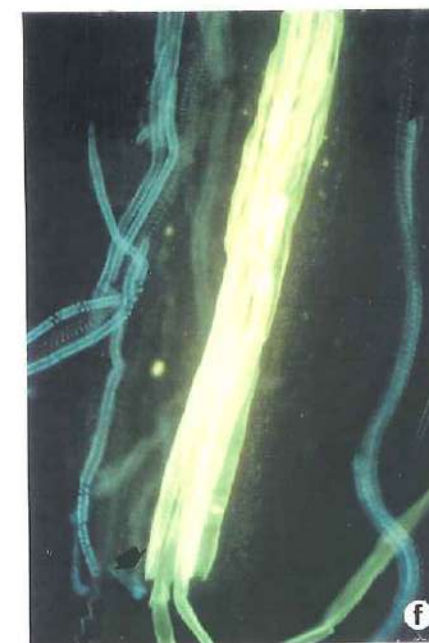
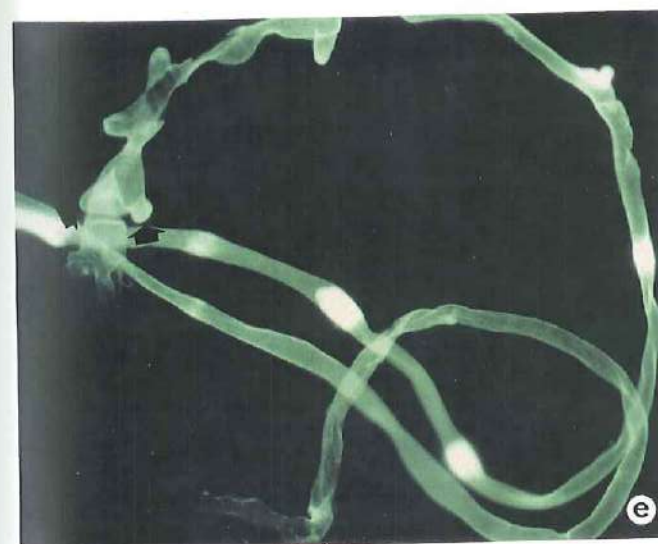


FOTO 1.2.f. Tubos polínicos de 'Moniquí' en la base del estilo de 'Mirobolán B' a la 6ª semana después de la polinización. Tinción de azul de anilina (219X).

cruzamiento interespecífico IV de mirobolán x albaricoquero (Fig. 1.3.2.1.b) y de 55,54 μ /h en el también cruzamiento interespecífico III (Fig. 1.3.2.5.a) 'Cachirulo' x *P. tomentosa*.

A 22° C la velocidad es menos constante, siendo en general mayor a las 8 h en casi todos los cruzamientos, excepto en los cruzamientos IX y X con los ciruelos hexaploides en los que la velocidad media es mayor a las 24 y 32 h después de la polinización (Fig. 1.3.2.4. a y b). Esta velocidad media oscila desde 301,20 μ /h en el cruzamiento compatible II, entre los dos híbridos de almendro x melocotonero, seguida por 248,66 μ /h del cruzamiento I, entre los dos albaricoqueros (Fig. 1.3.2.2.a) y por una mínima de 163,18 μ /h en el cruzamiento interespecífico VIII de 'GF-31' x *P. tomentosa* (Fig. 1.3.2.5.b), seguido por una velocidad media de 170,54 μ /h en el cruzamiento IV (Fig. 1.3.2.1.b), también interespecífico entre mirobolán x albaricoquero.

Las mayores velocidades medias coinciden con dos cruzamientos compatibles I y II y la menor en cruzamientos interespecíficos, IV, III y VIII a ambas temperaturas, excepto en los cruzamientos IX y X, pues en el cruzamiento interespecífico X la velocidad es mayor que en el intraespecífico IX. También la velocidad media en el cruzamiento intraespecífico IX entre los ciruelos hexaploides es menor que en el cruzamiento intraespecífico VII entre los dos mirobolanes (Cuadro 1.3.2.2.1).

CUADRO 1.3.2.2.1. Velocidad media (μ /h) en los 10 cruzamientos a dos temperaturas T_1 (12°C) y T_2 (22°C).

Cruce	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
T_1	113.83	108.22	55.54	44.24	62.92	111.54	85.42	62.19	78.63	92.49
T_2	248.66	301.20	181.41	170.54	279.75	239.89	191.88	163.18	178.43	214.87

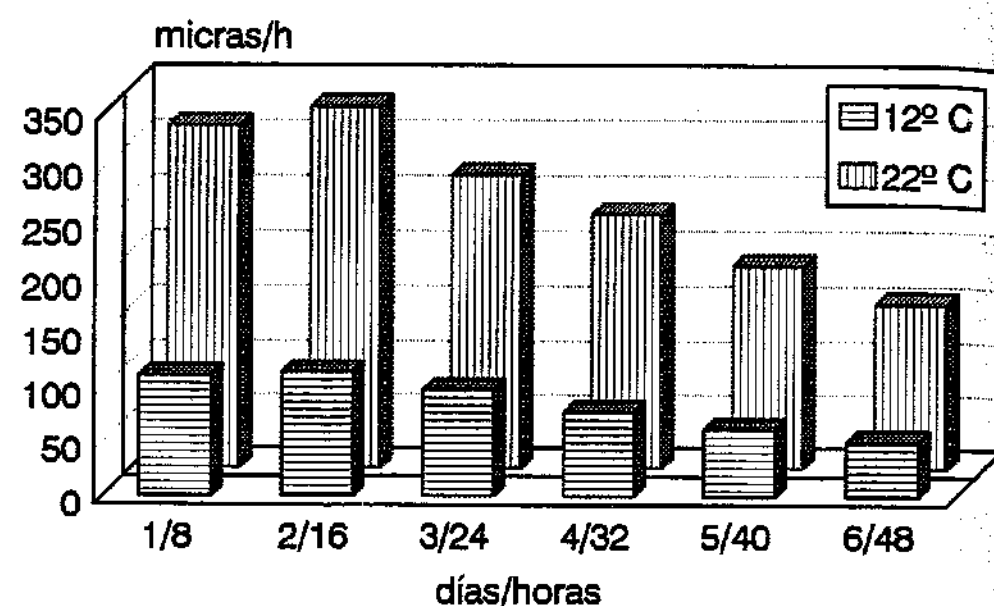


Figura 1.3.2.1.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B

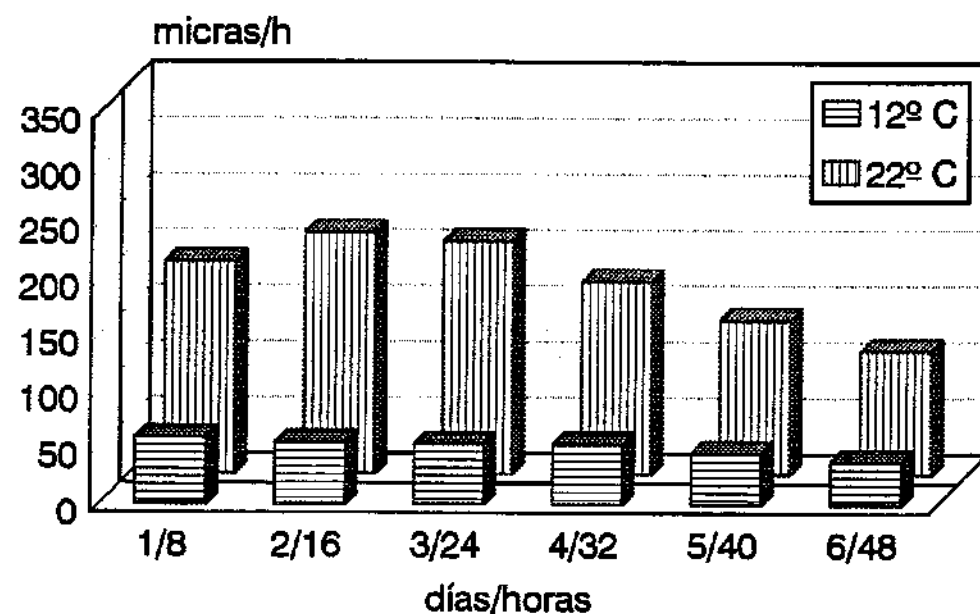


Figura 1.3.2.1.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí

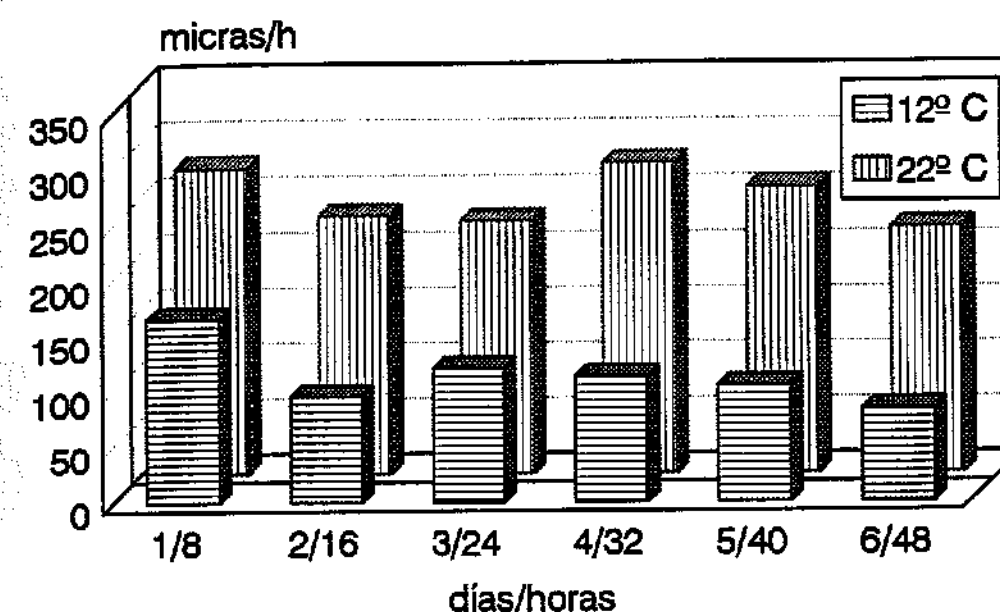


Figura 1.3.2.2.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino

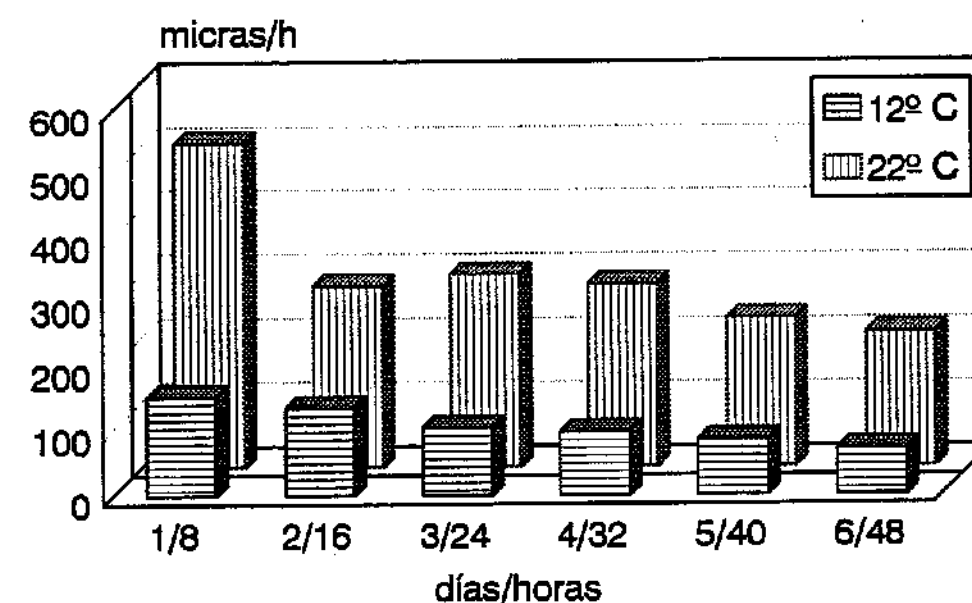


Figura 1.3.2.2.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones

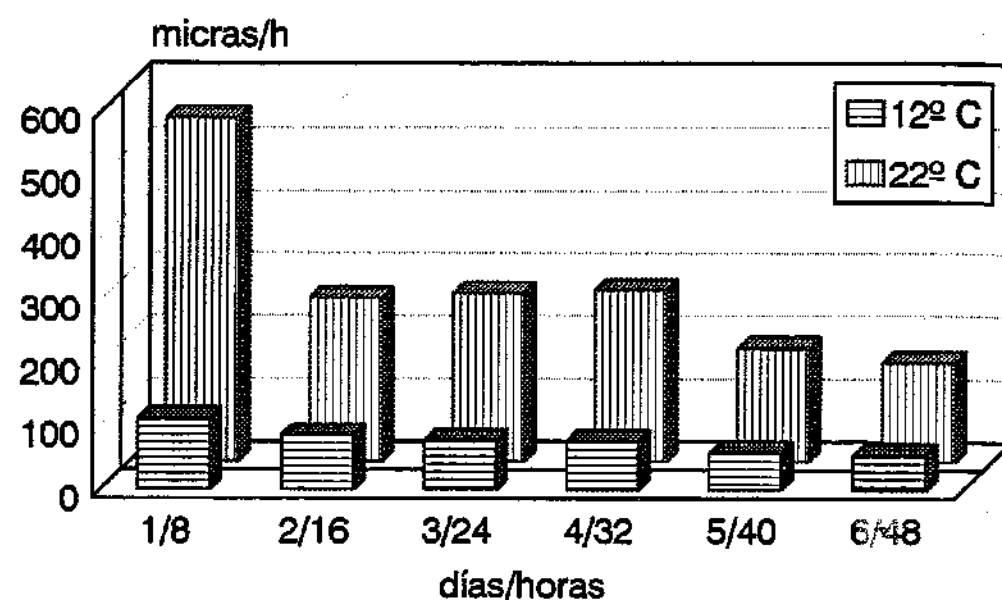


Figura 1.3.2.3.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605

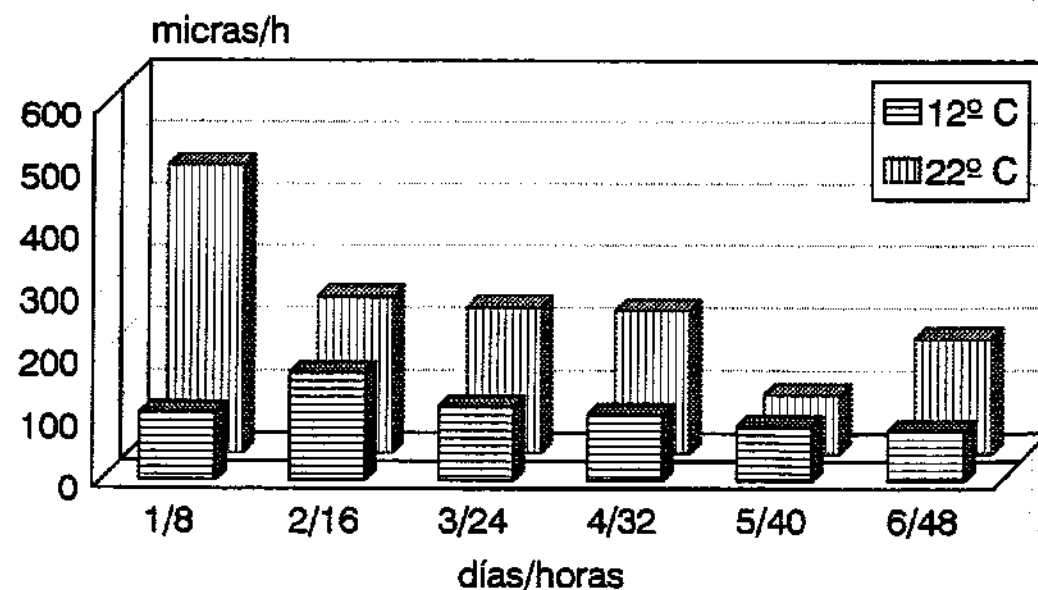


Figura 1.3.2.3.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617

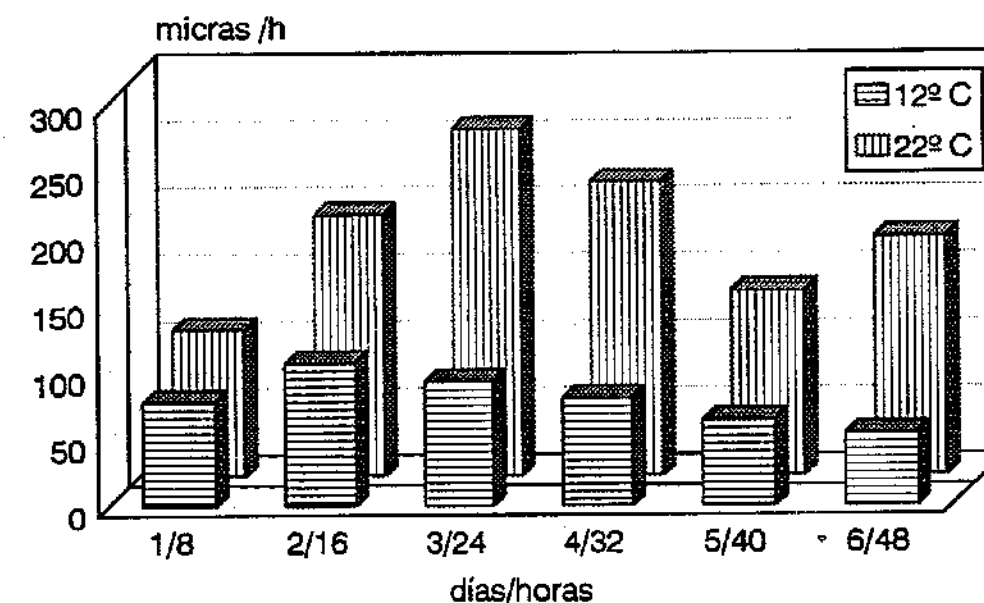


Figura 1.3.2.4.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo

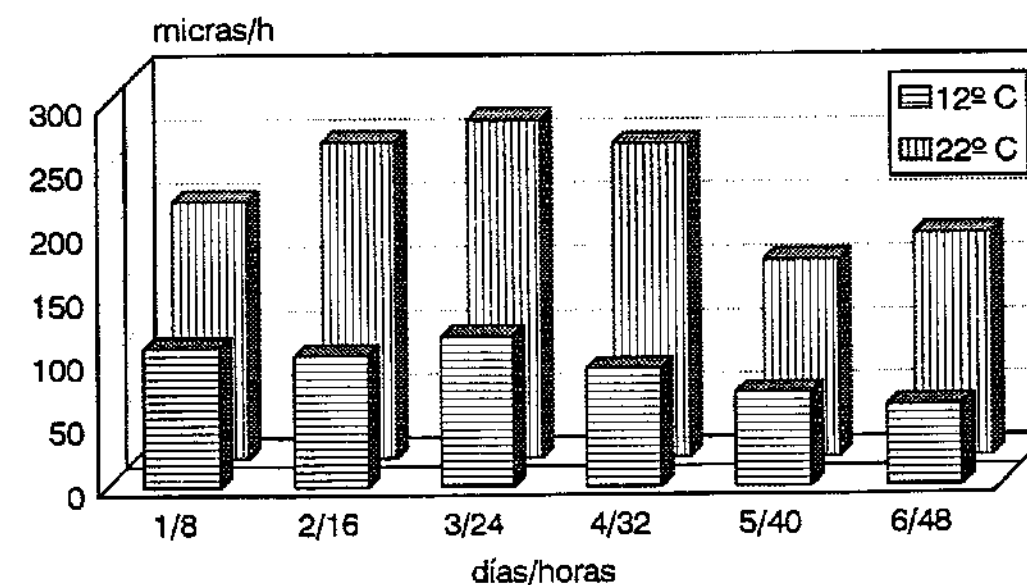


Figura 1.3.2.4.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo

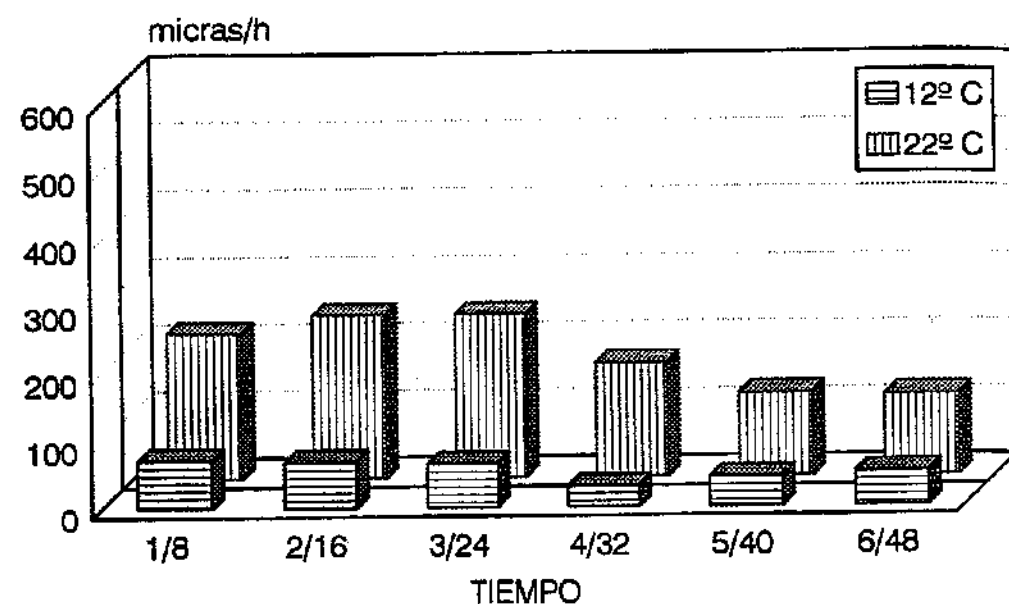


Figura 1.3.2.5.a Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x *P. tomentosa*

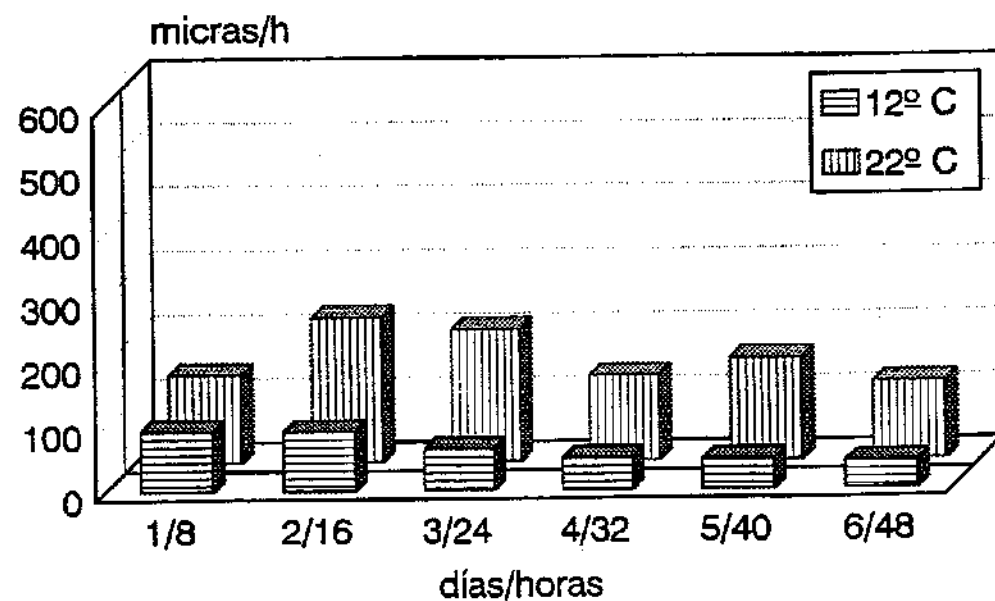


Figura 1.3.2.5.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x *P. tomentosa*

1.3.2.3. Cinética de crecimiento de los tubos polínicos.

Excepto en los cruzamientos III, V, y VIII interespecíficos y el cruzamiento VII intraespecífico, el análisis de varianza (Cuadro 1.3.2.3.1), muestra una diferencia significativa entre las dos temperaturas. En los cruzamientos intraespecíficos I (entre los dos albaricoqueros), y IX (entre los dos pollizos) se aprecia esta diferencia; igualmente significativa aparece en los cruzamientos en los que hay implicados dos híbridos interespecíficos como especie polinizadora: II (entre los dos híbridos almendro x melocotonero) y VI (entre el híbrido almendro x melocotonero y el híbrido almendro x mirobolán). También es apreciable esta diferencia significativa en los cruzamientos interespecíficos IV, (entre mirobolán y albaricoquero) y X (entre ciruelo europeo y pollizo). En los cruzamientos interespecíficos, en los cuales están implicados especies mas alejadas, no existe diferencia significativa en la cinética de crecimiento entre las dos temperaturas. Estos son los cruzamientos de *P. tomentosa*: III (con el híbrido almendro x melocotonero 'Cachirulo') y VIII (con el híbrido *P. cerasifera* x *P. salicina* 'GF-31'), así como en el cruzamiento V entre el híbrido 'Cachirulo' y el clon 'Mirobolán AD 605', en el que no se obtuvieron datos al segundo día a 12 °C.

El factor tiempo resulta altamente significativo en todos los cruzamientos, en los que se observa la progresión de los tubos polínicos que va aumentando con el tiempo. Esto ocurre tanto en los cruzamientos intra como en los interespecíficos.

CUADRO 1.3.2.3.1. Resultado del análisis de varianza para cada uno de los cruzamientos para los factores temperatura y tiempo.

Cruzamiento (I): 'Moniquí' x 'Canino'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	2334.17	0.0003**
tiempo(temp)	10	6845.35	0.0001**

Cruzamiento (II): 'Cachirulo' x 'Balones'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	1627.83	0.0033*
tiempo(temp)	10	3949.63	0.0001**

Cruzamiento (III): 'Cachirulo' x *P. tomentosa*.

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	538.58	0.2479
tiempo(temp)	10	2439.38	0.0001**

Cruzamiento (IV): 'Mirobolán B' x 'Moniquí'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	1764.00	0.0264*
tiempo(temp)	10	8705.84	0.0001**

Cruzamiento (V): 'Cachirulo' x 'Mirobolán AD 605'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	2257.84	0.0870
tiempo(temp)	10	1610.60	0.0302*

Cruzamiento (VI): 'Cachirulo' x 'Mirandier 617'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	7211.07	0.0001**
tiempo(temp)	10	35768.43	0.0001**

Cruzamiento (VII): 'Mirobolán AD 605' x 'Mirobolán B'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	76.61	0.1426
tiempo(temp)	10	6515.03	0.0001**

Cruzamiento (VIII): 'GF-31' x *P. tomentosa*

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	120.68	0.4800
tiempo(temp)	10	3254.29	0.0001**

Cruzamiento (IX): 'Puebla de Soto 101' x 'Montizo'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	4441.68	0.0001**
tiempo(temp)	10	6992.07	0.0001**

Cruzamiento (X): 'Puebla de Soto 101' x 'Reina Claudia 1380'

Fuente	G L	C M	Significación
temperatura	1	5525.50	0.0001**
tiempo(temp)	10	54323.56	0.0001**

* = Nivel de significación $P < 0,05$

** = Nivel de significación $P < 0,01$

Por otra parte el análisis de la tendencia (Cuadro 1.3.2.3.2) del crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del tiempo, a las dos temperaturas diferentes, indica la cinética de crecimiento, como se comprueba al ajustar las curvas a los diferentes modelos de primer grado (lineal), segundo (cuadrática) y tercer grado (cúbica).

A la temperatura T_1 (12°C), el crecimiento de los tubos polínicos se ajusta a una curva de tipo logístico que se puede representar por una curva de tercer grado en los cruzamientos intraespecíficos I (entre los dos albaricoqueros) y VII (entre los dos mirobolanes) (Fig. 1.3.1.2.a) y en el cruzamiento interespecífico III (del híbrido 'Cachirulo' x *P. tomentosa*) (Fig. 1.3.1.1.a). Se ajusta a una curva de 2º grado en el cruzamiento II (entre los dos híbridos interespecíficos almendro x melocotonero), los cruzamientos interespecíficos VI ('Cachirulo' x 'Mirandier 617') (Fig. 1.3.1.1.a) y IV (Fig. 1.3.1.2.a) y en los cruzamientos de los ciruelos hexaploides IX y X (Fig. 1.3.1.3.a). Solamente los cruzamientos interespecíficos V ('Cachirulo' x 'Mirobolán 605') (Fig. 1.3.1.1.a) y VIII ('GF-31' x *P. tomentosa*) se ajusta a una lineal (Fig. 1.3.1.4.a).

A 22°C el crecimiento de los tubos polínicos se ajusta a un modelo de 3º grado en los cruzamientos intraespecíficos: I, entre los dos albaricoqueros, VII, entre los dos mirobolanes (Fig. 1.3.1.2.b), IX, entre los dos pollizos (Fig. 1.3.1.3.b) así como en la combinación II, entre los dos híbridos interespecíficos almendro x melocotonero (Fig. 1.3.1.1.b); también en los cruzamientos interespecíficos IV, mirobolán x albaricoquero (Fig. 1.3.1.2.b), VIII, 'GF-31' x *P. tomentosa* (Fig. 1.3.1.4.b) y por último X, entre pollizo y ciruelo hexaploide (Fig. 1.3.1.3.b). Los cruzamientos interespecíficos III entre 'Cachirulo' x *P. tomentosa*, V entre 'Cachirulo' x 'Mirobolán 605' y VI entre 'Cachirulo' x 'Mirandier 617', se ajustan a una curva de segundo grado (Fig. 1.3.1.1.b).

CUADRO 1.3.2.3.2. Análisis de la tendencia de crecimiento para cada uno de los 10 cruzamientos; hasta el 6º día a una temperatura de 12°C y hasta 48 h a una temperatura de 22°C .

Cruzamiento (I): 'Moniquí' x 'Canino'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	2334.17	0.0003**
Lineal T_1	1	30373.59	0.0001**
Lineal T_2	1	156.23	0.3314
Cuadrática T_1	1	1974.58	0.0009**
Cuadrática T_2	1	28919.18	0.0001**
Cúbica T_1	1	808.17	0.0292*
Cúbica T_2	1	4625.11	0.0001**

Cruzamiento (II): 'Cachirulo' x 'Balones'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	1627.83	0.0033**
Lineal T_1	1	18549.40	0.0001**
Lineal T_2	1	196.35	0.2955
Cuadrática T_1	1	3105.93	0.0001**
Cuadrática T_2	1	14621.16	0.0001**
Cúbica T_1	1	105.24	0.4430
Cúbica T_2	1	1361.64	0.0069**

Cruzamiento (III): 'Cachirulo' x *P. tomentosa*

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	538.58	0.2479
Lineal T_1	1	8824.35	0.0001**
Lineal T_2	1	647.68	0.2055
Cuadrática T_1	1	224.05	0.4551
Cuadrática T_2	1	7960.92	0.0001**
Cúbica T_1	1	2715.08	0.0107**
Cúbica T_2	1	225.03	0.4541

Cruzamiento (IV): 'Mirobolán B' x 'Moniqui'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	1764.00	0.0264*
Lineal T ₁	1	43930.58	0.0001**
Lineal T ₂	1	2115.02	0.0153*
Cuadrática T ₁	1	1484.37	0.0413*
Cuadrática T ₂	1	33093.07	0.0001**
Cúbica T ₁	1	828.63	0.1256
Cúbica T ₂	1	4067.56	0.0009**

Cruzamiento (V): 'Cachirulo' x 'Mirobolán AD 605'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	2257.84	0.0870
Lineal T ₁	1	9505.91	0.0006**
Lineal T ₂	1	3.30	0.9473
Cuadrática T ₁	1	978.31	0.2574
Cuadrática T ₂	1	4690.03	0.0146*
Cúbica T ₁	1	23.61	0.8598
Cúbica T ₂	1	83.08	0.7404

Cruzamiento (VI): 'Cachirulo' x 'Mirandier 617'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	7211.07	0.0001**
Lineal T ₁	1	20635.18	0.0001**
Lineal T ₂	1	258.28	0.4171
Cuadrática T ₁	1	4457.50	0.0012**
Cuadrática T ₂	1	2243.47	0.0188*
Cúbica T ₁	1	1062.79	0.1022
Cúbica T ₂	1	1330.48	0.0682

Cruzamiento (VII): 'Mirobolán AD 605' x 'Mirobolán B'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	76.61	0.1426
Lineal T ₁	1	22503.84	0.0001**
Lineal T ₂	1	3802.56	0.0001**
Cuadrática T ₁	1	9313.76	0.0001**
Cuadrática T ₂	1	24198.30	0.0001**
Cúbica T ₁	1	911.09	0.0001**
Cúbica T ₂	1	3504.24	0.0001**

Cruzamiento (VIII): 'GF-31' x *P. tomentosa*

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	120.68	0.3293
Lineal T ₁	1	7138.09	0.0001**
Lineal T ₂	1	1143.79	0.0319*
Cuadrática T ₁	1	560.59	0.1302
Cuadrática T ₂	1	13558.50	0.0001**
Cúbica T ₁	1	130.70	0.4624
Cúbica T ₂	1	5917.50	0.0001**

Cruzamiento (IX): 'Puebla de Soto 101' x 'Montizo'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	4441.68	0.0001**
Lineal T ₁	1	24763.90	0.0001**
Lineal T ₂	1	402.11	0.1488
Cuadrática T ₁	1	5778.67	0.0001**
Cuadrática T ₂	1	27058.96	0.0001**
Cúbica T ₁	1	196.02	0.3123
Cúbica T ₂	1	1808.10	0.0026**

Cruzamiento (X): 'Puebla de Soto 101' x 'Reina Claudia 1380'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	5525.50	0.0001**
Lineal T ₁	1	21249.92	0.0001**
Lineal T ₂	1	509.96	0.0317*
Cuadrática T ₁	1	5510.57	0.0001**
Cuadrática T ₂	1	19061.69	0.0001**
Cúbica T ₁	1	38.19	0.5510
Cúbica T ₂	1	2410.69	0.0001**

* = Nivel de significación P < 0,05

** = Nivel de significación P < 0,01

Por último analizados en conjunto los 10 cruzamientos respecto a la temperatura y al tiempo, el análisis de varianza indica diferencias significativas entre los cruzamientos (Cuadro 1.3.2.3.3.) pudiéndose agrupar según el test de Duncan (Cuadro 1.3.2.3.4.).

Se observa una mayor velocidad en los cruzamientos intraespecíficos que son VII, II, I, así como en el cruzamiento IV, que es interespecífico y es semejante a la de los intraespecíficos. La menor velocidad se observa en dos cruzamientos interespecíficos, III y VIII, polinizados con *P.tomentosa*. Curiosamente el cruzamiento intraespecífico IX posee la menor velocidad de todos los intraespecíficos, incluso menor que la de algunos algunos cruzamientos interespecíficos.

CUADRO 1.3.2.3.3. Análisis de varianza del crecimiento de los tubos polínicos de los 10 cruzamientos y los factores temperatura y tiempo.

FUENTE	G L	C M	SIGNIFICACION
Cruzamiento	9	130706.81	0.0001**
Temperatura	1	5468.26	0.0001**
Tiempo (temp)	10	399577.21	0.0001**
Cruce * Temp	9	2341.46	0.0001**
Cruce * Tiem (Temp)	89	66398.18	0.0001**

** = Nivel de significación P < 0,01

CUADRO 1.3.2.3.4. Separación de la velocidad media relativa según el test de Duncan del crecimiento de los tubos polínicos en los 10 cruzamientos.

Cruzamiento	Media
VII	83.915 ^a
II	75.527 ^b
IV	75.368 ^b
I	70.262 ^c
X	68.446 ^c
VI	67.608 ^c
V	58.498 ^d
VIII	58.104 ^d
IX	56.741 ^d
III	42.358 ^e

Diferentes letras indican diferencias significativas (P < 0.05) en la velocidad de los tubos polínicos.



1.4. DISCUSION.

1.4.1. Germinación de polen.

Los porcentajes de viabilidad que se han encontrado con la técnica de germinación en placa de agar varían mucho de unas especies a otras. El híbrido interespecífico de *P. amygdalus* x *P. persica*, 'Balones' resultó tener el mayor porcentaje de germinación "in vitro" entre los clones ensayados, al contrario de los resultados obtenidos con otro híbrido interespecífico de estas dos especies utilizado en plan comercial (PEREZ y MOORE, 1985); diferente fue el comportamiento del otro híbrido interespecífico *P. cerasifera* x *P. amygdalus*, que mostró una diferencia significativa con respecto al híbrido anterior, pero que también resultó más elevado que el señalado por los mismos autores para un híbrido de *P. cerasifera* x *P. munsoniana* y en general del indicado para el conjunto de los híbridos interespecíficos de este subgénero (COYLE, 1982; LAYNE y SHERMAN, 1986). Estos autores lo explican aludiendo a una falta de homología entre los genomas extraños. Con las especies pertenecientes al subgénero *Prunophora*, albaricoqueros, mirabolanes y ciruelos, en todas ellas se obtuvo un porcentaje menor del 50%. Estos porcentajes son similares a los obtenidos por COYLE (1982), aunque para estas mismas especies se ha señalado una viabilidad del orden del 90% (PEREZ y MOORE, 1985), al igual que para *P. tomentosa*. El medio utilizado podría tener su influencia, ya que estos resultados con porcentajes elevados se obtuvieron con un medio rico en sales minerales y micronutrientes, recomendado por algunos autores (GALLETA, 1983), aunque al parecer la sacarosa es suficiente para la germinación del polen de estas especies (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; COYLE, 1982; CHAPARRO y SHERMAN, 1988; PARFITT y GANESHAN, 1989). Los dos cultivares de albaricoquero también resultaron con una viabilidad muy baja, lo que concuerda con lo observado en algunas variedades, con una viabilidad por debajo del 50% (BURGOS, 1991). En general se debe tener presente que aunque diversos factores pueden influir en el porcentaje de germinación, el método utilizado para el ensayo no parece inducir este tipo de diferencias (PARFITT y GANESHAN, 1989).

La baja viabilidad obtenida con la mayoría de los clones en el momento de la

realización del ensayo, puede ser debida a que éste se llevó a cabo polen congelado y posteriormente hidratado. Aunque en general se ha indicado que el polen no pierde viabilidad con este tipo de conservación (STANLEY y LINSKENS, 1974), sí se ha observado esta baja viabilidad con polen mantenido congelado en especies de *Prunus* (COYLE, 1982; LAYNE y SHERMAN, 1986). Es de señalar que la viabilidad en el momento en que el polen fue utilizado debía de ser mucho mayor que la obtenida, como lo indica el cuajado obtenido en varios de los cruzamientos (apartado 4.3.2). Este es un factor que habrá que tener en cuenta para la realización de hibridaciones con polen conservado durante un largo tiempo, en particular de un año para otro, y que el tipo y el tiempo de la hidratación previa a la siembra pueden tener su repercusión en el porcentaje de germinación.

1.4.2. Crecimiento de tubos polínicos.

En todos los cruzamientos se ha observado que al menos un tubo alcanza la base del estilo. La manifestación mas común de los tubos polínicos incompatibles en los sistemas con una autoincompatibilidad gametofítica, caso del género *Prunus*, es la parada del tubo en el tejido transmisor del estilo (AFIFY, 1933; ROY, 1938; SOCIAS i COMPANY *et al.*, 1976; MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; STÖSSER y ANVARI, 1983; PIMIENTA *et al.*, 1983).

La determinación del crecimiento de los tubos polínicos en los pistilos de especies con autoincompatibilidad gametofítica se produce como consecuencia de la secreción de los productos del presumible locus S en el mucílago del estilo (ANDERSON *et al.*, 1989; HARING *et al.*, 1990), provenientes de la secreción de la exina (HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON, 1975). Si de acuerdo a la teoría de LEWIS y CROWE (1958), la incompatibilidad interespecífica estaría controlada gametofíticamente en las especies con autoincompatibilidad gametofítica, en estos cruzamientos no se ha observado incompatibilidad ya que no hay parada de los tubos como ha sido observado en cruzamientos interespecíficos en *Solanaceas*, un género que presenta autoincompatibilidad gametofítica (DE NETTANCOURT, 1977). Quizá sería necesario un modelo más amplio como el término incongruencia para

explicar la incompatibilidad interespecífica, que representaría una ruptura de los sistemas de polinización por el resultado de una evolución divergente del proceso de polinización en las distintas especies (HOGENBOON, 1973, 1975).

A medida que los tubos polínicos van creciendo por el estilo van dejando depósitos de callosa para aislar al extremo del tubo en crecimiento de la parte más vieja. Los que detienen su crecimiento pueden dejar un depósito de callosa en el extremo del tubo (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1975). Del número de granos de polen que emiten tubo polínico y alcanzan el tejido transmisor, hay una reducción importante en el primer tercio del estilo, tanto en los cruzamientos intraespecíficos como en los interespecíficos. Se ha señalado que esta reducción es mayor en los cruzamientos intraespecíficos incompatibles que en los compatibles (HERRERO y DICKINSON, 1980), como una señal de la incompatibilidad, aunque esta reducción se produce también en muchas especies en los cruzamientos compatibles sin que se haya ofrecido una explicación para ello (HERRERO, 1992 b). Por ello, esta reducción en el número de los tubos polínicos no puede decirse que sea síntoma de incompatibilidad.

En esta zona del primer tercio del estilo las acumulaciones de callosa son más numerosas (PIMIENTA *et al.*, 1983), y se ha llamado zona de interferencia (BHATTACHAJYA y LINSKENS, 1955). Como se ha señalado, en esta zona se produce un cribado de los tubos polínicos, lo que supondría un control del crecimiento del tubo (HERRERO y DICKINSON, 1980). Esto al parecer es debido a la reducción del espacio físico del canal estilar que impone una disminución de su capacidad para acoger a un número elevado de tubos polínicos (HERRERO, 1992 b). El número de tubos que se detienen es muy importante y es un fenómeno general en varias especies frutales (TISNE-AGOSTINI y ORSINI, 1990; MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982).

Junto a la deposición de callosa, otra manifestación de la incompatibilidad es la producción de anomalías morfológicas, tales como el arrugamiento o la explosión con liberación del contenido de los tubos polínicos (DE NETTANCOURT *et al.*, 1973; WILLIAMS *et al.*, 1982). En los distintos cruzamientos se han observado diferentes morfologías de la parada de los tubos polínicos, similares a las descritas por WILLIAMS *et al.*, (1982) en cruzamientos

interespecíficos de *Rhododendrum*. Estas morfologías incluyen placas de callosa, formas en balón y combinaciones como la espiral, ciertos arrugamientos originados en la pared del tubo cuando hay muchos juntos y por último espirales con ligeros hinchazones cerca de la parada. Estas dos últimas morfologías han sido las más características de dos de los cruzamientos interespecíficos que se podrían definir como incompatibles.

No se han observado placas de callosa en la zona del estigma, fenómeno que se ha indicado como una manifestación de la incompatibilidad en cruzamientos interespecíficos con autoincompatibilidad esporofítica (KNOX *et al.*, 1972), sino que estas placas se han formado ya en el estilo. No se puede afirmar con claridad que cada cruzamiento interespecífico tenga un tipo morfológico de parada, porque las clasificaciones que se han establecido se han realizado en una especie con estilo hueco como *Rhododendrum* (WILLIAMS *et al.*, 1982), al contrario que el de *Prunus*, que es compacto.

El crecimiento del tubo consiste en dos fases distintas (HERRERO y DICKINSON, 1981; MULCAHY y MULCAHY, 1983). La primera se produce a costa de los materiales contenidos en el propio grano de polen, lo que le permite germinar y producir un pequeño tubo, incluso "in vitro" o en el caso de ser un tubo incompatible (ROSEN, 1971); la segunda fase, que para culminar con éxito requiere alcanzar el óvulo, depende de los nutrientes suministrados por el estilo, por lo que los tubos incompatibles fracasarían en la segunda fase por una determinada falta de estímulo que le impidiera conseguir los nutrientes (MULCAHY y MULCAHY, 1983). Esta diferencia de fases está pues asociada al cambio que se produce en la forma de alimentarse el tubo de polen, de una forma autótrofa a otra heterótrofa. Esta diferencia tiene su repercusión en la curva de crecimiento logístico que manifiestan los diferentes cruzamientos a tiempos distintos, según se ajusten a una curva de 1º(lineal), 2º(cuadrática) o 3º(cúbica) grado.

El crecimiento del tubo de polen "in vitro" es mayor en general a la temperatura de 22°C que a 12°C, pero es variable dependiendo de la combinación y el cruzamiento. A las 48 h de la polinización ya se pueden observar tubos en la base del estilo, mientras que los primeros en alcanzar esta base a 12°C es a las 72 h. Esto ya ha sido observado en este género (SOCIAS y COMPANY *et al.*, 1976), ya que tanto el tiempo al que se emite el tubo polínico como la

velocidad de los tubos polínicos dependen de la temperatura (BINI y BELLINI, 1973).

Los pistilos en los que antes se observó la presencia de tubos polínicos en su base fueron los de los dos mirobolanes, cruzamientos IV y VII, al 3º día a 12°C y el 2º día a 22°C. No se observó una diferencia en la llegada a la base ni en la velocidad de crecimiento de ambos a 12°C, pero sí a 22°C. Hay que tener en cuenta que los mirobolanes poseen un pistilo corto, por lo que la distancia a recorrer por los tubos polínicos es menor que en el resto de los cruzamientos y por ello los tubos alcanzan antes la base del estilo. La explicación a esta diferencia también podría deberse a la capacidad innata del polen a crecer de sus reservas durante más tiempo como indican SCRIBAILO y BARRET (1991), por lo que se establecerían diferencias de tipo específico o incluso varietal. Desde el punto de vista de la autoincompatibilidad de las dos especies implicadas en estos cruzamientos, los mirobolanes son parcialmente autocompatibles (WATKINS, 1979) y el albaricoquero, aunque hay variedades autoincompatibles (BURGOS, 1991), se ha considerado mayoritariamente autocompatible, así que estos cruzamientos se podrían explicar según lo propuesto por DE NETANCOURT (1977), de que la combinación SCxSC es compatible. En el caso del cruzamiento intraespecífico de *P. armeniaca* (I), el tubo polínico alcanzó la base del estilo a las 32 h y a las 72 h a 22° y 12°C respectivamente; los tubos polínicos del otro albaricoquero, en el cruzamiento IV, alcanzaron la base a las 32 h y 96 h respectivamente a estas temperaturas. Esta tasa de crecimiento, así como el hecho de que necesite el mismo tiempo para alcanzar la base cuando se trata de la misma especie que cuando crece en el estilo de otra, es comparable a lo descrito en cruzamientos con esta especie (PEREZ y MOORE, 1985).

En los dos cruzamientos intraespecíficos I y VII a las dos temperaturas se observan curvas de 3º grado (cúbico), lo que indicaría que hay un punto de inflexión que correspondería al momento del cambio en el metabolismo de autótrofo a heterótrofo (HERRERO y DICKINSON, 1981). Finalmente hay un momento en que se estabiliza, lo que corresponde a la entrada en el ovario. También en el cruzamiento IV, el tubo polínico de mirobolán tiene el mismo comportamiento de crecimiento de 3º grado a 22°C, mientras que a 12°C es de 2º grado. Ello podría ser debido a que el primer punto de inflexión hubiera ya tenido lugar, debido a que la primera muestra se ha tomado a las 24 h y el polen hubiera podido

cambiar de metabolismo durante este primer período e incluso haber consumido antes las propias reservas en el pistilo de otra especie a esta temperatura.

En los dos cruzamientos intraespecíficos I, VII y en el interespecífico IV la velocidad medida en μ por hora es mayor a 22°C que a 12°C en los tres cruzamientos, como es de esperar por el efecto de la temperatura en cruzamientos compatibles. En el cruzamiento I, a ambas temperaturas el crecimiento es más uniforme y la velocidad es mayor en las primeras horas después de la polinización; en los cruzamientos IV y VII la velocidad en los pistilos del mirobolán es mayor entre las 8 h y 16 h que en las primeras 8 h, disminuyendo después a partir de la 16 horas. Esto puede ser debido a un retraso en la emisión del tubo polínico y a la germinación como se ha señalado en cruzamientos en el almendro (PIMIENTA *et al.*, 1983; SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1987), que en el caso del cruzamiento I es más rápida, o deberse a cierta incompatibilidad en el estigma (PIMIENTA *et al.*, 1983). En el cruzamiento I la velocidad podría disminuir en el momento en que el tubo pasa de tener una alimentación autótrofa a heterótrofa (MULCAHY y MULCAHY, 1983), lo que se correspondería con la zona media del estilo, y que vuelve a ser mayor cuando ya se ha producido un cribado de los tubos polínicos y los que quedan son tubos que van a alcanzar la base (HERRERO, 1992b). Pero en los cruzamientos VII y IV la velocidad disminuye más bruscamente en la zona que probablemente ya sería el ovario, pues a las 32 h algunos tubos polínicos han alcanzado en ambos cruzamientos la base del estilo, y se produce un cribado mayor que el descrito para otras especies (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1985). Esto indica el mismo comportamiento de los tubos polínicos tanto en cruzamientos intraespecíficos como interespecíficos, similitud que era de esperar dada la previsible compatibilidad del cruzamiento interespecífico.

A 12°C los tubos polínicos de *P. tomentosa* necesitaron 6 días para alcanzar la base del estilo del híbrido 'Cachirulo' y el híbrido 'GF-31'. La longitud del pistilo de estos dos híbridos es distinta, lo que podría hacer pensar que las especies tienen una velocidad intrínseca determinada y que podrían clasificarse como rápidas o lentas (PEREZ y MOORE, 1985). También a 22°C, el polen de *P. tomentosa* es el único que a las 48 h no ha alcanzado la base del estilo en el híbrido 'Cachirulo' y sí lo ha hecho en el otro híbrido 'GF-31', en el que ha de recorrer una distancia menor. Esto se puede comparar con lo observado en especies con una

autoincompatibilidad de tipo heteromórfico, donde la distancia a recorrer en polinizaciones ilegítimas es diferente (SCRIBAILO y BARRET 1991).

El hecho de que esta especie, perteneciente al subgénero *Cerasus*, crezca en los pistilos de los dos híbridos interespecíficos 'Cachirulo' y 'GF-31' se puede explicar por la hipótesis de la incompatibilidad unilateral. *P.tomentosa* es autoincompatible (WATKINS, 1979), y el híbrido 'Cachirulo' es autocompatible ya que los híbridos almendro x melocotonero heredan la autocompatibilidad del melocotonero (KESTER, 1970). Si igualmente el híbrido 'GF-31' hubiera heredado la autocompatibilidad del mirabolán, el hecho de que los tubos de *P.tomentosa* alcancen la base del estilo se puede explicar en términos de la hipótesis propuesta por LEWIS y CROWE (1958), de que la combinación autocompatible x autoincompatible (SCxSI) es compatible, como ha sido corroborado por otros investigadores en otros cruzamientos interespecíficos (DE NETTANCOURT, 1977; COYLE, 1982). Otros autores (PEREZ y MOORE, 1985), proponen a *P.tomentosa* como autocompatible para explicar en términos de la misma teoría el que los tubos no crezcan en el estilo de *P.avium*, autoincompatible, ya que SI x SC es generalmente incompatible. Esta última hipótesis, sin embargo, no se ha confirmado.

En el caso del polen de *P.tomentosa*, la velocidad es menor al principio (primer muestreo) en los dos casos, pero después aumenta hasta pasadas las 32 h, cuando disminuye de nuevo. La baja velocidad de las primeras 8 h correspondería al tiempo que tarda en germinar el polen en el estigma de los híbridos interespecíficos, en los que el tubo crece a expensas de sus reservas independientemente del pistilo (SCRIBAILO y BARRET, 1991), y pone de manifiesto la importancia de las características intrínsecas del polen para crecer (PIMIENTA *et al.*, 1983; PEREZ y MOORE, 1985). Así la disminución posterior indicaría de nuevo el cambio de metabolismo a una alimentación heterótrofa. A una temperatura de 12° C la velocidad empieza a disminuir a partir del tercer día, 72 h después de la polinización, lo cual indica que el crecimiento autótrofo y heterótrofo dependen del metabolismo de las reservas del pistilo, que juega un papel trófico (HERRERO y DICKINSON, 1979) y en el que la temperatura jugaría un papel importante en todos los procesos de síntesis de las reservas (HARING *et al.*, 1990). Este metabolismo viene avalado por las curvas de la cinética de crecimiento en el cruzamiento VIII, en el que la respuesta al crecimiento a 12 °C es de 1° grado

(lineal), indicando cierta ralentización en el crecimiento, mientras que a 22° C la respuesta es de 2° grado (cuadrática), porque estos procesos se verían favorecidos por la temperatura. La respuesta de 3° grado o cúbica en el cruzamiento III a ambas temperaturas indica el cambio metabólico que se produciría a las 24 h a 22° C y al tercer día a 12° C coincidiendo con el descenso de la velocidad y en ambos casos con el tercer muestreo.

La velocidad de crecimiento en el estilo del híbrido 'Cachirulo' es variable y se observa que los tubos polínicos del otro híbrido 'Balones' alcanzan antes la base del estilo que cualquiera de los otros polinizadores, *P.tomentosa*, *P.cerasifera* y el híbrido de *P.cerasifera* x *P.amygdalus*. Estas velocidades de crecimiento menores de especies pertenecientes al subgénero *Prunophora* en el estilo de especies de *Amygdalus* ya ha sido señalado anteriormente en cruzamientos interespecíficos de este género (COYLE, 1982; PEREZ y MOORE, 1985). Se observa una similitud entre las dos especies de *P.cerasifera* y su híbrido; esta similitud entre V y VI, puede atribuirse a las características del polen y a la clasificación que se ha propuesto en estas especies para tubos polínicos rápidos y lentos (PEREZ y MOORE, 1985). Siendo autocompatible el híbrido 'Cachirulo', los dos cruzamientos se explicarían según la incompatibilidad unilateral, ya que ésta se manifiesta en el caso de autoincompatibilidad del receptor del polen, por lo que el cruzamiento SCxSI es compatible (LEWIS y CROWE, 1958) y no importaría la autocompatibilidad de ninguna de las especies polinizadoras, ya sea del mirabolán o de su híbrido.

La diferencia en el crecimiento entre los cruzamientos II y III es mayor a las primeras horas después de la polinización, lo que puede ser debido a un retraso en la germinación y la emisión del tubo como se ha observado en tubos incompatibles en el almendro (PIMIENTA *et al.*, 1983; SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1987), ya que este retraso no afecta al crecimiento posterior del tubo, pues en ambas alcanza la base del estilo. Ello viene indicado por la respuesta de 2° grado (cuadrática) del cruzamiento III a 22° C, que es un crecimiento más ralentizado, y de 3° grado (cúbica) en el cruzamiento II, en la que las reservas se agotarían antes. A partir de las 16 h la velocidad disminuye en el cruzamiento II, mientras que en el III, esto ocurre a las 32 horas después de la polinización cuando los tubos han alcanzado el 75% de su recorrido en ambos cruzamientos. Se supone que el cambio de metabolismo ocurriría

entonces y se haría el cribado de los tubos que han de alcanzar la base del estilo (HERRERO 1992b).

En los otros dos cruzamientos interespecíficos de 'Cachirulo' la respuesta es muy similar, de 2° grado a ambas temperaturas, excepto en el V que es lineal, probablemente porque un punto es estimado y se ve que en el cruzamiento VI los tubos llegan antes al ovario. Pero estas diferencias también reflejan cierta influencia que puede ejercer el pistilo en la cinética de diferentes tubos polínicos como se ha señalado en melocotonero (HERRERO y ARBELOA, 1989).

Es muy curioso el comportamiento de los dos clones de mirobolán que alcanzan una velocidad elevada a las 8 h, pero después hay una disminución de la velocidad, al igual que en el híbrido. En el híbrido este cambio parece más evidente, como indica su respuesta de 3° grado (cúbica) a 22°C. Esto puede explicarse en términos de la alimentación del tubo porque se agotan antes las reservas en el caso de los dos cruzamientos interespecíficos.

En los cruzamientos IX y X, en los que interviene *P. insititia*, los tubos polínicos alcanzan la base de los pistilos de *P. domestica* antes que en los propios. La velocidad es muy similar a la observada "in vitro" para *P. domestica* autopolinizado (PEREZ y MOORE, 1985) y a la longitud alcanzada en este mismo cruzamiento interespecífico (COYLE, 1982). Las dos especies están catalogadas como parcialmente autocompatibles, y según la teoría de la incompatibilidad unilateral el cruzamiento de dos especies autocompatibles (SC x SC) resulta compatible (LEWIS y CROWE, 1958, DE NETTANCOURT, 1977). La diferencia más notable es en la distancia recorrida el primer día o las primeras horas según la temperatura, lo cual indicaría un cierto retraso en la germinación del polen en el cruzamiento intraespecífico, retraso que después, como se ha observado en autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, no afecta al crecimiento total de los tubos (PIMIENTA *et al.*, 1983; SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1987).

Llamó la atención el comportamiento curioso del polen de 'Montizo' en el estigma del otro clon de pollizo, pues se observa un retraso mucho mayor en la germinación del polen en

el cruzamiento intraespecífico que en el interespecífico, aunque posteriormente el crecimiento se iguala prácticamente. Esto puede ser debido a que en el estigma se presente un cierto nivel de incompatibilidad gametofítica (PIMIENTA *et al.*, 1983) o a cierta autoincompatibilidad de *P. insititia* (WATKINS, 1979), ya que se trata de una especie hexaploide que se comporta como un poliploide secundario, por lo que puede presentar diferentes niveles de autoincompatibilidad como en el ciruelo europeo (SUTTON, 1918).

El cruzamiento IX, que es interespecífico, tiene un comportamiento diferente a los cruzamientos I y VII porque el crecimiento no es de 3° grado a 12°C y podría indicar que las especies son interincompatibles y el polen tarda en reconocer a su propia especie tanto como en el interespecífico, aunque alcance antes el ovario. La menor velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento IX comparada con la velocidad de los tubos polínicos en el otro cruzamiento intraespecífico VII, de los ciruelos diploides o mirobolanes, se ha observado también en cruzamientos intraespecíficos entre estos dos tipos de ciruelos, en los que los tubos de las especies hexaploides crecen más lentamente que los de las especies diploides (ROY, 1938).

Quizás el sistema de incompatibilidad que actúa en estos cruzamientos difiera del descrito para *Nicotiana*, que posee autoincompatibilidad gametofítica como en el género *Prunus*, de manera que el gen S controla estrictamente el modelo de incompatibilidad unilateral expresada uniformemente por la parada de los tubos de polen en el estilo (PANDEY, 1969). En el género *Prunus* pueden producirse errores en el metabolismo de los carbohidratos (WILLIAMS *et al.*, 1982) y que aparezca un espectro más amplio de incompatibilidad o más bien incongruencia (HOGENBOON, 1975); igualmente el pistilo pueda condicionar unas diferencias determinadas en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos (FENSTER y SORK, 1988; SOCIAS i COMPANY, 1988).

ESTUDIO DEL OVULO



2. ESTUDIO DEL OVULO Y FECUNDACION

2.1. INTRODUCCION.

2.1.1. Descripción del proceso de fecundación.

La principal función del grano de polen, a través del tubo que emerge de él, es la de liberar 2 gametos masculinos en el saco embrionario para la consecución de un hecho característico de las angiospermas, la doble fecundación (HESLOP-HARRISON, 1987), que fue descubierta en Francia a principios de siglo por Guignard (DUMAS *et al.*, 1985).

El crecimiento del tubo polínico desde el estigma hasta la base del ovario provoca una secreción por parte de células ricas en almidón, cuyas reservas se movilizan tras la polinización (HERRERO y DICKINSON, 1979; HERRERO y ARBELOA, 1989). Estas secreciones alimentan y guían al tubo polínico (SEDGLEY y BUTTROSE, 1978; TILTON y HORNER, 1980). Cuando el tubo de polen alcanza la base del estilo y se acerca al ovario se encuentra con el obturador, que es una protuberancia de la placenta que conecta el estilo con el micropilo del óvulo (TILTON y HORNER, 1980) y que puede tener un papel trófico y mecánico en la guía del tubo polínico (TILTON *et al.*, 1984), con un papel muy activo en el control de su crecimiento (ARBELOA y HERRERO, 1987; HERRERO, 1992a). En melocotonero (*P.persica*), se ha observado que cuando los tubos llegan al obturador detienen su crecimiento y no lo reanudan hasta 5 días más tarde (HERRERO y ARBELOA, 1989). Las células del obturador están llenas de almidón cuando los tubos llegan, pero estas reservas desaparecen a los 5 días cuando se observa una secreción de carbohidratos y proteínas (ARBELOA y HERRERO, 1987). Este proceso que tiene lugar en el obturador parece ser que es independiente de la polinización y que ocurre de igual forma en flores sin polinizar, ya que parece ser un índice del estado de madurez del pistilo (ARBELOA y HERRERO, 1987).

La embriogenesis del género *Prunus* es del tipo *Polygonum* (MAHESHWARI, 1950), con un saco embrionario que contiene 8 núcleos haploides en 7 células. Estas 7 células son:

las dos sinérgidas que junto con la célula huevo forma el aparato huevo; la célula central que contiene dos núcleos llamados núcleos polares; y las tres células antípodas situadas en posición opuesta al aparato huevo. Un espermatozoide se fusiona con la célula huevo para dar lugar a un embrión; el otro espermatozoide se fusiona con los dos núcleos polares de la célula central para dar lugar al endospermo, que dado este origen es triploide.

Las secuencias de la polinización fueron establecidas por JENSEN (1973) mediante estudios al microscopio electrónico. El tubo de polen entra en el saco embrionario a través de una sinérgida que degenera y en la que descarga su contenido. Las paredes celulares alrededor de las sinérgidas y de la célula huevo están incompletas y el núcleo espermático puede moverse en el espacio periplásmico entre las membranas del plasma de la célula huevo y la célula central; se produce la fusión celular de las células espermáticas con la célula huevo y la célula central con la correspondiente fusión nuclear de los núcleos espermáticos con los núcleos de la célula huevo y los dos núcleos polares de la célula central (VAN WENT y WILLESEN, 1984; KNOX *et al.*, 1986).

El destino de uno y otro espermatozoide no es aleatorio, pues el equipo de DUMAS demostró que ambos espermatozoides difieren uno del otro por el ADN de sus orgánulos citoplasmáticos, así como por sus cloroplastos y mitocondrias (DUMAS *et al.*, 1985). Es el espermatozoide rico en plastos el que se fusiona con la otra célula huevo y el otro rico en mitocondrias fecunda la célula central.

2.1.2. Desarrollo de las estructuras ovulares en *Prunus* L.

El saco embrionario de las angiospermas se encuentra encerrado en unas estructuras ovulares muy diferenciadas, rodeado de capas cuticulares, que sugieren un papel protector del saco embrionario (ESAU, 1977). Otros autores asocian a estos tejidos un papel nutricional (MOGENSEN, 1973; HAWKER y BUTTROSE, 1980).

Los estudios en el desarrollo de las estructuras ovulares en el género *Prunus* en el

momento de la antesis no son muy numerosos, mientras que el estudio del desarrollo de embrión y del endospermo es más detallado (LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971; HAWKER y BUTTROSE, 1980). Las anomalías en el desarrollo del megagametofito son frecuentes y se han descrito numerosos tipos (HARTMAN y HOWLETT, 1954; EATON y JAMONT, 1964; PIMIENTA y POLITO, 1983; FURUKAWA y BUKOVAC, 1989).

En el momento de la antesis el porcentaje de óvulo en mal estado varía de unas especies a otras, pudiendo ser de 25 a 40% en cerezo, *P. avium* (FURUKAWA y BUKOVAC, 1989) o un 78% de anomalías en albaricoquero *P. armeniaca* (EATON y JAMONT, 1964). Estas anomalías pueden tener orígenes diferentes y se han relacionado con la existencia de más de una célula madre; con el desarrollo del saco embrionario, no sólo de la megaspóra más próxima a la calaza sino de cualquier célula de la tétrada (EATON y JAMONT, 1964); o con la existencia de más de 4 núcleos o de menos, lo que se considera no funcional (FURUKAWA y BUKOVAC, 1989). PIMIENTA y POLITO (1982) encontraron que en óvulos abortados es frecuente la carencia de saco embrionario o un retraso en la diferenciación de la célula madre de la megaspóra. HARTMAN y HOWLETT (1954) atribuye este retraso en el desarrollo y la degeneración temprana en óvulo de manzano a factores genéticos. MOGENSEN (1975) también señala que en óvulos abortados en *Quercus* no hay sacos embrionarios y cuando los hay están vacíos. SOCIAS i COMPANYY *et al.* (1976) muestran en una selección de híbridos melocotonero x almendro que aparece de forma consistente un subdesarrollo del óvulo y RALLO *et al.* (1981) que un alto porcentaje de óvulos poseen sacos poco desarrollados en olivo.

Cada ovario en *Prunus* está formado por un solo carpelo que contiene dos óvulos (DORSEY, 1919b; BRADBURY, 1929; TUKEY, 1936; EATON y JAMONT, 1964; THOMPSON y LIU, 1973; PIMIENTA y POLITO, 1983). El desarrollo de los óvulos es muy irregular y como en la mayoría de las drupáceas, sólo uno de ellos se desarrolla en semilla (EATON y JAMONT, 1964; HAWKER y BUTTROSE, 1980; PIMIENTA y POLITO, 1982; STÖSSER y ANVARI, 1982; HERRERO *et al.*, 1988; ARBELOA y HERRERO, 1991).

La degeneración de uno de los óvulos después de la polinización ha sido estudiada en

detalle en el cultivar de almendro 'Nonpareil' (PIMIENTA y POLITO, 1982), pero la presencia de pepitas dobles en otros cultivares como 'Guara' (SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1993) indica que la degeneración de uno de los dos óvulos no es un fenómeno aplicable a todas las variedades, ya que la presencia de pepitas dobles se debe a la fecundación de ambos óvulos, relacionándose con la viabilidad de los dos y con el concepto de calidad de flor y la diferencia entre flores fuertes y débiles en las que la longevidad del óvulo es menor (WILLIAMS, 1965), así como con la evolución en la apertura de las flores, como se ha observado en el almendro (SOCIAS i COMPANY, 1983) y con los efectos de las temperaturas bajas que alargarían la longevidad del óvulo al igual que frenarían el crecimiento de los tubos polínicos (PIMIENTA *et al.*, 1983).

Tradicionalmente se había asumido que la maduración del megagametofito en *Prunus* coincidía con la antesis (DORSEY, 1919a; BRADBURY, 1929; TUKEY, 1933; EATON, 1959) pero posteriormente se ha observado que existe un retraso en la maduración del megagametofito (JEFFERIES, 1975; PIMIENTA y POLITO, 1983; ARBELOA y HERRERO, 1991). En frutales como el manzano la maduración del gametofito coincide con la antesis (COSTA-TURA y MACKENZIE, 1990). Sin embargo, cuando los tubos de polen alcanzan el saco embrionario el desarrollo es completo (HERRERO y ARBELOA, 1989). El saco embrionario se encuentra dentro de la nucela que comprende varias capas de células. En melocotonero se ha observado que el megagametofito se desarrolla por igual en flores polinizadas que en las no polinizadas (ARBELOA y HERRERO, 1991), pero en almendro las flores no polinizadas o polinizadas con un polen incompatible se observa una falta de la elongación del saco. El saco se alargaría en el momento de la fecundación por estímulo del polen compatible hacia el extremo de la calaza en la nucela (PIMIENTA y POLITO, 1983).

Los tubos de polen entran en el ovario, guiados por el obturador (TILTON *et al.*, 1984; ARBELOA y HERRERO, 1987), que facilita la penetración del tubo de polen hacia el micropilo. En las células del obturador se encuentran células llenas de almidón, que desaparece cuando los tubos polínicos han pasado y se produce una secreción (ARBELOA y HERRERO, 1987).

Una vez los tubos de polen pasan por el obturador se encuentran con el exostoma, formado por una prolongación de las células del tegumento y por el extremo de la nucela por donde ha de pasar el tubo hacia el saco. El exostoma acercaría ambas estructuras y facilitaría la penetración (HERRERO y ARBELOA, 1989; ARBELOA y HERRERO, 1991), aunque algún tipo de estímulo quimiotrópico puede que sea necesario para guiar la fecundación como ocurre en otras especies (TILTON y LERSTEN, 1981). Otros tipos de control sobre la entrada de los tubos polínicos en el ovario han sido descritos en otras especies (HESLOP-HARRISON, 1965; COSTA-TURA y MACKENZIE, 1990). Los tubos de polen crecen por el canal micropilar hacia la nucela, donde se observa un canal de células que degeneran y que podrían estar relacionadas con el crecimiento de los tubos (PIMIENTA y POLITO, 1982, 1983; ARBELOA y HERRERO, 1991).

En frutales, concretamente en melocotonero, se ha observado un desfase entre la llegada de los tubos polínicos a la base del ovario y el momento en que tiene lugar la fecundación (ARBELOA y HERRERO, 1987; HERRERO y ARBELOA, 1989). La existencia de este desfase de tres días desde que pasa por el canal micropilar y de otros tres hasta que se produce la fecundación, sugiere que el óvulo necesita alcanzar un estado de maduración para que se produzca la fecundación (HERRERO, 1992a); este desfase se ha observado en otras especies, sugiriendo que puede deberse a un factor quimiotrófico (JENSEN *et al.*, 1983).

Los tubos polínicos llegan al ovario afectando a las estructuras ovulares y produciendo una activación en el ovario (LINSKENS, 1974). Este estímulo no altera la maduración del saco embrionario, aunque sí se ha visto, al menos en peral, que hay un retraso en su maduración (HERRERO y GASCON, 1987; HERRERO *et al.*, 1988), lo cual ayudaría a que se llevara a cabo la fecundación del mismo al alargar el período receptivo.



2.1.3. Fecundación en las distintas especies.

WENT (1887) y PECHOUTRE (1902) fueron los primeros en realizar diversos estudios del desarrollo del óvulo y del saco embrionario de las *Rosaceas* (JEFFERIES, 1975).

Los estudios posteriores realizados en el género *Prunus* en relación con la reproducción y la biología floral comenzaron en ciruelo (DORSEY, 1919a). Posteriormente en melocotonero RANGLAND (1934), observó que el saco embrionario está preparado para la fecundación 10-16 días después de que la yema comience a abrir. Un estudio anatómico detallado desde la floración al cuajado fue realizado por LILIEN-KIPNIS y LAVEE (1971) quienes concluyen que las condiciones climáticas de cada área de cultivo, influyen notablemente en los diferentes estados de desarrollo y en las características de cada variedad. El resto de estudios en la mayoría de las especies se han centrado más bien en el desarrollo del fruto (BRADBURY, 1929; TUKEY, 1936; TUKEY y YOUNG, 1939; STERLING, 1953; JACKSON y COOMBE, 1966).

Con técnicas histoquímicas se realizó un estudio en dos variedades de almendro centrándose en el desarrollo del ovario sin especificar el día en que se produce la fecundación (HAWKER y BUTTROSE, 1980). Con este mismo tipo de técnicas se ha observado en melocotonero que la fecundación se realiza alrededor del día 19 después de la antesis (ARBELOA y HERRERO, 1987). PIMIENTA *et al.* (1983) indican que la fecundación en la variedad de almendro 'Nonpareil' se produce en el óvulo primario alrededor del día 10 después de la polinización, mientras el otro óvulo muestra signos de degeneración (PIMIENTA y POLITO, 1982, 1983).

En ciruelos los estudios realizados en biología floral se centraron principalmente en el estudio de la autocompatibilidad y autoincompatibilidad desde el punto de vista de la producción comercial (JEFFERIES, 1975). Un estudio detallado de la histogénesis y la organización vascular fue realizado por STERLING (1953). La influencia de la temperatura en el período de postantesis es importante para que se lleve a cabo la fecundación, pues en el ciruelo se ha indicado que son necesarios 21 días para la fecundación en un año frío y 10 días en un año

cálido (DORSEY, 1919b).

El estudio del desarrollo postzigótico en ciruelo europeo (JEFFERIES, 1975) mostró que a la 4ª semana después de la antesis hay ya de 4 a 8 células en el embrión, por lo que es de suponer que la fecundación se realiza entre la 3ª y la 4ª semana.

En albaricoquero, que pertenece al mismo subgénero que el ciruelo, se ha estudiado el desarrollo de los sacos embrionarios, centrándose únicamente en el número de sacos viables que hay en el momento de la antesis (EATON y JAMONT, 1964) y en el tipo de anomalías que puedan presentarse, indicando que sólo el 22% de los sacos embrionarios tienen células huevo funcionales. FAROOK-LODHI (1962) señala la diferente citología de los cultivares autocompatibles y autoincompatibles sin detallar el proceso de fecundación. Un trabajo reciente de prospección de algunas variedades de albaricoquero indica que la fecundación se realiza 10 días después de la antesis en la variedad más adelantada (BURGOS, 1991).

En el cerezo los primeros trabajos en el estudio de la biología floral se hicieron por TUKEY (1933), detallando la evolución del fruto. BRADBURY (1929) indicó el aborto de embriones en relación a la abscisión del fruto. La evolución y el estudio de los óvulos muestran un porcentaje muy alto de anomalías en los sacos embrionarios (EATON, 1959). Más tarde el trabajo de polinización en cerezo indica que los tubos polínicos han alcanzado el óvulo y la fecundación se ha podido llevar a cabo 4 ó 5 días después de la antesis (STÖSSER y ANVARI, 1982).

2.1.4. Técnicas para superar fracasos en la fecundación.

La fecundación ha fracasado en muchos cruzamientos interespecíficos en los que el tubo polínico alcanza el ovario pero no penetra en el óvulo, como ocurre en *Vicia faba* x *V. narbonensis*, (PICKERSGILL, 1991), porque los tubos pueden detener su crecimiento dentro del ovario (SAMIMY, 1991), o porque los tubos de polen entra en el saco pero no descargan las células espermáticas como ocurre en *Rhododendron* (WILLIAMS *et al.*, 1990). Estas

barreras son difíciles de superar porque se conoce muy poco sobre el control de la fertilización o cómo puede ser manipulada.

Las diversas técnicas descritas para superar las barreras de hibridación prezigóticas en diversos géneros, como son la polinización de yemas, la polinización en los estilos cortados y la polinización "in vitro", no han dado buenos resultados en *Prunus* (COYLE, 1982; SCHMIDT, 1972). Otros autores señalan que estas técnicas han tenido éxito en hibridaciones interespecíficas en especies tanto de autoincompatibilidad esporofítica como *Brassica* (BROWN, *et al.*, 1991), como en especies de autoincompatibilidad gametofítica como *Lycopersicum* (GRADZIEL y ROBINSON, 1989, 1991). La polinización de yemas según DE NETTANCOURT (1977) no ha dado buenos resultados en cruzamientos interespecíficos, aunque sí para superar la autoincompatibilidad. A pesar de que recientemente se ha señalado útil para superar la incompatibilidad interespecífica en manzano (SURIKOV, 1987).

La polinización "in vitro" ha resultado ser una técnica útil para superar barreras en los cruzamientos interespecíficos. Una amplia revisión del uso de esta técnica ha sido hecha por ZENKTELER (1990). Ha sido un método utilizado especialmente en *Gramineas*, donde se presenta también una autoincompatibilidad gametofítica. Sin embargo, los factores que se manifiestan "in vivo" pueden activarse también "in vitro" y pueden deberse a la presión de selección que actúa a nivel prezigótico, por lo que los óvulos más cercanos a la base del estilo son los que tienen más probabilidad para ser fecundados (LEDUC *et al.*, 1990).

Existe más de un ejemplo en cruzamientos interespecíficos e intragenéricos con autoincompatibilidad gametofítica en los que la incompatibilidad se pueda manifestar a nivel del estilo en unos cruzamientos y a nivel del ovario en otros (MOHINDRA y MINOCHA, 1991).

Mediante la aplicación de polen directamente en los óvulos, la inyección de una suspensión de polen en una solución en el ovario o la polinización de los óvulos extirpados, se han obtenido plántulas intraespecíficas en *Papaver nudicaule* (OLSON, 1981), en *Brassica oleracea*, *Petunia violacea* (SHIVANNA, 1965) y en *Glicine max* (TILTON y RUSSEL, 1983).

La polinización "in vitro" directamente en la cavidad placentar para la producción de híbridos interespecíficos ha dado buenos resultados en *Primula*, donde se obtuvieron embriones de forma globular (SHEHATA y ZENKTELER, 1991).

La fecundación de gametos aislados en plantas de maíz se ha utilizado para estudiar el proceso de fecundación y desarrollo temprano del embrión (KRANZ y LORZ, 1992).

Otras técnicas se han desarrollado para soslayar los problemas de la reproducción sexual en la obtención de híbridos. Posiblemente la técnica más importante de este tipo es la fusión de protoplastos para la formación de híbridos somáticos "in vitro". Se han obtenido plantas de cerezo por este método (OCHATT *et al.*, 1987, 1989; OCHATT y POWER, 1988). Otro intento ha sido el de regenerar plantas de melocotonero a partir de protoplastos, técnica que de momento no ha tenido éxito en *Prunus*, si bien en otros géneros se han obtenido híbridos interespecíficos directamente de *Citrus* y *Severinia* (GROSSER *et al.*, 1988), siendo el primer caso en que se ha conseguido en plantas leñosas.

2.2. MATERIAL Y METODOS.

2.2.1. Cruzamientos intra e interespecíficos analizados.

Para el estudio histológico del proceso de fecundación se eligieron cuatro cruzamientos, dos cruzamientos intraespecíficos (uno entre dos albaricoqueros y otro entre dos mirobolanes) y dos interespecíficos, (uno entre mirobolán y albaricoquero y otro entre un híbrido de mirobolán y almendro con un clon de la especie silvestre *P. tomentosa*). Esta elección se ha hecho con el fin de estudiar dos cruzamientos compatibles, intraespecíficos, otro interespecífico, también supuestamente compatible y por último uno interespecífico de dos especies menos relacionadas y por lo tanto supuestamente incompatible.

Cruzamientos intraespecíficos:

- I. 'Moniquí' (*P. armeniaca*) X 'Canino' (*P. armeniaca*)
 VII. 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*) X 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*)

Cruzamientos interespecíficos:

- IV. 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*) X 'Moniquí' (*P. armeniaca*)
 VIII. 'GF 31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*) X *P. tomentosa*

Para el estudio histológico se utilizaron flores emasculadas en estado D (BAGGLIOLINI, 1984) en los cruzamientos realizados en campo (apartado 4.2.) durante la primavera de 1991 y fijadas posteriormente, el día de la antesis (día 0) y secuencialmente tras la polinización: 10, 15, 20 y 25 días después de la antesis.

El orden de floración de las distintas especies es un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de plantear los cruzamientos. El orden de floración de las especies implicadas en los cruzamientos elegidos se refleja en el cuadro 2.2.1.

CUADRO 2.2.1. Fechas de antesis y plena floración de las especies polinizadas y polinizadoras.

Variedad Polinizada♀	Día Antesis	Variedad Polinizadora♂	Día Floración
Moniquí	13/3/91	Canino	10/3/91
Myrobolán 605	12/3/91	Myrobolán B	16/3/91
Myrobolán B	16/3/91	Moniquí	13/3/91
GF 31	15/3/91	<i>P. tomentosa</i>	10/3/91

2.2.2. Preparación del material para su observación al microscopio.

Se recogieron 5 muestras de flores emasculadas sin polinizar y 10 flores emasculadas y polinizadas manualmente para cada cruzamiento. Las muestras se tomaron el día 0 (antesis), 10, 15, 20 y 25 días después de la antesis, de forma aleatoria en las ramas en la que se habían realizado las emasculaciones y polinizaciones en el campo.

2.2.2.1. Fijación del material.

Las flores se fijaron en el momento de la recogida en una solución fijadora F.A.A. de etanol 70%: formol 40%: ácido acético (18:1:1) (JOHANSEN, 1940), durante al menos 4 horas. Los pelos de la pared del ovario fueron previamente afeitados con un escalpelo para que no dificultaran la realización de los cortes. En el caso del día 0, se fijó la flor completa con pistilo, pero en el día 10 y posteriores no fue necesario ya que en el pistilo se encontraba en la mayoría de los casos en estado necrosado y sólo se fijó el ovario. Las flores almacenadas en fijador se conservaron a 4-5° C hasta su preparación para examen microscópico.

2.2.2.2. Inclusión y cortes del material en parafina.

Las flores, una vez fijadas, se pasaron por una serie de alcohol butírico terciario (TBA) cada vez más concentrado hasta utilizarlo puro; de esta forma se deshidrató y posteriormente se infiltró en parafina (JENSEN, 1962) quedando listo para el corte. La serie y los tiempos fueron los siguientes:

DIA	SOLUCIÓN	TIEMPO
1	50% TBA	3 horas
	70% TBA	17 horas
2	85% TBA	1,5 horas
	95% TBA	"
	100% TBA	"
	TBA I puro	"
	TBA II puro	"
	TBA III puro	15 horas
3	TBA + Aceite parafinado	24 horas
4	Material en la mezcla sobre parafina a 60° C	24 horas
5	Parafina I	6 horas
	Parafina II	17 horas
6-7	Parafina II	48 horas
8	Parafina III	24 horas
9	Inclusión	

La parafina empleada para la inclusión en bloques fué de 51-53° C de fusión. Los bloques se tallaron y los cortes se realizaron con un microtomo de rotación dándoles un grosor de 10 μ y se colocaron de forma seriada sobre un portaobjetos impregnado previamente con pegamento de Haupt (HAUPT, 1930) y una solución de formaldehído al 3% que evita la posible contaminación de las muestras. Los portas se secaron en una estufa caliente a 40° C.

Para la tinción, los cortes de parafina deben pasar por un proceso de desparafinado con xileno y de hidratación en una serie de alcoholes, hasta un nivel de hidratación del tinte empleado en cada caso. Los tiempos y concentraciones empleados han sido los siguientes:

SOLUCION	TIEMPO
Xileno I	2 Minutos
Xileno II	"
Xileno III	"
Xileno/Etanol (1/1)	"
Etanol 100%	"
Etanol 70%	"
Etanol 40%	"
Agua destilada	"

2.2.2.3. Observación microscópica con luz normal.

2.2.2.3.1. Tinción Gerlach.

El método de tinción tricrómica de GERLACH (1969) consiste en los pasos siguientes:

- Desparafinado e hidratación hasta etanol del 40%.
- Safranina al 3% en etanol del 50% - 1 hora.
- Lavado con agua 3 o 4 veces.
- Cristal violeta al 1% en agua- 1,5 minutos.
- Lavar con agua 3 o 4 veces.
- Lavar con etanol 90%, dos veces durante 2 minutos cada vez.
- Verde luz al 0,25% en etanol 90. Se procede desde este momento con cada porta por separado. Se tiñen hasta que se desplaza el cristal violeta.
- Isopropanol I- 2 minutos.
- Isopropanol II- 2 minutos.
- Xileno.

-Montar el cubre con resina DPX (DIFCO).

Esta tinción diferencia los núcleos y material genético que se tiñen de rojo, las paredes celulares y citoplasma de verde y el almidón de violeta. Con esta técnica se examinaron las flores desde el día 10 para ver la evolución de los óvulos y constatar la presencia de endospermo o embrión.

2.2.2.3.2. Tinción de almidón.

Para la observación de las reservas de almidón se utilizó la tinción IKI (JOHANSEN, 1940). Para ello, los cortes de parafina, hidratados hasta agua, se tiñeron durante 5 minutos con la solución IKI (2 g de yoduro potásico (IK), 0,2 g de yodo y 1000 ml de agua). Se montaron directamente con la solución y se observaron al microscopio.

2.2.2.4. Observación microscópica con luz ultravioleta.

2.2.2.4.1. Tinción de callosa.

Los cortes hidratados hasta agua se tiñeron con una solución de azul de anilina al 0,1% en PO_4K , 0,1 N (LINSKENS y ESSER, 1957; MARTIN, 1959) durante 1 hora. Las observaciones se realizaron directamente sobre el cubre con una gota de tinción, en el microscopio con iluminación ultravioleta con filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460). Esta tinción sirve para ver la callosa que se deposita en los tejidos degenerados. Aunque ha sido discutida la especificidad de este método (apartado 1.2.2.2), sigue siendo el método aceptado para ver callosa (HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON, 1981; DUMAS y KNOX, 1983).

2.3.RESULTADOS.

2.3.1. Estado de los ovarios en antesis.

Las cuatro variedades utilizadas en este ensayo para el estudio histológico, florecieron en la segunda decena de Marzo (Cuadro 2.2.1.). Las primeras muestras se tomaron este día de la antesis (día 0), momento en el que no se diferencian los tres componentes del ovario (endocarpio, mesocarpio y epicarpio), sino que sólo se distingue la epidermis, que presenta largos pelos. Dentro del lóculo se distinguen dos óvulos, cada uno con su obturador, que es un engrosamiento de la placenta por encima del micrópilo del óvulo, cuyas células más externas se diferencian por su forma papilar. Los dos obturadores están separados por una sutura longitudinal a lo largo de la línea ventral. En la antesis los dos obturadores están desarrollados en su máximo tamaño en proporción a los óvulos y al lóculo (Foto 2.1.a). Los óvulos son anátropos y presentan dos tegumentos separados en su zona micropilar y unidos en la calaza, así como una nucela con células diferenciadas en la zona micropilar donde se formará el saco embrionario (Foto 2.1.b). En la antesis el almidón se presenta en forma de gránulos pequeños en las células del obturador y en la zona micropilar del tegumento (Foto 2.1.c) y en la nucela en las células superiores alrededor del saco embrionario (Foto 2.1.d).

2.3.2. Desarrollo de los óvulos y el megagametofito.

Durante los días que siguen a la antesis un óvulo se desarrolla más que el otro. El óvulo que queda retrasado en su crecimiento con el tiempo degenera, llamándose óvulo secundario (Foto 2.1.e). Alrededor del día 10 después de la antesis el óvulo secundario se encuentra degenerado en todos los ovarios examinados y se pueden observar deposiciones de callosa alrededor de toda la pared externa del óvulo al igual que la nucela que degenera en todos ellos (Foto 2.1.f). Este proceso se observa en todos los cruzamientos analizados.

En el óvulo viable se observa el megagametofito, que ocupa aproximadamente 1/3 del

óvulo en los cuatro clones estudiados. A los 15 días el saco se ha alargado y se observa que ocupa alrededor de 2/3 de la extensión de óvulo en 'Moniquí' y en los dos mirabolanes, 'Mirobolán AD 605' y 'Mirobolán B', pero no ha aumentado en el híbrido 'GF-31'. Este a los 20 días se encuentra en el mismo estado de desarrollo, al contrario que en 'Moniquí', 'Mirobolán AD 605' y 'Mirobolán B' en los que ocupa toda la longitud del óvulo. A los 20 días sólo quedan restos del tegumento del óvulo secundario, tanto en 'Moniquí' como en los dos Mirobolanes, mientras que en el híbrido 'GF-31' ya no se observan restos de ningún tejido del óvulo secundario, que se encontraría totalmente degenerado.

2.3.3. Cambios en el ovario al paso del tubo hacia el óvulo.

Los tubos polínicos alcanzan la base del estilo y el extremo superior del obturador, que presenta los depósitos de almidón. A medida que el tubo polínico va creciendo por el obturador y el micropilo, el almidón va desapareciendo. Este fenómeno se observa alrededor del día 10 (Foto 2.2.a), y al día 15, en el que el tubo ya ha pasado, al proseguir su camino hacia la unión con la ovocélula, prácticamente no se observa almidón (Foto 2.2.b). El almidón del tegumento alrededor del micropilo puede observarse que el día 25 ha desaparecido, tanto en los cruzamientos intraespecíficos como en los interespecíficos. En la células superiores de la nucela se observa almidón alrededor del día 10 (Foto 2.2.c) que va desapareciendo conforme el saco embrionario va aumentando de tamaño como se ve alrededor del día 15 (Foto 2.2.d).

La pérdida de almidón va seguida de la acumulación de callosa en las paredes de la células del obturador, lo que indica que se produce una degeneración celular (Foto 2.2.e), y ya en el día 20, la callosa se encuentra completamente extendida hacia el interior, con las células degeneradas que presentan el aspecto de un pequeño residuo con mucha callosa (Foto 2.2.f).

FOTO 2. 1.

FOTO 2.1. ESTADO DE LOS OVULOS EN ANTESIS Y DEGENERACION POSTERIOR

FOTO 2.1.a. Ovario de 'Moniquí' con los dos óvulos (o) y dos obturadores (ob) en el mismo estado de desarrollo en antesis (86.45 X).

FOTO 2.1.b. Extremo micropilar (mp) de la nucela con células diferenciadas de la nucela (nu) donde se formará el saco embrionario (flecha). Tinción de azul de anilina (548X).

FOTO 2.1.c. Obturador (ob) y micropilo (mp) en antesis con almidón en las células antes del paso del tubo polínico. Tinción de IKI (448 X).

FOTO 2.1.d. Células de la nucela (nu) en el extremo micropilar alrededor del saco embrionario con almidón (flechas) en antesis. Tinción de IKI (448X).

FOTO 2.1.e. Ovulos de 'Mirobolán B' a los 10 días después de la antesis con el óvulo secundario (os) de menor tamaño y el óvulo primario (op) que sigue su desarrollo (86.45 X).

FOTO 2.1.f. Ovulo secundario (os) degenerado con acumulación de callosa en el tegumento (flecha) y con la nucela degenerada, y el óvulo primario (op) con la nucela (nu) desarrollada, 20 días después de la antesis. Tinción de azul de anilina (219 X).

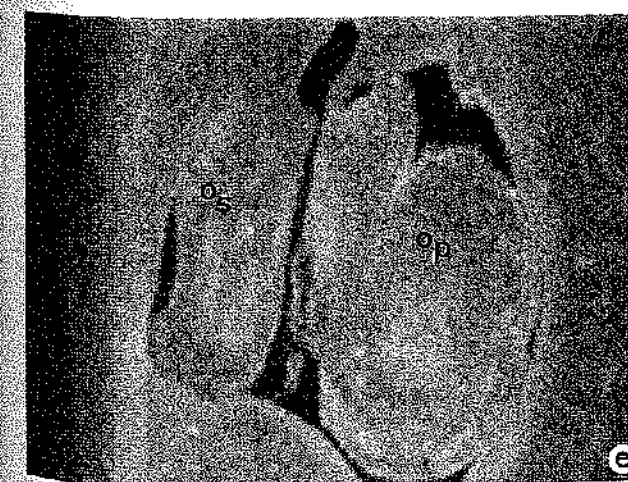
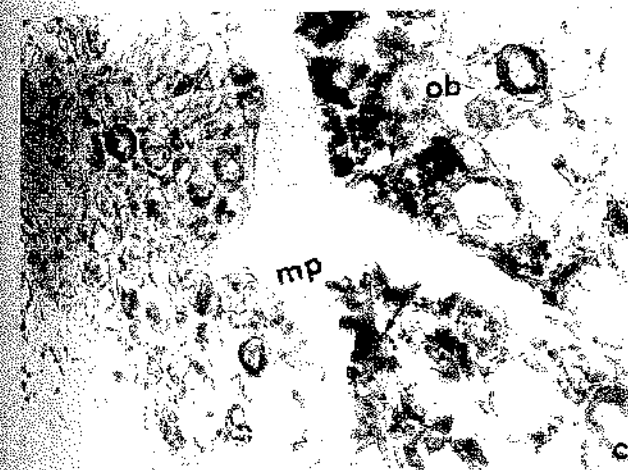
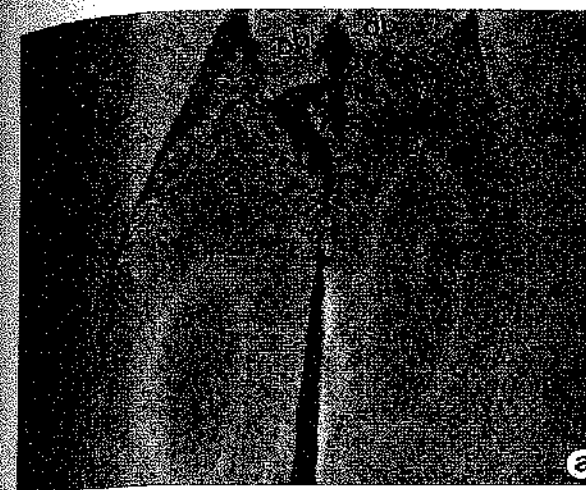


FOTO 2. 2.

FOTO 2.2. CAMBIOS EN EL OVULO DESPUES DE LA ANTESIS

FOTO 2.2.a. Obturador (ob) y micropilo (mp) con gránulos de almidón (flecha) en las células a los 10 días después de la antesis, antes del paso del tubo polínico. Tinción de IKI (179 X).



FOTO 2.2.b. Obturador (ob) y micropilo (mp) sin granulos de almidón en las células a los 15 días después de la antesis, después del paso del tubo polínico. Tinción de IKI (179 X).

FOTO 2.2.c. Células alrededor del saco embrionario (se) con almidón (flecha) a los 10 días después de la antesis. Tinción de IKI (448 X).

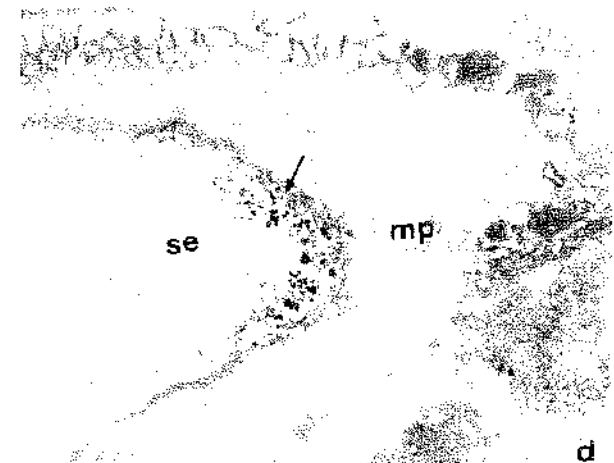
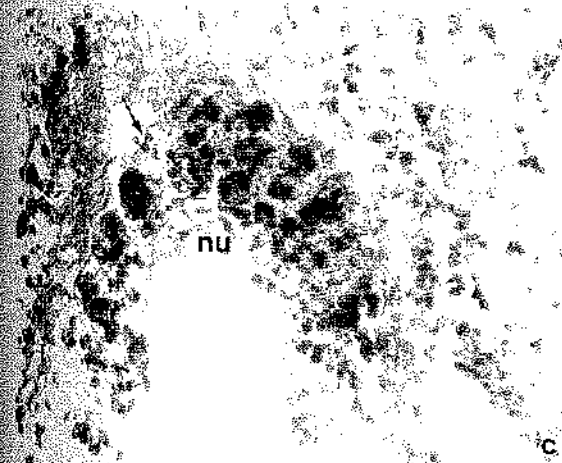
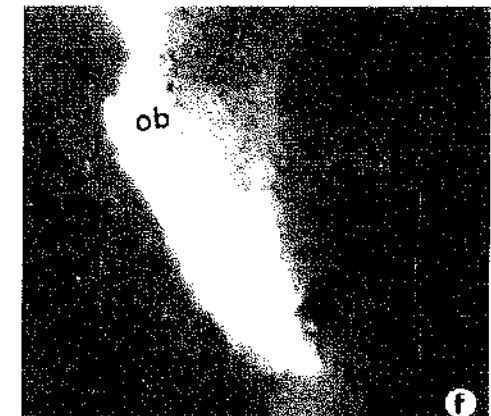


FOTO 2.2.d. Células alrededor del saco embrionario con menos acumulación de almidón (flecha) después del alargamiento del saco embrionario (se), 15 días después de la antesis. Tinción de IKI (179 X).

FOTO 2.2.e. Obturador (ob) y micropilo (mp) con acumulación de callosa como síntoma de degeneración, 15 días después de la antesis. Tinción de azul de anilina (219 X).



FOTO 2.2.f. Obturador (ob) con gran acumulación de callosa en todas las células, 20 días después de la antesis. Tinción de azul de anilina (219 X).



2.3.4. Fecundación.

2.3.4.1. Fecundación en Cruzamientos Intraespecíficos.

La penetración de los tubos polínicos en el óvulo se produce siempre por el micrópilo (porogamia) (Foto 2.3.a). Los tubos polínicos alcanzan el micropilo en su camino hacia el óvulo por donde han de pasar a la nucela para que se produzca la fecundación. La entrada al saco embrionario tiene lugar por una de las dos sinérgidas, que previamente ha degenerado, descargándose en ella los dos núcleos espermáticos.

En el cruzamiento intraespecífico I (entre los dos albaricoqueros) se observa que el tubo polínico alcanza la base del micropilo alrededor del día 10 y se encuentra próximo al extremo de la nucela. Ya en el día 15 se puede observar un cigoto y los núcleos de endospermo alrededor de las paredes del saco (Foto 2.3.c), lo que indicaría que la fecundación se ha podido producir entre los días 10 y 15, y en el día 20 el endospermo ya se encuentra más extendido en el saco embrionario (Foto 2.3.d). En el cruzamiento VII (entre los dos mirobolanes) la aproximación del extremo del tubo polínico al final del micropilo y al extremo nucelar se pudo observar también en el día 10 después de la antesis (Foto 2.3.b) y en el día 15 se ve el cigoto en el extremo micropilar del saco embrionario. En el día 20 los núcleos de endospermo se observan rodeando las paredes del saco embrionario (Foto 2.3.e), y en el día 25 después de la antesis se observan más extendidos rodeando al cigoto (Foto 2.3.f).

2.3.4.2. Fecundación en Cruzamientos Interespecíficos.

La penetración de los tubos hacia el óvulo se produce exactamente igual que en los cruzamientos intraespecíficos por el extremo micropilar. En el cruzamiento interespecífico IV, (entre 'Mirobolán B' y 'Moniquí') los tubos polínicos se pueden observar alrededor del día 10 en el obturador y cerca de la entrada del micropilo (Foto 2.4.a). En el día 15 los tubos se observan perfectamente en la base del micropilo y entrando en la nucela (Foto 2.4.b).

También en el día 15 se puede observar el cigoto (Foto 2.4.c), por lo que es de suponer que la fecundación se realiza alrededor de este día; el día 20 los núcleos de endospermo son visibles (Foto 2.4.d); el día 25 los núcleos de endospermo se pueden observar alrededor del embrión.

En el cruzamiento interespecífico VIII (entre el híbrido 'GF-3'1y *P.tomentosa*) se observa el crecimiento de los tubos polínicos desde la base del estilo a través del obturador desembocando en el exostoma alrededor de 10 días después de la polinización. El día 15 los tubos no han llegado a alcanzar el canal micropilar, dando vueltas en el tegumento fuera del óvulo (Foto 2.4.e). El día 20, sí se ha podido observar en algunas flores que los tubos han alcanzado el canal micropilar y han llegado a la entrada de la nucela, pero sin llegar a penetrar en ella (Foto 2.4.f), desviándose alrededor del tegumento interno del ovario que rodea la pared interna de óvulo. En algunos óvulos se pudieron observar en el saco embrionario núcleos muy teñidos con tinción Gerlach (Foto 2.4.g) pero que no se correspondían con núcleos de endospermo, y tampoco se observó el cigoto en el extremo micropilar (Foto 2.4.h) en ninguno de los óvulos observados.

Las primeras divisiones tienen lugar en el cigoto y en el endospermo que es de núcleos libres, como se han podido observar en los dos cruzamientos intraespecíficos compatibles analizados I (entre los dos albaricoqueros) y VII (entre los dos mirobolanes), así como en el cruzamiento interespecífico IV (mirobolán x albaricoquero). En estos casos el día 15 se pueden observar las primeras divisiones y hacia el día 20 el número de núcleos aumenta considerablemente.

FOTO 2. 3.



FOTO 2.3. FECUNDACION EN LOS CRUZAMIENTOS INTRAESPECIFICOS

FOTO 2.3.a. Tubo polínico entrando por el micropilo (mp) 10 días después de la polinización en el cruzamiento intraespecífico I ('Moniquí' x 'Canino'). Tinción de azul de anilina (219X).

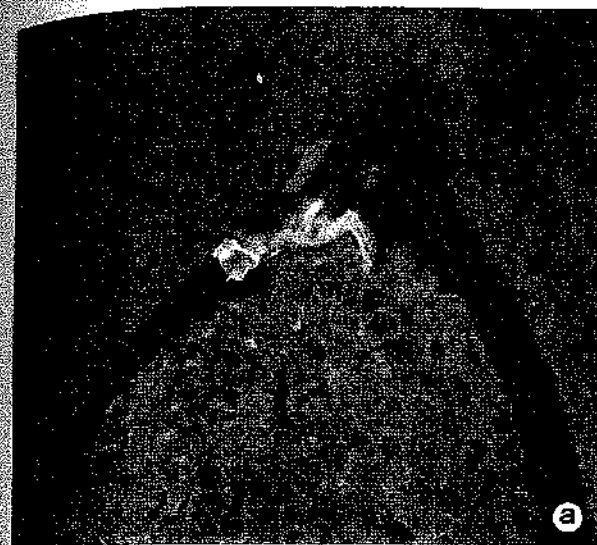


FOTO 2.3.b. Tubo polínico (tp) al final del micropilo (mp) próximo a la nucela (nu) en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') 15 días después de la polinización. Tinción de azul de anilina (548 X).

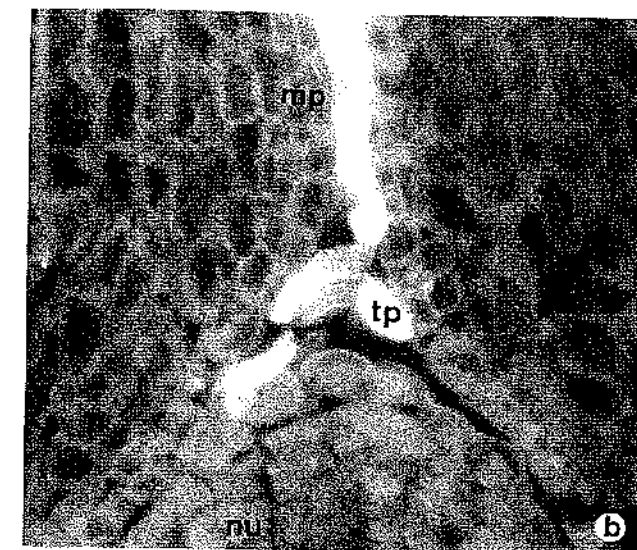


FOTO 2.3.c. Embrión (em) en el extremo micropilar del saco embrionario (se) y núcleos de endospermo (en) en el cruzamiento I ('Moniquí' x 'Canino'), a los 15 días después de la polinización. Tinción de Gerlach (448 X).

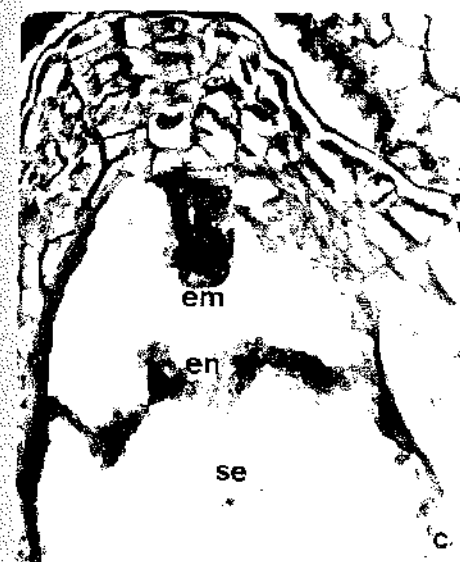


FOTO 2.3.d. Núcleos (flecha) de endospermo (en) más extendido en el saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico I ('Moniquí' x 'Canino'), 20 días después de la polinización. Tinción de Gerlach (179X).

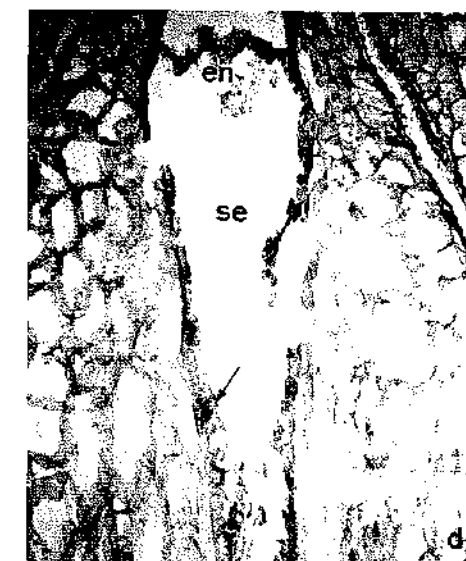


FOTO 2.3.e. Saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico VIII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') con los núcleos de endospermo (en) a los 20 días de la polinización. Tinción de Gerlach (179 X).

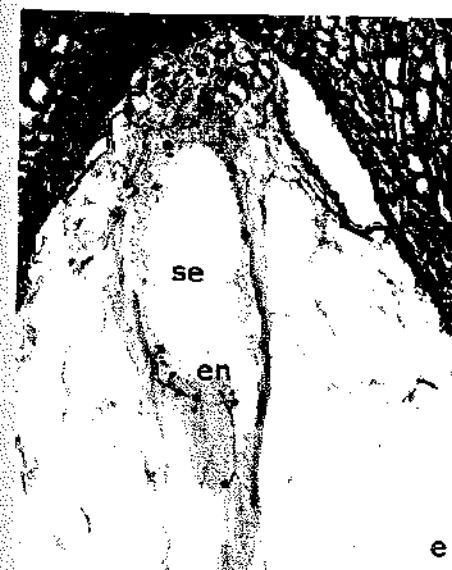


FOTO 2.3.f. Núcleos de endospermo en el saco embrionario rodeando al embrión (em) en el cruzamiento intraespecífico VII a los 25 días de la polinización. Tinción de Gerlach (448X).

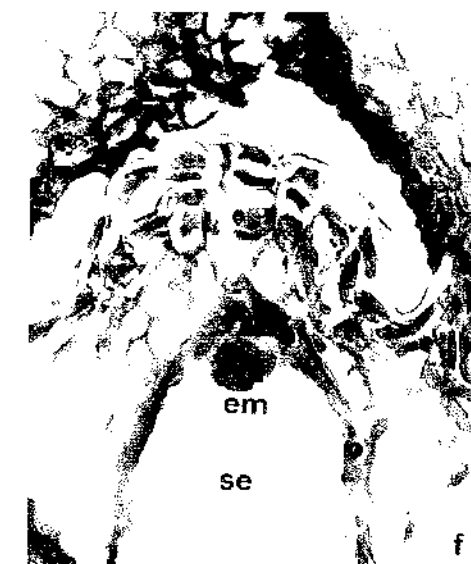


FOTO 2.4.

FOTO 2.4. FECUNDACION Y PARADA DE LOS TUBOS POLINICOS EN LOS CRUZAMIENTOS INTERESPECIFICOS.

FOTO 2.4.a. Tubo polínico (tp) a su paso por el obturador (ob) y cercano al micropilo (mp) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') a los 10 días de la polinización. Tinción de azul de anilina (549 X).

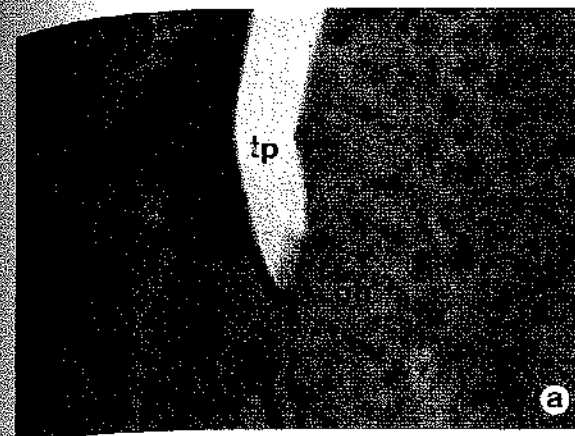


FOTO 2.4.b. Tubo polínico (tp) después del paso por el micropilo (mp) entrando en la nucela (nu) a los 15 días de la polinización en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí'). Tinción de azul de anilina (549 X).

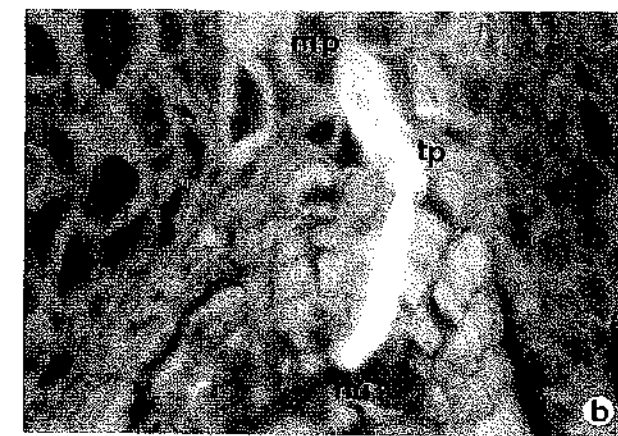


FOTO 2.4.c. Zigoto (z) en el extremo micropilar (mp) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') a los 15 días después de la polinización. Tinción de Gerlach (448X).



FOTO 2.4.d. Núcleos (flecha) de endospermo (en) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') a los 20 días de la polinización. Tinción de Gerlach (448 X).

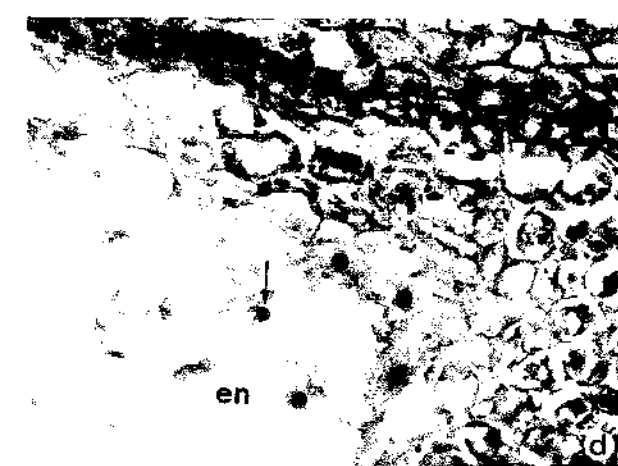


FOTO 2.4.e. Tubo polínico (tp) cerca del micropilo (mp) a los 15 días de la polinización en el cruzamiento VIII ('GF-31' x 'P. tomentosa'). Tinción de azul de anilina (219 X).



FOTO 2.4.f. Tubo polínico (tp) parado a la entrada de la nucela sin penetrar en el saco embrionario (se), después de atravesar el micropilo, en el cruzamiento VIII ('GF-31' x 'P. tomentosa') a los 20 días de la polinización. Tinción de azul de anilina. (219 X).

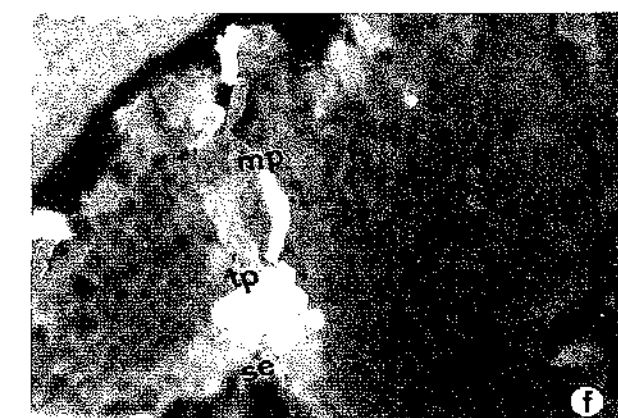
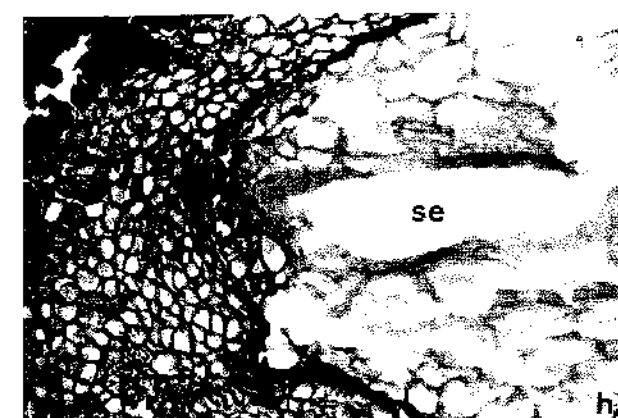


FOTO 2.4.g. Núcleos (flecha) (nu) en el saco embrionario inmaduro (se) del híbrido 'GF-31'. Tinción de Gerlach (448 X).



FOTO 2.4.h. Saco embrionario (se) del híbrido 'GF-31' sin núcleos de endospermo a los 20 días de la polinización. Tinción de Gerlach (179 X).



2.4. DISCUSION.

2.4.1. Desarrollo del saco embrionario.

En todos los pistilos estudiados en este apartado de análisis histoquímico, que han incluido un albaricoquero, *P. armeniaca*, dos mirobolanes, *P. cerasifera*, y el híbrido 'GF-31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*), se ha observado que en cada ovario se han desarrollado dos óvulos. De acuerdo con previas observaciones solamente uno de ellos va a continuar su desarrollo hasta convertirse en semilla. Este óvulo de desarrollo normal se ha llamado primario y el otro, que normalmente degenera, se ha llamado óvulo secundario (EATON y JAMONT, 1964; THOMPSON y LIU, 1973; PIMIENTA y POLITO, 1983). Tanto en el albaricoquero como en los mirobolanes, en el momento de la antesis los dos óvulos no se han podido distinguir pues tienen el mismo tamaño sin signos de degeneración. Este desarrollo similar en el momento de la antesis ha sido observado en albaricoquero (EATON y JAMONT, 1964), almendro (PIMIENTA y POLITO, 1983) y melocotonero (ARBELOA y HERRERO, 1991), pero en otras especies se ha señalado una diferencia en el desarrollo de los dos óvulos ya en el momento de la antesis, como ha sido en cerezo (EATON, 1959) y en el ciruelo europeo (THOMPSON y LIU, 1973), en los que se ha observado que el óvulo secundario era de tamaño menor. A partir de la antesis los dos óvulos no se desarrollan por igual y en el día 10 ya se observa un menor tamaño en el óvulo secundario, así como deposiciones de callosa en la pared externa de la nucela degenerada. Estos síntomas de degeneración son muy frecuentes en el óvulo secundario y han sido observados en varias especies de *Prunus* (HARROLD, 1935; PIMIENTA y POLITO, 1982; STÖSSER y ANVARI, 1982; HERRERO y ARBELOA, 1991). Parece ser que el primer óvulo que se fecunda anula el desarrollo del otro como propone MOGENSEN (1975), ya que en la antesis los dos son potencialmente semillas.

El saco embrionario en todas las especies de *Prunus* se desarrolla según el tipo *Polygonum* (MAHESHWARI, 1950). En los cuatro cultivares estudiados detalladamente, *P. armeniaca*, *P. cerasifera*, y (*P. cerasifera* x *P. salicina*), se ha podido observar que en el momento de la antesis el saco embrionario está inmaduro, aunque en los primeros estudios se

indicó que los sacos embrionarios ya estaban maduros en el momento de la antesis en *P.armeniaca* (FAROOK-LODHI, 1962, citado por PIMIENTA y POLITO, 1983) y en *P.domestica* (DORSEY, 1919a; THOMPSON y LIU, 1973), ciruelo europeo, y comparables a los mirabolanes ya que éstos son ciruelos de crecimiento lento. Estudios posteriores han descrito cierto retraso en ambas especies *P.armeniaca* y *P.domestica* (JEFFERIES, 1975; BURGOS, 1991), al igual que en otras especies de este género como *P.amygdalus*, (PIMIENTA y POLITO, 1983) y *P.persica* (HERRERO y ARBELOA, 1991).

Desde el momento de la antesis y la posible polinización de la flor, el saco embrionario se va desarrollando y creciendo hasta la fecundación, extendiéndose a lo largo de la nucela y ocupando toda la longitud del óvulo. Así, en albaricoquero y en los mirabolanes, en el día 10 ya se observa un alargamiento que ocupa los dos tercios de la longitud del óvulo y a los 20 días los sacos embrionarios de los dos mirabolanes y del albaricoquero ocupan toda la longitud del óvulo. No ocurre lo mismo en el híbrido 'GF-31', en el que a los 20 días su desarrollo está detenido, lo que podría relacionarse con el origen híbrido de este clon y a que sus óvulos pudieran ser en mayor proporción no funcionales. DORSEY (1919a) y BRADBURY (1929) han señalado que aunque la fecundación no tenga lugar se produce la elongación del saco embrionario, pero TUKEY (1933) indica que en los óvulos no funcionales de cerezo el megagametofito se mantiene sin prolongarse. También las observaciones realizadas en almendro, *P.amygdalus* (PIMIENTA y POLITO, 1983), han indicado que se produce el alargamiento del saco embrionario en las flores no polinizadas, aunque es menor en éstas y en las autopolinizadas que en las flores de polinización cruzada. De forma similar se ha observado el alargamiento en flores no polinizadas en el melocotonero *P.persica* (HERRERO y ARBELOA, 1989). También se ha observado frecuentemente en los mirabolanes un hinchamiento en el extremo de la calaza en forma de globo, similar a lo descrito en 1887 por WENT como "itsmo" y el estrechamiento de la parte en la parte central descrito en 1902 por PETROUCHE y por WENT como "canal" (TUKEY, 1933).

El almidón presente en las células de la nucela en el momento de la antesis va desapareciendo del extremo nucelar y también de la calaza, ya que sirve de nutrición al saco embrionario para el proceso de elongación. Estos procesos han sido descritos para almendro y

melocotonero (PIMIENTA y POLITO, 1983; ARBELOA y HERRERO, 1991), en la que sería la forma más probable de nutrición para las especies estudiadas. En el caso del híbrido 'GF-31', en el que el desarrollo del saco no ha llegado a completarse, la presencia de almidón se debería a que el saco embrionario ha detenido su crecimiento y por lo tanto no ha requerido los nutrientes.

En el estudio histológico realizado en estos cuatro cruzamientos, dos intraespecíficos y dos interespecíficos, aparece un porcentaje variable de ovarios estériles en flores fijadas los días 10 y 15 en las que se observan óvulos en un claro proceso de degeneración. En el momento de la antesis, estos ovarios no se distinguen de los otros, pero en las semanas siguientes presentan la nucela y los tegumentos muy degenerados, con la nucela separada de los tegumentos. También su observación tras tinción de anilina muestra una gran cantidad de callosa tanto en el óvulo, principalmente en la calaza, como en el pericarpio (HAROLD, 1938; ANVARI y STÖSSER, 1978; PIMIENTA y POLITO, 1982). Después de la segunda semana, en flores fijadas los días 20 y 25, el número de estos ovarios degenerados es menor, lo que hace suponer que las flores con óvulos degenerados se han caído.

2.4.2. Crecimiento de tubo polínico en el ovario y fecundación.

En los cuatro cruzamientos elegidos se observó que los tubos polínicos alcanzaban la base del estilo. El tiempo que transcurre desde la polinización o desde que los tubos polínicos han alcanzado la base del estilo hasta que se produce la fecundación, puede ser muy variable. Teniendo en cuenta que en este caso se trata de especies diferentes de *Prunus* y además con cruzamientos interespecíficos, los factores que pueden influir en este proceso son múltiples.

Una vez los tubos polínicos han alcanzado la base del estilo, su velocidad se ralentiza pues en los tejidos del ovario es mucho menor que en el estilo. Esto se observa en los cruzamientos VII, IV, en los que la velocidad es menor después del 3º y 4º día, cuando ya han alcanzado la base del estilo y empiezan a crecer hacia el óvulo. Este parece ser un fenómeno habitual en todas las especies de este género (PIMIENTA *et al.*, 1983; HERRERO y

ARBELOA, 1989). Se ha observado que los tubos polínicos crecen inicialmente entre el espacio del obturador y del lóculo para continuar después por la superficie del obturador hasta alcanzar el micropilo. En el caso de los cruzamientos intraespecíficos I y VII y el interespecífico IV se ha observado que el número de tubos que alcanzan la cavidad locular es mayor al descrito por PIMIENTA y POLITO (1983) en almendro. En el cruzamiento interespecífico VIII, ello sólo ocurre ocasionalmente, al contrario del cruzamiento interespecífico IV en el que el número de tubos polínicos en la base del estilo es numeroso.

Después estos tubos pueden o no alcanzar el obturador y el canal micropilar o quedar detenidos tanto en el obturador como al final del extremo micropilar. La presencia de callosa y la ausencia de almidón en las células externas implicaría una falta de nutrición o de estímulo para el tubo polínico por lo que este se detendría. Una vez han pasado por el obturador alrededor del día 10 se puede ver que las reservas de almidón han sido consumidas porque son necesarias para el crecimiento del tubo polínico. Una vez que los tubos polínicos han pasado, el obturador se observa lleno de depósitos de callosa, lo que ocurre alrededor del día 15 cuando ya se ha producido la fecundación en los dos cruzamientos intraespecíficos I y VII y en el interespecífico IV. El crecimiento de los tubos en el estilo es heterótrofo a lo largo del tejido transmisor del pistilo (MULCAHY y MULCAHY, 1983), tejido que se prolonga hasta el ovario, en el que al igual que en el pistilo puede tener un papel nutritivo y de alguna forma, contribuir al movimiento direccional de los tubos polínicos hasta el óvulo. Al parecer el obturador actuaría de regulador del crecimiento por alguna acción trófica, además de aportarle los nutrientes necesarios (TILTON y HORNER, 1980; TILTON *et al.*, 1984), que podrían consistir en una secreción de carbohidratos y proteínas (ARBELOA y HERRERO, 1987). Esta secreción parece necesaria para crecer, no sólo por sus elementos nutritivos, sino también por producirse un estímulo quimiotrófico indispensable para reanudar el crecimiento.

La mayor diferencia que se observa entre los dos cruzamientos intraespecíficos analizados es en el tiempo en el que se producen los diferentes hechos: en el cruzamiento VII, entre los dos mirabolanes, se pueden observar tubos polínicos en el extremo del micropilo alrededor del día 10, pero algunos tubos polínicos ya se han visto en la base del estilo al 3º día después de la polinización. En el cruzamiento I, entre los dos albaricoqueros, los primeros

tubos polínicos en la base del estilo se observan a los 5 días después de la polinización. En el cruzamiento VII el paso por el obturador puede producirse mucho antes ya que la llegada a la base del estilo es más rápida. Esta cronología de sucesos hace posible suponer que suceda lo mismo que lo observado en el melocotonero (ARBELOA y HERRERO, 1987) una parada de unos días en el obturador esperando el estímulo quimiotrófico y otra a nivel de la entrada del micropilo, cuya significación no está totalmente clara y en la que otro tipo de estímulo pudiera ser necesario (HERRERO, 1992a). Este intervalo entre la llegada a la base del pistilo y la llegada al micropilo, también se ha descrito en el almendro, aunque sin detallar el tipo de parada que tiene lugar ni el estímulo requerido para reanudar el crecimiento (PIMIENTA y POLITO, 1983).

En los dos cruzamientos interespecíficos estudiados se ha podido constatar la presencia del cigoto y núcleos de endospermo en el día 15 al igual que en el cruzamiento interespecífico entre el mirabolán y el albaricoquero. No parece que en el proceso de la fecundación haya mayores diferencias; solamente en el cruzamiento I, de los albaricoqueros, el cigoto aparece más alargado y ya se han podido producir divisiones para dar lugar al suspensor y al verdadero embrión. Este desarrollo no se observa por igual en el cruzamiento intraespecífico VII y en el interespecífico IV, ambos en mirabolanes, en los que el día 15 sólo se ve el cigoto. Esto hace suponer que el proceso de fecundación depende más del estímulo de los tejidos del pistilo y avalaría la hipótesis de la influencia del pistilo en la cinética de los tubos polínicos (HERRERO y ARBELOA, 1989).

La división del endospermo precede a la del cigoto y se produce en el extremo micropilar. El endospermo es nuclear y permanece así al menos hasta el día 25, de manera similar a lo descrito para el albaricoquero (JACKSON y COOMBE, 1966). En albaricoquero se ha señalado que la fecundación se produce en la variedad más precoz alrededor del día 10 (BURGOS, 1991), antes de lo que se ha observado en este caso en el cruzamiento I. En los ciruelos este período de tiempo es mucho menos concreto y se han indicado de una a varias semanas en diversos ciruelos hexaploides (DORSEY, 1919a; STERLING, 1953) y desde 10 días a 3 semanas en la variedad 'Italian' de ciruelo europeo (THOMPSON y LIU, 1973).

Es de señalar que este tipo de estudios han sido en ciruelos europeos y no en mirabolanes, en los que no se han llevado a cabo estudios detallados de la polinización y del desarrollo embrionario debido a la poca importancia que tienen los frutos de esta especie. Este tipo de variabilidad se ha atribuido a la temperatura y al efecto del crecimiento de los tubos polínicos (THOMPSON y LIU, 1973), pero estas causas no podrían tenerse en cuenta en el mirabolán ya que en los dos cruzamientos analizados los tubos polínicos son los primeros que alcanzan la base del estilo. Así estos dos cruzamientos al menos se pueden considerar compatibles a nivel prezigótico.

En el cruzamiento VIII del híbrido de (*P.cerasifera* x *P.salicina*) x *P.tomentosa*, el camino del tubo polínico es igual hasta el obturador, pero los tubos polínicos alcanzan el micropilo y van dando vueltas en el tegumento, sin alcanzar el micropilo, y más tarde rodeando la pared interna del óvulo. Aquí pudiera actuar una falta de estímulo direccional como señalan MULCAHY y MULCAHY (1987), pues la secreción a nivel del obturador se produciría de igual manera que en los cruzamientos compatibles inter e intraespecíficos, ya que esta secreción parece ser un hecho independiente de la polinización, al haberse observado tanto en flores polinizadas como no polinizadas (ARBELOA y HERRERO, 1987).

El hecho de que estas paradas de los tubos se produzcan a nivel del ovario podría ser el resultado de que se manifestaran las mismas sustancias que en el caso de la autoincompatibilidad regulada por el locus S, sustancias que se encuentran tanto en el estilo como en una capa de células a nivel de las paredes del ovario, en la epidermis de la placenta (HARING *et al.*, 1990). Como en el caso de la autoincompatibilidad se trata de una glicoproteína del locus S, que parece ser una RNAasa. Esta hipótesis sería factible si, como ya señalaron LEWIS y CROWE (1958), la incompatibilidad interespecífica estuviera regulada por el alelo S, pues en este caso las sustancias de incompatibilidad o no se han producido a nivel del estilo o no se han detectado.

En este cruzamiento otro síntoma de incompatibilidad sería la parada del desarrollo del saco embrionario que no ha llegado a completar la longitud del óvulo. Esto puede ser debido a la falta de estímulo por el número de tubos que van atravesando el pistilo y que alcanzan el

ovario, ha sido menor que el número de los que han alcanzado la base en el cruzamiento interespecífico IV compatible, en el que no se han manifestado barreras a nivel prezigótico. De esta forma el megagametofito necesitaría el estímulo de los tubos polínicos para proseguir su desarrollo (PIMIENTA y POLITO, 1983).

En el caso del cruzamiento interespecífico VIII no se han observado formas concretas de paradas del extremo de los tubos polínicos a nivel del ovario, como es el caso de los cruzamientos interespecíficos en *Rhododendrum* (WILLIAMS, *et al.*, 1982).

En el resto de cruzamientos, en los que se ha observado fecundación, solamente un tubo polínico entra en la nucela. Esta reducción del número de tubos que atraviesan el micropilo es un mecanismo regulado de diferente forma en las distintas especies (HERRERO, 1992b). Otros mecanismos pueden actuar en el ovario, como la capa de cutina que actuaría de barrera a la fecundación (ARBELOA y HERRERO, 1991) y de esta forma aislar el gametofito del esporofito (PIMIENTA y POLITO, 1983), u otros mecanismos propuestos para otras especies (HESLOP-HARRISON, *et al.*, 1985). También se ha demostrado en otra especie que aunque más de un tubo polínico entrase en la nucela, solamente un núcleo espermático es aceptado (WILLEMSE y KEIJZER, 1990).

DESARROLLO POSTZIGOTICO. CULTIVO "IN VITRO"



3. DESARROLLO POSTZIGOTICO. CULTIVO "IN VITRO" DE OVULOS.

3.1. INTRODUCCION.

3.1.1. Desarrollo normal de la semilla.

La semilla es una estructura genéticamente compleja en la que se encuentran tejidos con tres genotipos distintos que poseen dos niveles de ploidía diferentes. Por un lado están los tejidos maternos (tegumentos y nucela) que por lo tanto presentan el genoma materno y son diploides; el endospermo es triploide y combina dos genomas maternos y uno paterno; por último el embrión, diploide, posee la misma proporción de genoma de ambos progenitores. Cada uno de estas estructuras se desarrolla de una forma coordinada para desempeñar una función diferente.

Las reservas que se encuentran en los tegumentos y la nucela sostienen los primeros estados de desarrollo del endospermo y del embrión, aunque este hecho no está universalmente aceptado (MURRAY, 1988). La nutrición del embrión no ha sido atribuida exclusivamente a ninguna estructura sino que se han propuesto varias: las sinérgidas (NEWCOMB, 1973), el suspensor, el endospermo nuclear y el celular (RAGHAVAN, 1976, 1977a; VIJAYARAGHAVAN y PRABHAKAR, 1984). Cuando la nucela está ausente, un haz vascular formado por la capa de células más interna del tegumento se especializa como endotelio y sostiene el desarrollo de la semilla en la región de la chalaza, y parece estar envuelto en la digestión de las reservas nutritivas almacenadas en el tegumento y en su transporte hacia el saco embrionario (WILLIAMS *et al.*, 1987). El cigoto, después de la primera división mitótica, se diferencia en el embrión propiamente dicho y el suspensor. El papel del suspensor parece ser la orientación del embrión dentro del saco embrionario antes de crecer sustancialmente (MURRAY, 1988), aunque no es el único papel que se le atribuye y otros autores lo consideran como una fuente de sustancias de crecimiento para el embrión (NEWCOMB, 1973; LORENZI *et al.*, 1978). NEWCOMB (1973) propone que el suspensor sería el que aporta nutrientes al endospermo en girasol, asumiendo que luego funcionaría como transmisor de estos nutrientes

al desarrollo temprano del embrión (RAGHAVAN, 1977b). Un estudio detallado en almendro (HAWKER y BUTTROSE, 1980) concluye que el suspensor no podría translocar solutos a tasas suficientemente altas como para sostener el crecimiento del embrión en desarrollo.

En el género *Prunus*, el desarrollo del fruto es como en cualquier Angiosperma, de forma que la división nuclear del endospermo precede a cualquier división en el cigoto (JACKSON y COOMBE, 1966; LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971; HAWKER y BUTTROSE, 1980). El modelo de desarrollo del endospermo en las angiospermas se ha clasificado de dos formas. La primera clasificación (VIJAYARAGHAVAN y PRABHAKAR, 1984), distingue dos tipos de desarrollo según cual sea el modelo de formación de la pared celular en los protoplastos del endospermo; ya sea completamente celular y en el que las paredes se completan alrededor de cada protoplasto para finalizar la división mitótica, o sea completamente nuclear en el que la pared se forma después para la mayoría de los protoplastos; y el tipo hellobial que produce una pared dividiéndose la chalaza desde la región micropilar al saco embrionario. Otra clasificación según BRINK y COOPER, (1947, citado por MURRAY, 1988) que comprendería los siguientes tipos: el endospermo que se forma y se mantiene como un órgano de reserva en la semilla madura; y el que se forma pero que se degrada sustancialmente a la vez que el embrión madura; el endospermo nuclear en el que las divisiones celulares se detienen pronto.

En el almendro, el perispermo que se deriva de la nucela se desarrolla primero como un tejido de reserva. Después se desarrolla el endospermo mientras el perispermo senesce (HAWKER y BUTTROSE, 1980) y posteriormente es el embrión el que posee las principales reservas en sus cotiledones, mientras el endospermo se deteriora. Estos autores señalan al igual que MURRAY (1988), que sólo las capas internas de los tegumentos serían los responsables del transporte de metabolitos al embrión a través de todos los estados de desarrollo, que en el almendro comprende un período de 32 semanas (HAWKER y BUTTROSE, 1980).

La primera división mitótica del embrión es transversal dando lugar al suspensor, que finalmente está formado por células más grandes y se desarrolla en la parte micropilar (NATESH y RAU, 1984). El embrión inicialmente está indiferenciado, pero progresa a través de los siguientes cuatro estados (JOHRI y RAO, 1984): globular de forma redonda, corazón,

torpedo más alargado y cotiledonario, manteniendo siempre la misma polaridad.

Estudios anteriores en diferentes especies de *Prunus* indican que en almendro a las 8 semanas aparecen las primeras células del endospermo y a las 12 se observa ya el embrión (HAWKER y BUTTROSE, 1980); en melocotonero a los 21 días se observan núcleos de endospermo (ARBELOA y HERRERO, 1991); este endospermo está formado por núcleos libres hasta la 5ª semana (LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971); la aparición del embrión varía de unas variedades a otras, en 'Sudanell' las primeras células del embrión se observan a los 28 días y en 'Ventura' a los 14 días después de la antesis (LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971). En albaricoquero el endospermo nuclear se mantiene hasta después de 25 días (JACKSON y COOMBE, 1966) y en el ciruelo europeo y japonés las primeras células del endospermo se han observado a los 28 días y el suspensor y embrión aparecen a la 6ª y 7ª semana, respectivamente (JEFFERIES, 1975).

3.1.2. Anormalidades en el desarrollo de la semilla híbrida.

Estudios realizados en semillas procedentes de cruzamientos interespecíficos indican que la causa de aborto más común de la semilla es el fallo del endospermo después de la fecundación. En híbridos de *Vicia faba* x *V. narbonensis*, el endospermo incrementa de tamaño hasta los 40 días después de la fertilización, pero completa pocos ciclos de división ya que su desarrollo cesa por razones no claras y el embrión muere en el estado globular (RAMSAY y PICKERSGILL, 1986). En *Pisum sativum* x *Vicia sativa* el endospermo y el embrión se colapsan a los 8 días después de la polinización (GRITTON y WIERZBICKA, 1975). En *Phaseolus vulgaris* x *P. acutifolius*, la semilla se colapsa después de 14-21 días, por anomalías del endospermo, a pesar de que el embrión ha alcanzado el estado de corazón; en este caso parece ser que la citoquinina, inductora de la división celular y creadora de sumideros activos, se encuentra en la semilla en cantidades más bajas (ANDRADE-AGUILAR y JACKSON, 1988; SABJA *et al.*, 1990). Sin embargo, otros híbridos interespecíficos en este género como *P. coccineus* x *P. vulgaris* (SHII *et al.*, 1982) y *P. vulgaris* x *P. lunatum* (KUBOYAMA *et al.*, 1991) han resultado razonablemente fértiles. En gramíneas la primera

anormalidad aparece durante la fusión de los gametos y por cambios en las antípodas, a las que se les atribuye una interferencia con el modelo de transporte de nutrientes hacia el saco (WHITE y WILLIAMS, 1976; WILLIAMS y WHITE, 1976; SHARMA y OHM, 1990; ABBO y LANDIZINSKY, 1991). Los fallos en el embrión parecen ser una causa menos común para el aborto de la semilla híbrida, que más bien se debe al colapso del endospermo. En *Gossypium arboreum* x *G. hirsutum* el embrión incrementa de tamaño pero no consigue diferenciarse, incluso cuando se cultiva "in vitro" (LIU *et al.*, 1992). En el género *Lens* L. el aborto ocurre en estados posteriores al globular (ABBO y LANDIZINSKY, 1991). Las anormalidades en los tejidos maternos se han descrito en las *Solanaceas*, en las que el aborto de la semilla está asociada con anormalidades en el tegumento, ya que el endotelio prolifera dentro del saco embrionario, destruyendo el endospermo y embrión mientras el almidón persiste en el tegumento (LESHEM *et al.*, 1990; IWANAGA *et al.*, 1991), aunque estos problemas pueden estar causados en primer término por deficiencias en el endospermo. En *Arachis hypogaea* x *A. diogeni*, el tejido maternal tiene un desarrollo hiperplástico debido al colapso del endospermo (JOHANSON y SMITH, 1956; OZIAS-AKINS *et al.*, 1992).

3.1.3. Barreras de postfecundación.

Los cruzamientos interespecíficos pueden depender de la dirección del cruzamiento, incluso en especies con la misma ploidía. En *Phaseolus coccineus* x *P. vulgaris*, ambos diploides, el embrión aborta a menos que sea cultivado "in vitro" (SHII *et al.*, 1982). En el cruzamiento recíproco, sin embargo, la semilla germina y se desarrolla normalmente. Los mecanismos de incompatibilidad han sido discutidos desde el punto de vista de un desequilibrio fisiológico producido por los cambios de cromosomas o por diferente constitución genómica del embrión, del endospermo y del tejido maternal (WATKINS, 1932). Las diferencias de comportamiento en cruzamientos recíprocos y las alteraciones de la ploidía en cruzamientos interespecíficos en *Solanaceas* condujo a JOHNSTON *et al.* (1980) a formular la hipótesis del número de balance del endospermo para explicar el desarrollo del embrión hasta una semilla viable en los distintos tipos de cruzamientos, especialmente en los que implican elementos de diferente ploidía, tanto intraespecíficos como interespecíficos. Esta teoría sobre el balance

que se produce en el endospermo entre la dosis de genes de los diferentes tejidos (materno y paterno) supone que este balance es necesario para el buen desarrollo de la semilla, por lo que el balance del endospermo debe ser el de la proporción de 2:1, materno y paterno. Otra teoría más reciente, llamada de activación de los nucleos polares, ha sido propuesta por NISHIYAMA *et al.*, (1991), para explicar el aborto en cruzamientos interespecíficos en *Brassica*, según la cual el éxito de un cruzamiento depende de un índice de activación que viene dado por un valor de activación y un valor de respuesta.

3.1.3.1. Cultivo "in vitro" como técnica de superar barreras postzigóticas.

El cultivo de tejidos "in vitro" como técnica de mejora ha resultado muy útil en el caso de la producción de híbridos interespecíficos. En 1929, LAIBACH (MAHESHWARI, 1966) señaló la aplicación potencial del cultivo de embriones para rescatar híbridos interespecíficos, que de otra forma fallan debido al aborto del embrión. BRAAK y KOOISTRA (1975) fueron los primeros en aplicar el cultivo de embriones en *Phaseolus* (WILLIAMS *et al.*, 1987). Anteriormente, en 1932, WHITE (RANGAN, 1984) utilizó el cultivo de embriones dentro de óvulos en *Anthirrinum* y se aplicó por primera vez en híbridos interespecíficos de algodón (STEWART y HSU, 1978). La ventaja del cultivo de óvulos es que ofrece al embrión un ambiente maternal para su desarrollo (RANGAN, 1984).

Además de servir para el estudio de la morfogénesis del embrión, el cultivo de óvulos y embriones "in vitro" ha sido una técnica muy utilizada en programas de mejora. Concretamente en frutales, en melocotonero, cuando se utilizan las variedades de maduración temprana como parentales femeninos en los programas de mejora, para conseguir que se desarrolle el embrión, ya que si no, en condiciones normales aborta (RAMMING, 1985; RAMMING y TANNER, 1987). En uva para utilizar las variedades apirenas como plantas productoras de semilla (EMERSHAD *et al.*, 1989; RAMMING y EMERSHAD, 1990; GRAY *et al.*, 1990) y en cítricos con óvulos subdesarrollados (GERACI y TUSA, 1988; GMITTER y LING, 1991). También se ha utilizado para la inducción de haploides mediante el cultivo de óvulos no fecundados en manzano (ZHANG y LESPINASSE, 1988). La utilización

probablemente más interesante es la producción de híbridos interespecíficos a través del cultivo de óvulos (BINO *et al.*, 1989; MANSHARDT y WENSLAFF, 1989a, 1989b; GRAY *et al.*, 1990; TAKAHATA y TAKEDA, 1990; BRUUN, 1991a, 1991b; VAN TUYL *et al.*, 1991; VAN DER VALK *et al.*, 1991; ZHOU *et al.*, 1991; COMEAU *et al.*, 1992) así como el rescate del embrión aislado (AGNIHOTY *et al.*, 1990a; 1990b; CHUG y KIM, 1990; KIN *et al.*, 1990a; ABBO y LADIZINSKI, 1991; CAP *et al.*, 1991; IWANAGA *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1992).

En leguminosas se ha conseguido con éxito el cultivo del embrión junto al endospermo como tejido nutritivo (LEDUC *et al.*, 1990), aunque con esta técnica resulta difícil no dañar el suspensor (KIN *et al.*, 1990a). En manzano no se han obtenido buenos resultados al prescindir de la pared externa del ovario y mantener la placenta (ZHANG *et al.*, 1987; ZHANG y LESPINASSE, 1988), pero sí se han regenerado plantas de actinidia (KIN *et al.*, 1990b) a partir del cultivo únicamente del endospermo híbrido. También se han regenerado plantas de maíz a partir del cultivo del saco embrionario fecundado aislado en estado de cigoto (MÓL *et al.*, 1993), aunque en este caso no se trate de plantas híbridas.

La utilización de una mezcla de medio de cultivo de óvulo y de medio de cultivo de embriones "in vitro" se ha ensayado como una nueva técnica de hibridación interespecífica (MATHIAS *et al.*, 1990).

3.1.3.2. Reguladores de crecimiento y medios de cultivo.

Los reguladores de crecimiento por su condición de fitoreguladores, han sido utilizados en cruzamientos interespecíficos tanto añadidos al medio de cultivo "in vitro" para promover el desarrollo temprano del embrión híbrido (STEWART y HSU, 1978; CHEN y HAYES, 1991), como "in vivo" para superar la esterilidad del híbrido interespecífico (ZHOU *et al.*, 1991). El suspensor es la principal fuente de hormonas al principio de la embriogénesis (LORENZI *et al.*, 1978), aunque hay pocos estudios en los que se detalle qué procesos del desarrollo quedan afectados por los distintos reguladores de crecimiento y las conclusiones

El ácido giberélico (GA) es en principio necesario para los embriones jóvenes. En algodón ha dado buenos resultados añadido al medio de cultivo "in vitro", aumentando la supervivencia de los embriones híbridos en *Gossypium* (STEWART y HSU, 1978) y *Allium* (BINO *et al.*, 1989; VAN DER VALK, 1991). Según STEWART y HSU (1978) el ácido giberélico promueve la expansión de los cotiledones y produce embriones mayores, aunque su aplicación exógena (PICKERSGILL, 1991) inhibe el desarrollo de los embriones en estado cotiledonario.

El grupo de las auxinas incluye el ácido indol acético (IAA), el ácido naftalenacético (NAA) y el ácido diclorofenoxi acético (2,4-D); aparentemente estimulan la división de los núcleos del endospermo. Concretamente el IAA estimula el crecimiento fibrilar de los embriones híbridos cultivados "in vitro" en algodón (STEWART y HSU, 1978) y en gramíneas (COMEAU *et al.*, 1992). El IAA con NAA y 2,4-D ha sido utilizado con éxito en cultivo de óvulos de híbridos interespecíficos en ornamentales (VAN DER VALK *et al.*, 1991; VAN TUYL *et al.*, 1991). Sin embargo un exceso de auxinas endógenas implica un desarrollo anormal de la semilla híbrida (PICKERSGILL, 1991). COMEAU *et al.* (1992), trabajando con gramíneas e IAA y GA, postula que hay diferencias nutricionales entre el embrión y el endospermo, en contra de la idea generalizada de que el endospermo es importante para la supervivencia del proembrión (RAGHAVAN, 1977a; RAGHAVAN y SRIVASTAVA, 1982), ya que con flores prematuras de trigo polinizadas con maíz se obtienen embriones sin endospermo y las flores de más edad producen embrión con endospermo, por lo que el IAA estimularía el endospermo y el GA el proembrión.

Las citoquininas, 6-benzilamino purina (BA), kinetina y zeatina, son necesarias para el crecimiento del embrión. No parece que sean sintetizadas en la semilla, aunque pueden ser almacenadas en una forma inactiva en el endospermo para usarse cuando sea necesario.

La aplicación exógena de zeatina estimula la formación del ápice caulinar solamente en embriones jóvenes, ya que después el embrión cambia irreversiblemente a poder utilizar exclusivamente la citoquinina endógena (LESHEN *et al.*, 1990). Un efecto de la aplicación de BA junto a una auxina, NAA, ha sido la formación de plantas poliembriónicas de origen

zigótico en papaya (MANSHARDT y WENSLAFF, 1989b). La aplicación exógena de los tres tipos de reguladores de crecimiento (GA + 2,4-D + Kinetina) parece dar el mayor número de embriones en un cruzamiento interespecífico en cebada (CHEN y HAYES, 1991). Diferentes concentraciones y combinaciones de giberelinas, auxinas y citoquininas han inducido a formar callo en el endospermo de semillas F_1 y F_2 de cruzamientos interespecíficos en actinidia (KIN *et al.*, 1990b).

El etileno, conocido como retardante de crecimiento, provoca un aumento en la producción de un enzima responsable de la maduración del tomate cultivado "in vitro", en lo que puede ser una excepción a los efectos conocidos de un regulador de crecimiento (ISHIDA, 1991). Indirectamente el retardante de crecimiento ha sido utilizado para producir plantas sanas como han de ser las plantas utilizadas para producir embriogénesis somática en embriones zigóticos inmaduros (JEANNIN y HAHNE, 1991).

3.2. MATERIAL Y METODOS.

3.2.1. Cruzamientos estudiados.

3.2.1.1. Cruzamientos intraespecíficos:

- I. 'Moniquí' (*P. armeniaca*) X 'Canino' (*P. armeniaca*)
- II. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Balones' (*P. amygdalus* x *P. persica*)
- VII. 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*) X 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*)
- IX. 'Puebla se Soto 101' (*P. insititia*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

3.2.1.2. Cruzamientos interespecíficos.

- III. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X *P. tomentosa*
- IV. 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*) X 'Moniquí' (*P. armeniaca*)
- V. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*)
- VI. 'Cachirulo' (*P. amygdalus* x *P. persica*) X 'Mirandier 617' (*P. amygdalus* x *P. cerasifera*)
- VIII. 'GF 31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*) X *P. tomentosa*
- X. 'Reina Claudia' (*P. domestica*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

3.2.2. Fijación de los óvulos en el día del cultivo "in vitro".

Para llevar a cabo el estudio de los óvulos se utilizaron aquellos óvulos que resultaron dañados o inservibles por el riesgo de contaminación para el cultivo "in vitro". Por ello el estudio, que se realizó en 1991, tuvo lugar el mismo día en el que se hizo el cultivo "in vitro"

(Cuadro 3.2.1.1). Los ovarios se abrieron extrayendo los óvulos del receptáculo floral y se fijaron en F.A.A. (apartado 1.2.2.1.) y se almacenaron a 4° C hasta su estudio. Se fijaron una media de 15 óvulos por cada cruzamiento. Las fechas de cultivo para cada cruzamiento, fueron determinadas según el estado del fruto y la disponibilidad de frutos según las curvas de caída realizadas por el conteo semanal de los frutos de cada cruzamiento (apartado 4.3.1.), centrándose entre la 4ª y 5ª semana.

CUADRO 3.2.2. Días después de la antesis (DCO) en los 10 cruzamientos cuando se realizó el cultivo "in vitro":

CRUZAMIENTO	DCO
I	28
II	34
III	33
IV	39
V	34
VI	35
VII	30
VIII	31
IX	40
X	39

3.2.2.1. Ovulos incluidos en parafina y microscopía de fluorescencia.

De los 15 óvulos que se fijaron en el día del cultivo para cada cruzamiento realizado 5 de ellos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 10 μ al microtomo, según el proceso descrito en el apartado 2.2.2.2. En estos cortes se realizó la tinción con calcofluor, para la tinción de celulosa de la pared celular. De esta forma se puede apreciar el estado del endospermo, nuclear o celular, y del suspensor, así como la presencia o no de cigoto y las divisiones del embrión en los primeros estados de desarrollo. La observación se realizó bajo iluminación fluorescente con filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460).

En cada uno de los 10 cruzamientos se realizaron observaciones en cortes de los óvulos el día que se pusieron en cultivo (cuadro 3.2.2.), y con la tinción de calcofluor se puede comprobar el estado del endospermo y del embrión. Si es nuclear no se distinguen las paredes celulares teñidas por el calcofluor al contrario de las células del embrión y del suspensor, que se pueden distinguir por sus paredes celulares teñidas con calcofluor.

3.2.2.2. Técnica del "clearing" y microscopía de contraste de fase.

Los restantes 10 óvulos, fijados en F.A.A., se utilizaron para la determinación de su estado en el día de su puesta en cultivo mediante la técnica de "clearing", - en la cual el óvulo se mantiene intacto, por lo que se puede determinar el estado del saco embrionario y la presencia de endospermo y de embrión en el día de la puesta en cultivo.

Muchas veces el proceso de fijación se ve acompañado por un pardeamiento del material debido a la presencia de fenoles y taninos, o productos de oxidación, que interfieren con las tinciones y dificultan la observación del tejido al microscopio (HERR, 1992). El proceso requiere pasar los óvulos de F.A.A. a alcohol de 70% y después a agua (HERR, 1971). A continuación se da a los óvulos un pretratamiento con la solución de Stockwell (JOHANSEN, 1940; HERR, 1992) para eliminar los fenoles y taninos. La solución se compone de 1 g de ácido crómico, 10 ml de ácido acético glacial, y 1g de dicromato potásico en 90 ml de agua (HERR, 1992). Los tiempos recomendados de 20 a 30 horas fueron adaptados para el material en estudio. A continuación se aclaran tres veces con agua destilada para eliminar la solución. La técnica de STELLY *et al.* (1984) para el estudio de la megasporogénesis fue modificada para el estudio del desarrollo temprano del embrión. El fluido utilizado para aclarar los tejidos es uno de los que se mencionan en la bibliografía, que corresponde al descrito por YOUNG *et al.* (1979), en sustitución del fluido original (4 y 1/2) recomendado por HERR (1971) y algunas modificaciones de éste (HERR, 1972, 1982; LEVIEIL y HUYGUE, 1985), siguiendo el protocolo siguiente:

Hematoxilina de Mayer	1-2 días
Acido acético	1-2-días
Agua	1 día
Series crecientes de etanol: 25%,50%,70%,95%,100%,100%	15 minutos cada una
Etanol 100%	1noche
Salicilato metilo:Etanol (1:2)	1/2 hora
" (2:1)	"
Salicilato de metilo	3/4 horas
"	2 horas
"	Guardar

Todos los óvulos fueron manipulados en botes de cristal pequeños, utilizando pipetas para el cambio de soluciones. Para la observación microscópica se utilizaron portaobjetos especiales con dos concavidades debido al tamaño de los mismos. Se colocan con los óvulos con unas gotas de salicilato de metilo y cubiertos con un cubreobjetos estándar sin necesidad de sujetarlo como recomienda HERR (1971, 1972) La observación se realizó en un microscopio Leica con los objetivos de contraste de fase y filtro excitador (1y 2). Con esta técnica se examinaron 10-12 óvulos de cada cruzamiento. Se hizo el cálculo del porcentaje de sacos embrionarios mal formados, y el porcentaje de óvulos que presentaban embrión y endospermo.

3.2.2.3. Estudio de la degeneración del óvulo.

Para la determinación del estado en el que se encontraban los óvulos en el momento del cultivo se utilizó el método propuesto por STÖSSER y ANVARI (1982). Esta metodología se basa en que los óvulos en su proceso de senescencia depositan callosa, que se puede observar por fluorescencia (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982; DUMAS y KNOX, 1983). La presencia de callosa en la calaza, indica un proceso degenerativo en el óvulo que llevará a su posterior aborto (PIMIENTA y POLITO, 1982) y degeneración temprana.

Para esta observación se tomaron 10 ovarios por cada uno de los cruzamientos realizados en el campo en 1992, el día de la fecha del cultivo "in vitro" indicado como DCO. Se extrajeron los óvulos del ovario y se fijaron en F.A.A. (apartado 1.2.2.1.). A continuación se lavaron durante una hora y se colocaron en frascos de cristal con la solución de azul de anilina al 0,1% en una solución 0,1 N de PO₄ K₃ (MARTIN, 1959) durante toda la noche. A los óvulos se les hizo unas incisiones laterales en el tegumento para facilitar la penetración del azul de anilina. Para la observación al microscopio se abrieron longitudinalmente y se observaron con iluminación fluorescente, filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460).

Los diferentes grados de callosa indican diferentes grados de senescencia, ya fuera localizada sólo en la parte micropilar, en la calaza o a lo largo del óvulo. Las observaciones se realizaron en el óvulo primario que es el que queda viable en la mayoría de los frutos para que se produzca la fecundación. El óvulo secundario ha ido degenerando en general y aparece pronto (20-25 días después de la antesis) con las paredes llenas de depósitos de callosa y la nucela y el saco embrionario necrosados (Apartado 2.3.2).

3.2.2.4. Estudio de la translocación en el óvulo.

Para la observación de la translocación del óvulo, en el día de la puesta en cultivo se intentó utilizar el método de la fluoresceína disódica, como una modificación de MOGENSEN (1981). Esta técnica se basa en ver si la translocación en la zona calazal es correcta y deja pasar los nutrientes, o está interrumpida, por lo que la fluoresceína entonces sólo llega al funículo (PIMIENTA y POLITO, 1982). Los tiempos se intentaron adaptar para cada material estudiado, diferente en cada cruzamiento. Se marcaron ramas en el campo, de las que habían sido previamente polinizadas y se cortaron el mismo día en que se habían puesto en cultivo los óvulos. Estas ramas se introdujeron en agua y se dejaron durante diferentes tiempos: 3 horas, 6 horas, 8 horas y 24 horas, en una solución al 0,5% de fluoresceína disódica e agua (MOGENSEN, 1981). Para la observación se disectaron los óvulos en el binocular bajo aceite parafinado para prevenir la difusión de la fluoresceína y se observaron al microscopio con luz fluorescente, filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460).

3.2.3. Cultivo "in vitro" de óvulos.

3.2.3.1. Establecimiento del cultivo.

El cultivo "in vitro" de óvulos se realizó en 1991 y para ello se tomaron los frutos de cada cruzamiento realizado en el campo y polinizados manualmente. El día de la puesta en cultivo se indica en el cuadro 3.2.1.1. Los frutos cortados en el árbol fueron introducidos en un bote humedecido hasta su esterilización e inmediata puesta en cultivo.

La esterilización de la superficie del fruto fue realizada en botes de cristal según el método de RAMMING (1982):

-Alcohol del 70% durante 1 minuto.

-Lejía comercial al 10 % (5 g/l de cloro activo) más 1 ml Tween 20 (0,5 ml/l), durante 5 minutos.

-Aclarado 3 veces con agua destilada estéril y colocación en el medio de cultivo.

3.2.3.2. Medio de cultivo para óvulos.

El cultivo de óvulos se realizó en botes de metacrilato, donde se colocó un papel de filtro (Watman # 541 de 9 cm de diámetro). El papel permite pasar el medio de cultivo por difusión y sirve de soporte para los óvulos. El medio básico de cultivo de óvulos, ya utilizado para óvulos de *Prunus* (RAMMING, 1985), fue el de STEWARD y HSU (1977, 1978), compuesto por sales minerales, Fe Na EDTA como sal de hierro y mezcla vitamínica MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962), excepto glicina. También se añadieron sacarosa (6 o 10 %) y dos hormonas IAA (0.5 mg/l) y kinetina (0.01 mg/l) (PINTO *et al.*, 1990). La preparación se realizó a partir de soluciones stock concentradas:

Soluciones stock del medio SH (STEWARD y HSU, 1978):

Solución	g/l	Volumen tomado (ml)	Concentración final mg/l
Nitratos		50.0	
KNO ₃	101.10		5055.0
NH ₄ Cl	10.7		535.0
Sulfatos		50.0	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	9.86		493.0
MnSO ₄ · H ₂ O	0.338		16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.1725		8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0005		0.025
PO ₄ , BO ₃ , MoO ₄		50.0	
KH ₂ PO ₄	5.4436		272.18
H ₃ BO ₃	0.122		6.183
Na ₂ MoO ₄ · 5H ₂ O	0.00484		0.242
Haluros		50.0	
KI	0.0166		0.83
Ca Cl ₂ · 2H ₂ O	8.82		441.06
Co Cl ₂ · 6H ₂ O	0.00048		0.024
Hierro	g/100ml	5.0	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.1668		8.34
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.2472		11.167
Vitaminas	g/100ml	5.0	
Acido nicotínico	0.0098		0.492
Piridoxina-HCl	0.0164		0.822
Tiamina-HCl	0.0269		1.349
SACAROSA	—	—	60000 o 100000
Hormonas	20mg/100ml		
Kinetina	0.05	0.05	0.01
IAA	2.5	2.5	0.5

La utilización de soluciones separadas, en vez de mezclar los macronutrientes y micronutrientes, se hace para evitar la precipitación de las sales menos solubles. Para preparar 1 litro de medio, se añaden a unos 500 ml de agua destilada la parte de las soluciones concentradas expresadas anteriormente, mientras se agita constantemente. Una vez disueltas se añade la concentración deseada de sacarosa, directamente sin disolver y se disuelve con un termoagitador magnético. Se añade agua hasta 1 litro y se ajusta el pH a 5.70 con KOH o con HCl. Se distribuye en los botes preparados con un dispensador (30 ml cada uno). La esterilización tiene lugar en autoclave a 120° C durante 20 minutos. Después los frascos se dejan enfriar.

El fruto se abre con ayuda de unas tijeras por una pequeña sutura longitudinal en condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar. Se extrae el óvulo con los tegumentos y se coloca dentro del bote.

3.2.3.3. Medio de cultivo para embriones.

Cuando el embrión, después de ser cultivado dentro del óvulo, ha crecido lo suficiente, se disecta dentro de la cámara de cultivo y se transfiere a un medio sólido para el cultivo del embrión aislado. Se ensayaron dos medios para el cultivo de embriones, el medio básico de MURASHIGE y SKOOG (1962), con 585 mg/l de L-glutamina y 1240 mg/l de K-succinato, y el medio denominado C₂ D, que es una modificación en las concentraciones de sales del MS (CHÉE y POOL, 1987). A ambos se les añade 3% de sacarosa y agar (Difco-Bacto agar), 6.5 g/l al MS y 7.5 g/l al C₂ D. Los medios de cultivo también se preparan a partir de soluciones stock concentradas descritas a continuación. Se añade la concentración deseada de sacarosa como se ha descrito anteriormente, se completa con agua hasta 1 litro y se ajusta el pH a 5.7 con KOH o HCl. La disolución del agar se realiza con un termoagitador magnético. El cultivo se realiza en tubos de ensayo, en los que se distribuye el medio (10 ml cada uno). La esterilización tiene lugar en autoclave a 120° C durante 20 minutos. Después se dejan enfriar.

Soluciones stock del medio MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962):

Solución	g/l	Volumen tomado (ml)	Concentración final mg/l
Nitratos		50.0	
KNO ₃	38		1900
NH ₄ NO ₃	33		1650
Sulfatos		50.0	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.4		370
MnSO ₄ · H ₂ O	0.338		16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.212		8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.005		0.025
PO ₄ , BO ₃ , MoO ₄		50.0	
KH ₂ PO ₄	3.4		170
H ₃ BO ₃	0.124		6.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.05		0.25
Haluros		50.0	
KI	0.166		0.83
Ca Cl ₂ · 2H ₂ O	8.8		440
Co Cl ₂ · 6H ₂ O	0.005		0.025
Hierro	g/100ml	5.0	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.557		27.8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.82476		37.3
Vitaminas	g/100ml	5.0	
Acido nicotínico	0.01		0.5
Piridoxina-HCl	0.01		0.5
Tiamina-HCl	0.01		0.5
Glicina	0.04		2.0
SACAROSA	--	--	30000
K-succinato	1.240		1240.0
L-glutamina	0.5846		584.6
AGAR	--	--	6500

Soluciones stock del medio C₂ D (CHÉE y POOL, 1987):

Solución	g/l	Volumen tomado (ml)	Concentración final mg/l
Nitratos		50.0	
KNO ₃	30		1500
NH ₄ NO ₃	33		1650
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14.18		709
Sulfatos		50.0	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.4		370
MnSO ₄ · H ₂ O	0.169		16.9
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0172		8.6
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.05		0.025
PO ₄ , BO ₃ , MoO ₄		50.0	
KH ₂ PO ₄	3.4		170
H ₃ BO ₃	0.124		6.2
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.005		0.25
Co Cl ₂ · 6H ₂ O	0.005		0.025
Hierro	g/100ml	5.0	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.557		27.8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.82476		41.24
Vitaminas	g/100ml	5.0	
Acido nicotínico	0.02		1.0
Piridoxina-HCl	0.02		1.0
Tiamina-HCl	0.02		1.0
Glicina	0.04		2.0
Mio-inositol	0.2		
SACAROSA	--	--	30000
AGAR	--	--	7500

3.2.3.4. Diseño del experimento.

El cultivo de óvulos "in vitro" se hizo en el medio básico SH a dos concentraciones diferentes de sacarosa, 6% y 10 %, así como con o sin las concentraciones de hormonas kinetina e IAA. Un total de 4 tratamientos fueron ensayados para cada cruzamiento:

-SH + 6% sacarosa (SH6%)

-SH + 6% sacarosa + hormonas (SHH6%)

-SH + 10% sacarosa (SH10%)

-SH + 10 %sacarosa +hormonas (SHH10%)

Aproximadamente se recogieron 70 óvulos para cada cruzamiento. Es de señalar que en el cruzamiento interespecífico VIII ('GF-31' x *P. tomentosa*) no se realizó el cultivo "in vitro" ya que el número de frutos en el árbol, a la 5ª semana después de la polinización, fue de 10 y fueron fijados para la observación microscópica. En el resto de cruzamientos, se distribuyeron cinco óvulos por bote de cultivo con lo que se obtuvieron tres repeticiones para cada uno de los cuatro tratamientos.

El cultivo de óvulos se realizó en una cámara a 27° C con 24 h de oscuridad. Después de cinco semanas de cultivo se realizaron las observaciones y medidas dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones estériles. A continuación los embriones que habían crecido lo suficiente se colocaron cada uno en un tubo de ensayo. Los dos medios utilizados fueron el de MS para los embriones y el C₂D. Los embriones se guardaron a 1° C durante 45 días antes de germinación (RAMMING, 1985). Después los embriones se colocaron en la cámara de crecimiento a 20° C con 12 h de luz hasta su germinación.

3.2.3.5. Toma de datos.

La toma de datos se realizó después de cinco semanas en el medio de cultivo de óvulos para ver la respuesta de crecimiento en el cultivo "in vitro". Los óvulos se analizaron bajo el binocular para cada tratamiento SH6%, SH6%, SH10%y SHH10%. Se observó el porcentaje de óvulos que presentaban callo en el tegumento que resultaba visible y una vez separado el tegumento se tomó el dato del porcentaje de óvulos con embrión y endospermo.

3.3.RESULTADOS.

3.3.1. Estudio del óvulo el día de cultivo "in vitro".

3.3.1.1. Presencia de embrión y endospermo en los diferentes cruzamientos.

Las primeras divisiones del cigoto ocurren en el extremo micropilar, dando como resultado el suspensor y el embrión. Los dos cruzamientos intraespecíficos I (entre los dos albaricoqueros) y VII (entre los dos mirobolanes) presentan un endospermo que sigue siendo nuclear y extendido por todo el saco embrionario (Foto 3.1.a). Se observan además las primeras células del suspensor, y el embrión en estado globular de 50 μ en el I y de 40 μ en el VII (Foto 3.1.b). En el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí'), también se observan los núcleos del endospermo a lo largo del saco, el suspensor con células más grandes y el embrión en estado globular de aproximadamente 40-50 μ (Foto 3.1.c).

Sólo en dos de los cruzamientos con 'Cachirulo' se vieron núcleos de endospermo y un embrión. Estos fueron el cruzamiento II (con el otro híbrido 'Balones'), en el que los núcleos del endospermo se extienden hasta el extremo de la calaza y el embrión globular posee 30 μ de tamaño (Foto 3.2.d), y el cruzamiento interespecífico III (con *P. tomentosa*) con un embrión de 30 μ (Foto 3.2.e). En ambos se encuentran núcleos de endospermo a lo largo del saco (Foto 3.2.c). En los otros dos cruzamientos interespecíficos, V (con 'Mirobolan 605 AD') y VI (con 'Mirandier 617'), no se constató la presencia de núcleos de endospermo en el micropilo, ni tampoco células del cigoto (Foto 3.1.f).

En el cruzamiento interespecífico VIII, de 'GF-31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*) x *P. tomentosa*, tampoco se observaron núcleos de endospermo ni células que indicaran la presencia de cigoto en el extremo micropilar. En los dos cruzamientos que implican ciruelos hexaploides, en el intraespecífico IX (entre los dos pollizos) se presenta un endospermo con la primera formación de paredes y el suspensor con un tamaño mayor que en el cruzamiento X (con el ciruelo europeo), y un embrión de aproximadamente 90 μ (Foto 3.1.g). En el cruzamiento

FOTO 3. 1.

FOTO 3.1. ESTADO DE LOS OVULOS EL DIA DE CULTIVO "IN VITRO". TINCION DE CALCOFLUOR

FOTO 3.1.a. Núcleos de endospermo sin teñir (en) dentro del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).

FOTO 3.1.b. Embrión (em) en estado globular con las paredes teñidas y los núcleos de endospermo (en) sin teñir, en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (549X).

FOTO 3.1.c. Embrión (em) en estado globular y suspensor (s), rodeado de endospermo (en) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí'), a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).

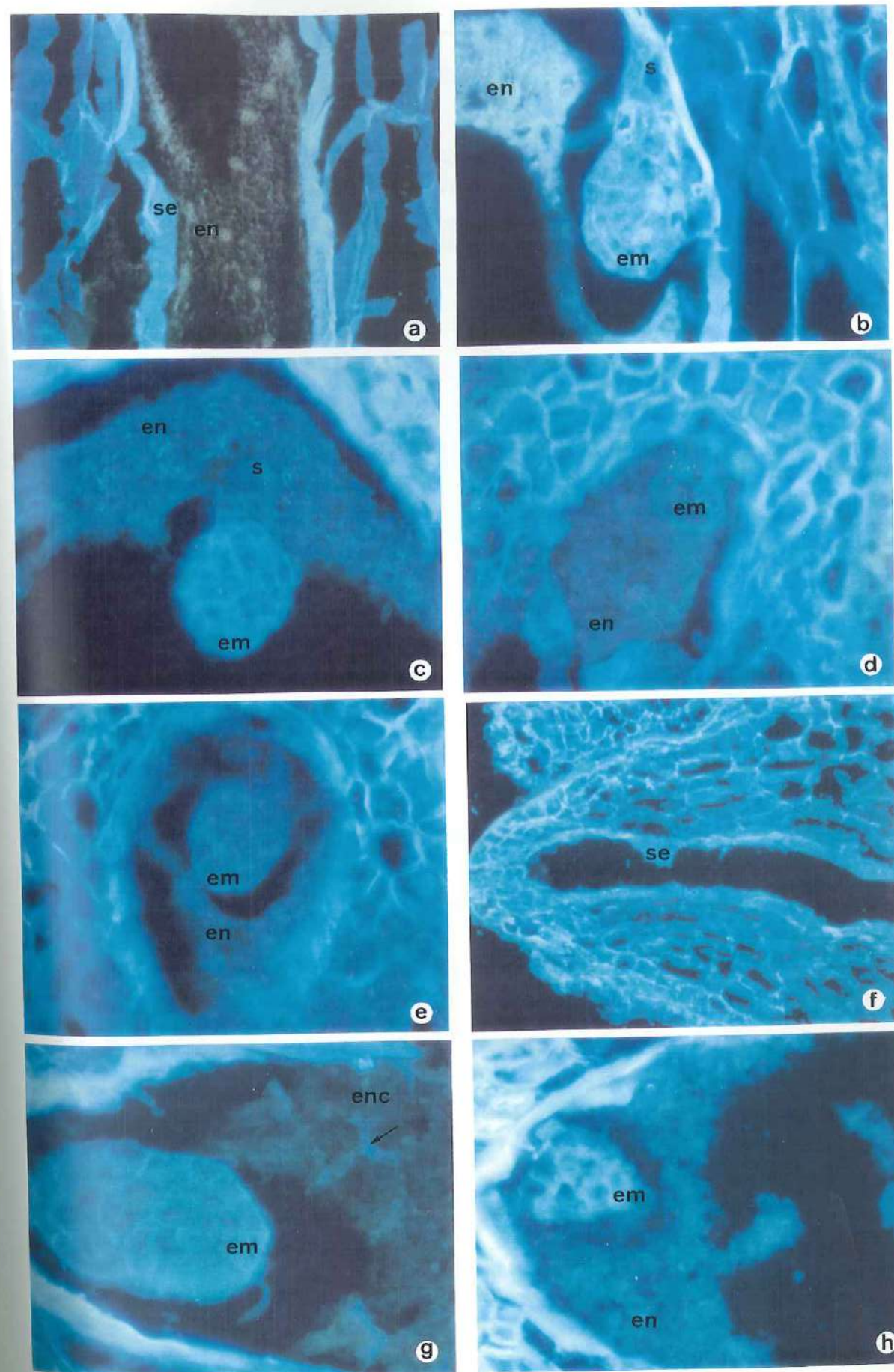
FOTO 3.1.d. Saco embrionario con embrión (em) globular y rodeado de endospermo en el cruzamiento intraespecífico II ('Cachirulo' x 'Balones') a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).

FOTO 3.1.e. Embrión en estado globular en el cruzamiento interespecífico III ('Cachirulo' x *P. tomentosa*) a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de calcofluor (549X).

FOTO 3.1.f. Saco embrionario (se) de 'Cachirulo' polinizado con 'Mirobolán 605', sin núcleos de endospermo ni embrión a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (206X).

FOTO 3.1.g. Embrión (em) e inicios de paredes celulares del endospermo (enc) en el cruzamiento intraespecífico IX ('Puebla de Soto' x 'Montizo') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).

FOTO 3.1.h. Embrión (em) y endospermo (en) nuclear en el cruzamiento interespecífico X ('Reina Claudia' x 'Montizo') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).



interespecífico X, el endospermo sigue siendo nuclear y el menor de 50 μ (Foto 3.1.h).

CUADRO 3.3.1.1. Tipo de endospermo, forma del suspensor y tamaño del embrión el día del cultivo "in vitro" (DCO) en los distintos cruzamientos.

Cruzamiento	DCO	Endospermo ^a	Suspensor ^b	Embrión (μ)
I	28	++	+	50
II	34	++	+	35
III	33	++	+	30
IV	39	++	++	40
V	34	--	--	--
VI	35	--	--	--
VII	30	++	++	40
VIII	31	--	--	--
IX	40	++*	+	90
X	39	++	+	50

^a++ Endospermo nuclear ++* Endospermo celular -- Sin núcleos de endospermo
^b++ Suspensor con mas de 5 células + Suspensor de 2 células -- Sin suspensor

3.3.1.2. Porcentaje de fecundación de los diferentes cruzamientos.

El cuadro 3.3.1.2. muestra el número de óvulos con sacos embrionarios mal formados y el número de óvulos con endospermo y embrión en los 10 cruzamientos analizados. De una media de 10-12 óvulos examinados para cada cruzamiento se observó una diferencia en el número de sacos mal formados mediante la técnica de aclareo de los óvulos dependiendo de la especie utilizada como planta polinizada.

En el cruzamiento I el saco llega hasta el extremo de la calaza formado por un endospermo nuclear que ocupa toda la longitud del saco embrionario (Foto 3.2.a) y por un embrión globular en el extremo del micropilo (Foto 3.2.b). En ninguno de los óvulos observados se presentaban pliegues o malformaciones a lo largo del saco.

En los cruzamientos II, III, IV y V del híbrido 'Cachirulo', se observó una media de óvulos con sacos mal formados muy parecida (40-50%) en los cuatro cruzamientos. Sin embargo, el porcentaje de óvulos en los que se pudieron ver núcleos de endospermo y embrión fue muy variable. En el cruzamiento II (con el otro híbrido 'Balones'), se pudo observar el embrión así como los núcleos de endospermo. Ello también pudo observarse en el cruzamiento interespecífico III (con *P. tomentosa*), aunque el embrión aparece en un porcentaje menor de óvulos (Foto 3.2.c); en muchos óvulos sólo se observaron núcleos en el saco embrionario (Foto 3.2.d). En los otros dos cruzamientos interespecíficos V (con 'Mirobolan 605 AD') y VI (con 'Mirandier 617'), muchos sacos se presentaron degenerados o mal formados y en aquéllos en los que se veía el saco embrionario formado, en ninguno se vio la presencia clara de embrión aunque sí óvulos que poseían núcleos aislados en la pared del saco (Foto 3.2.e).

En el cruzamiento VIII, del híbrido 'GF-31' (*P. cerasifera* x *P. salicina*), todos los óvulos tenían el saco embrionario en mal estado, observándose en todos ellos pliegues a lo largo de la longitud del óvulo (Foto 3.2.f). En ninguno de ellos se pudieron distinguir núcleos de endospermo ni de embrión. En el cruzamiento VII se observaron núcleos de endospermo (Foto 3.3.a) y embrión en la mayoría de los óvulos, ya que sólo unos pocos presentaron el saco mal formado. También se observó que algún óvulo con endospermo no tenía embrión. En el cruzamiento interespecífico IV, de 'Mirobolán B' x 'Moniquí', aproximadamente en la mitad de los óvulos se observaron los núcleos de endospermo (Foto 3.3.b) y un embrión en estado globular (Foto 3.3.c).

En los cruzamientos IX y X el porcentaje de óvulos mal formados fue menor. En el cruzamiento interespecífico IX la fecundación es menor que en el cruzamiento interespecífico X, el endospermo no se distingue si es celular o nuclear pero el embrión se encuentra en estado globular (Foto 3.3.d). En el cruzamiento interespecífico X se observa el embrión en estado globular diferenciado (Foto 3.3.e) y los núcleos de endospermo se observan más claramente (Foto 3.3.f).

FOTO 3. 2.

FOTO 3.2. ESTADO DE LOS OVULOS EL DIA DE CULTIVO "IN VITRO". TECNICA DE ACLAREO DE OVULOS.

FOTO 3.2.a. Núcleos de endospermo (en) dentro del saco embrionario en el cruzamiento intraespecífico I ('Moniquí' x 'Canino') a la 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (560 X).

FOTO 3.2.b. Embrión (em) en estado globular, endospermo (en), y suspensor (s) en el cruzamiento intraespecífico I ('Moniquí' x 'Canino') a 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350X).

FOTO 3.2.c. Saco embrionario (se) con embrión (em) en el cruzamiento interespecífico I ('Cachirulo' x *P.tomentosa*) a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).

FOTO 3.2.d. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico III ('Cachirulo' x *P.tomentosa*) a la 5ª semana después de la antesis con núcleos (n) sin diferenciar. Tinción de hematoxilina (350 X).

FOTO 3.2.e. Saco embrionario (se) de 'Cachirulo' con núcleos sin diferenciar en la pared, a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).

FOTO 3.2.f. Saco embrionario (se) de 'GF-31' con pliegues en la pared, en el cruzamiento interespecífico VIII ('GF-31' x *P.tomentosa*) a la 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (140X).

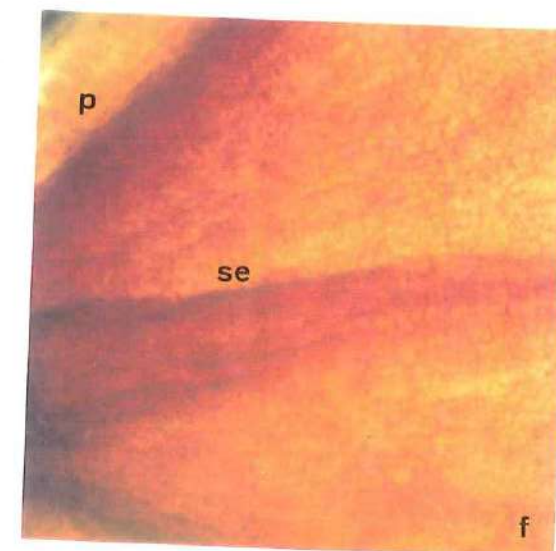
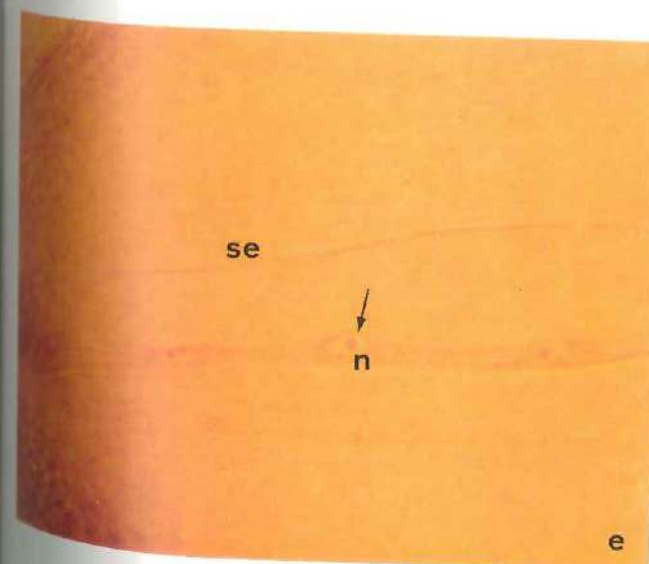
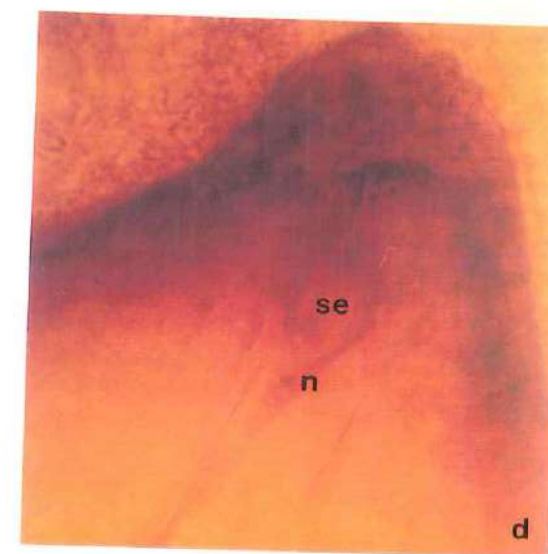
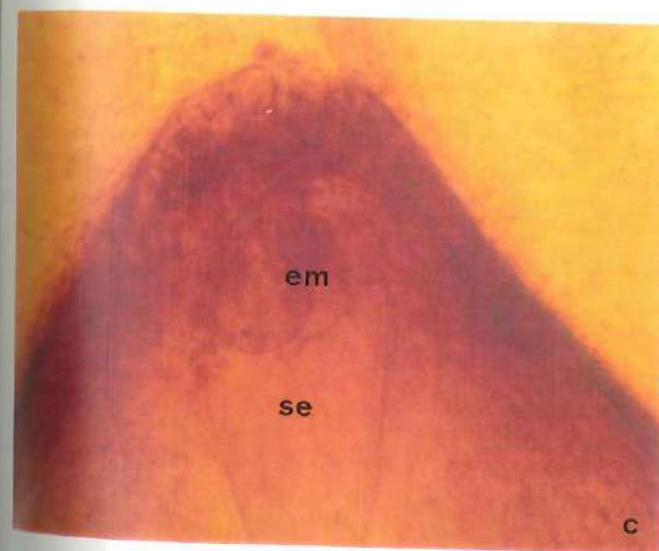
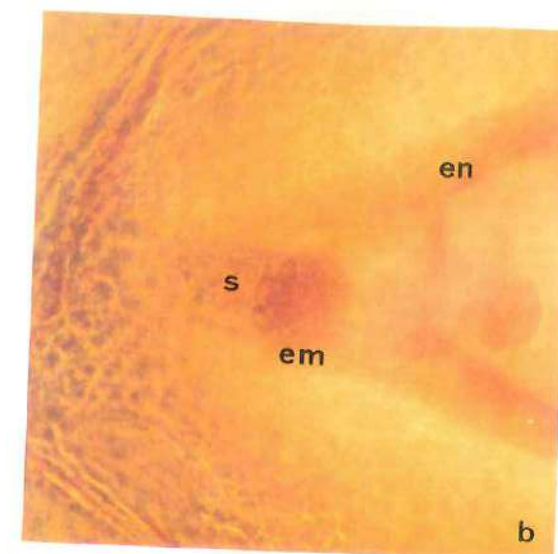
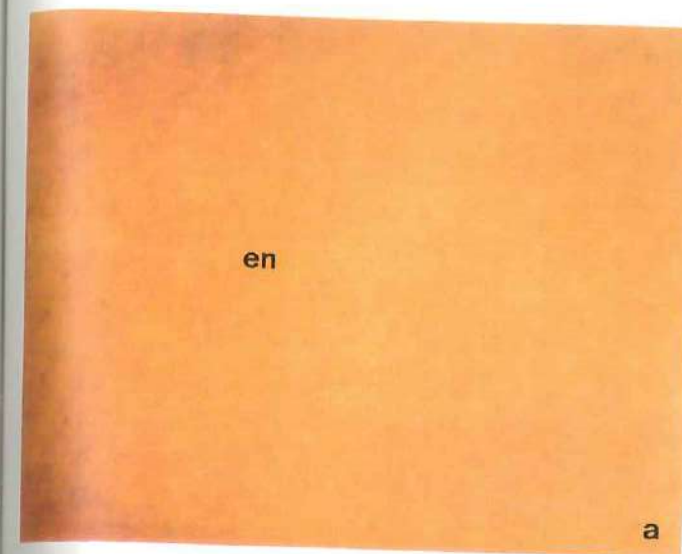


FOTO 3. 3.

FOTO 3.3. ESTADO DE LOS OVULOS EL DIA DE CULTIVO "IN VITRO". TECNICA DE ACLAREO DE OVULOS.

FOTO 3.3.a. Núcleos (flecha) de endospermo (en) dentro del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).

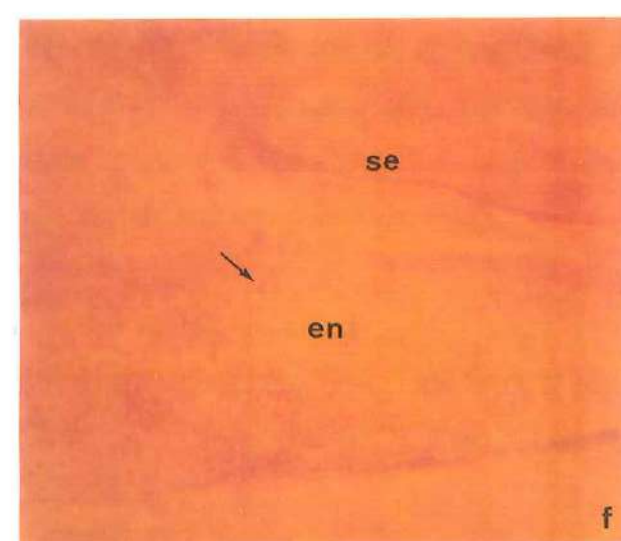
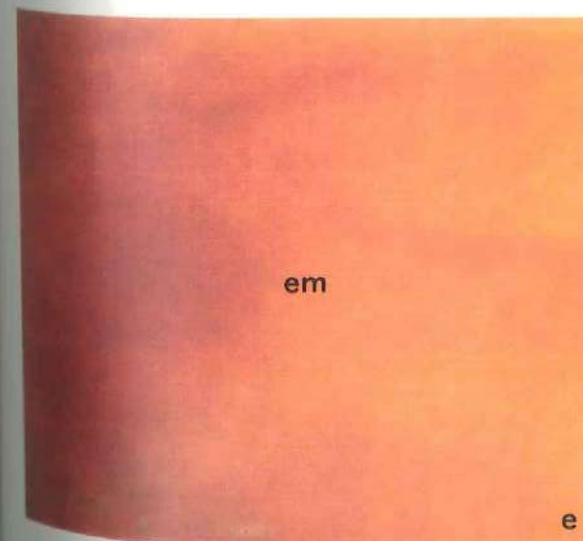
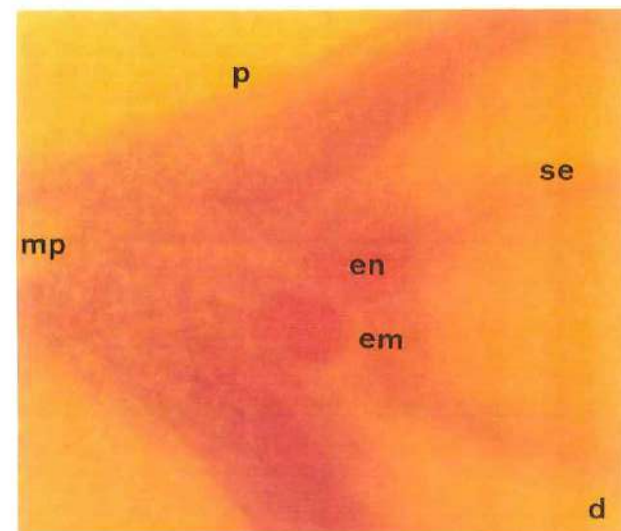
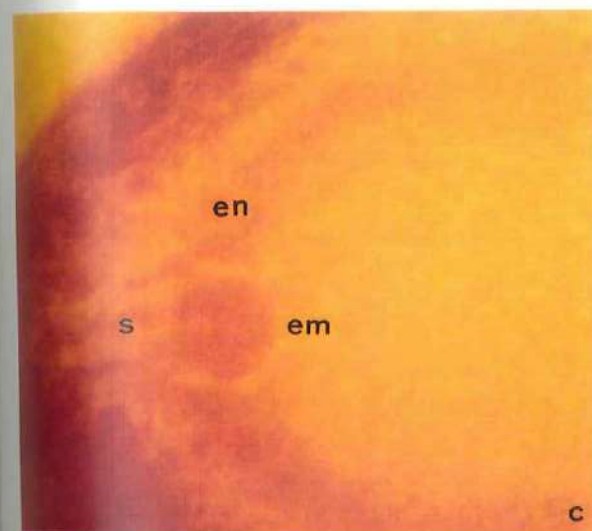
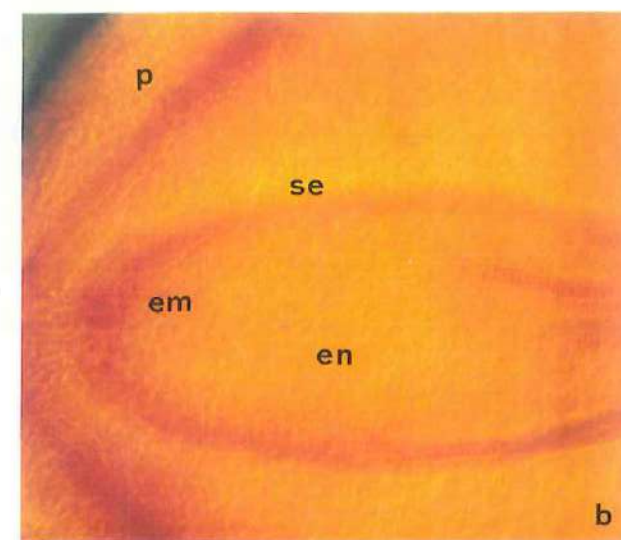
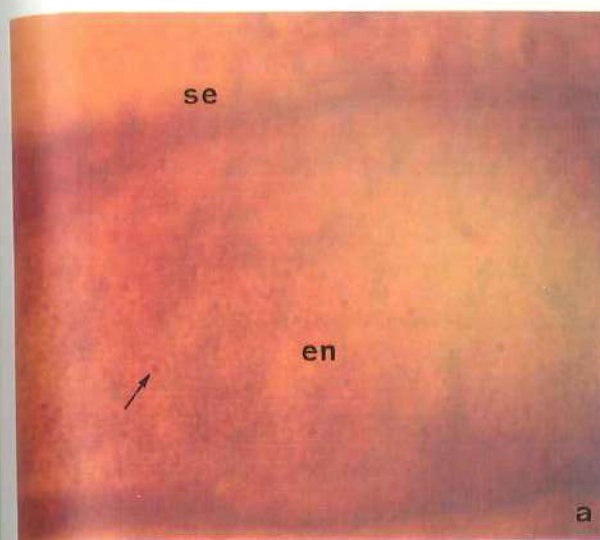
FOTO 3.3.b. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') a la 5ª semana después de la antesis con el embrión globular (em) y núcleos de endospermo (en). Tinción de hematoxilina (140 X).

FOTO 3.3.c. Suspensor (s), embrión globular (em) rodeado de endospermo (en) en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de hematoxilina (560 X).

FOTO 3.3.d. Endospermo (en) rodeando al embrión (em) globular en el extremo micropilar (mp) del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico IX ('Puebla de Soto' x 'Montizo') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).

FOTO 3.3.e. Embrión (em) en estado globular en el cruzamiento interespecífico X ('Reina Claudia' x 'Montizo') a la 5ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (560 X).

FOTO 3.3.f. Núcleos (flecha) de endospermo (en) en el saco embrionario (se) del cruzamiento interespecífico X ('Reina Claudia' x 'Montizo') a la 5ª semana después de la antesis. Tinción de hematoxilina (560 X).



CUADRO 3.3.1.2. Porcentaje de fecundación, sacos embrionarios mal formados, óvulos con endospermo y óvulos con embrión el día de la puesta en cultivo "in vitro" de los óvulos en los diferentes cruzamientos.

Cruzamiento	Total	%sacos mal formados	Ovulos con endospermo	Ovulos con embrión	%Fecundación
I	13	0	13	11	84.6
II	10	40.00	6	6	60.0
III	13	38.46	8	4	30.7
IV	15	6.66	7	7	46.6
V	12	50.0	0	0	0
VI	12	41.66	0	0	0
VII	13	8.33	12	11	92.3
VIII	10	100	0	0	0
IX	15	6.66	11	11	73.3
X	12	8.33	10	10	83.3

3.3.1.3. Porcentaje de degeneración de los óvulos en los diferentes cruzamientos.

En los cruzamientos en los que se ha hecho el seguimiento desde la antesis hasta la fecundación se ha determinado que ésta tiene lugar a los 15-20 días después de la polinización. El estudio del óvulo primario entre la 4ª y 5ª semana después de la polinización refleja que los ovarios o presentan un óvulo fecundado y el otro degenerado, o no han sido fecundados ninguno de los dos óvulos y por tanto aparecen degenerados. La degeneración también puede ocurrir en óvulos fecundados por falta de nutrientes hacia el óvulo.

Este porcentaje de degeneración es del 100% en los cruzamientos en los que no ha habido fecundación, que son dos interespecíficos en los que la planta polinizada es un híbrido: V ('Cachirulo' x 'Mirobolan 605 AD') y VI ('Cachirulo' x 'Mirandier 617') (Foto 3.4.a). Un

porcentaje menor de degeneración, aunque considerable se registra en los otros dos cruzamientos de 'Cachirulo', II y III, en los que es de 80% y 90% respectivamente.

El cuadro 3.3.1.3. muestra el porcentaje de óvulos con depósitos de callosa en el extremo de la calaza. En el grupo de Mirobolanes la degeneración es muy alta, con depósitos de callosa tanto en la zona de la calaza como en el micropilo. En el cruzamiento VIII no se consiguió distinguir el saco embrionario (Foto 3.4.b). La degeneración en los óvulos de 'Mirobolán 605' en el cruzamiento VII es mayor que en el cruzamiento interespecífico IV con el 'Mirobolán B' en el que esta acumulación fue menor (Foto 3.4.c). En los cruzamientos IX y X los depósitos de callosa en la calaza no son tan numerosos aunque sí se ha tomado como un indicio de la degeneración, por lo que se ha considerado que es del orden del 50% y 20% en los cruzamientos IX y X respectivamente

CUADRO 3.3.1.3. Porcentaje de degeneración de óvulos el día de la puesta en cultivo de los óvulos en cada cruzamiento.

Cruzamiento	Total óvulos	%Degeneración
I	10	10.0 %
II	10	80.0 %
III	10	90.0 %
IV	13	69.2 %
V	10	100 %
VI	10	100 %
VII	10	90.0 %
VIII	10	100 %
IX	10	50.0 %
X	10	20.0 %

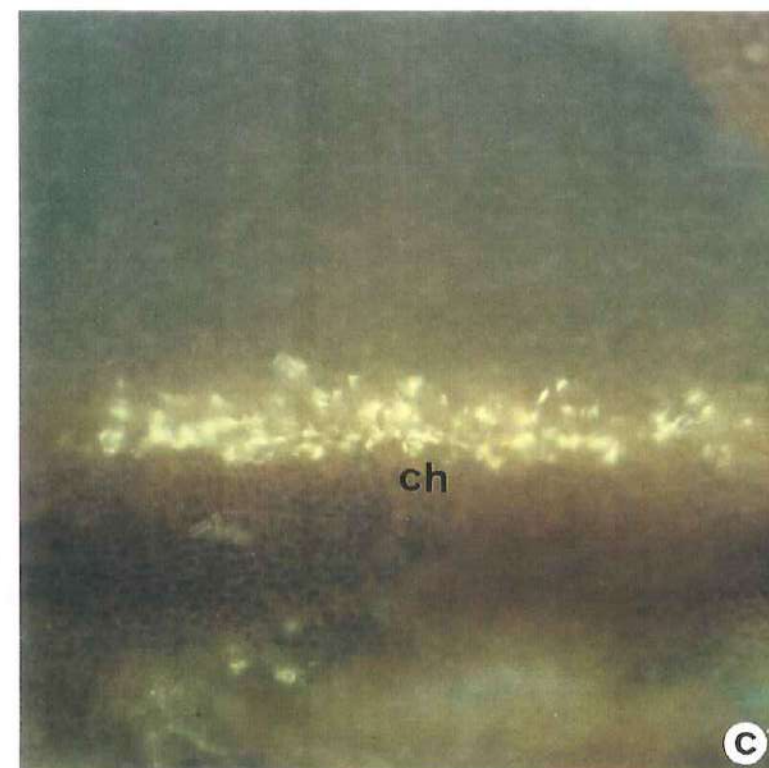
FOTO 3. 4.

FOTO 3.4. DEGENERACION DE OVULOS EL DIA DE CULTIVO "IN VITRO"

FOTO 3.4.a. Callosa en la calaza (ch) del saco embrionario del híbrido 'Cachirulo' a la 4ª semana de la antesis. Tinción de azul de anilina (124 X).

FOTO 3.4.b. Callosa en la calaza (ch) del saco embrionario del híbrido 'GF-31' a la 4ª semana de la antesis. Tinción de azul de anilina (124 X).

FOTO 3.4.c. Callosa en la calaza (ch) del saco embrionario del 'Mirobolán B' a la 4ª semana de la antesis. Tinción de azul de anilina (124 X).



3.3.2. Crecimiento en cultivo "in vitro".

3.3.2.1. Embrión.

Después de cinco semanas de cultivo del óvulo en medio líquido el embrión alcanzó un tamaño considerable y ya sobresale de los límites del tegumento (Foto 3.5.a). Solamente en el cruzamiento VII se obtuvo un tamaño considerable del embrión para el posterior cultivo del embrión aislado (Foto 3.5.b); se obtuvieron embriones en los cuatro medios de cultivo de óvulos, siendo el porcentaje mayor en los dos medios sin hormonas, tanto con 6% como con 10% de sacarosa (Fig. 3.3.2.a). En el resto de los cruzamientos, solamente en el cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') fue visible el embrión bajo el binocular en el medio de cultivo sin hormonas y con 6% de sacarosa (Foto 3.5.c). En el resto de cruzamientos no se pudo distinguir una estructura clara de embrión.

3.3.2.2. Endospermo.

El crecimiento del endospermo se pudo observar en tres de los cruzamientos interespecíficos: en el I ('Moniquí' x 'Canino'), con los porcentajes más altos en los dos medios con 10% de sacarosa, con y sin hormonas; en el VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') donde los mayores porcentajes fueron en los dos tratamientos sin hormonas con 6 y 10 % de sacarosa (Fig. 3.3.2.a) y en el IX ('Puebla de Soto' x 'Montizo') en el que la respuesta fue muy parecida en todos los tratamientos (Fig. 3.3.5.a). En los cuatro cruzamientos interespecíficos, en el IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') presentan endospermo el 40% de los óvulos en los dos tratamientos con 6% de sacarosa independiente del tratamiento con hormonas y un menor crecimiento se observa en el tratamiento con 10% de sacarosa (Fig. 3.3.2.b). En el cruzamiento X se observa un 50% de óvulos con crecimiento de endospermo en los dos tratamientos con 6% de sacarosa (Fig. 3.3.5.b). En los cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo', se observó endospermo en el cruzamiento II con 'Balones' (Fig. 3.3.3.a) en los dos medios con 6 y 10% de sacarosa pero sin hormonas; y en el cruzamiento III sólo en el medio con 6% de sacarosa

y sin hormonas (Fig. 3.3.3.b; Foto 3.5.d).

3.3.2.3. Callo.

Se observó la presencia de callo en los tegumentos en todos los cruzamientos que fueron ensayados en el cultivo "in vitro", excepto en el cruzamiento I de los dos albaricoqueros, en el que no se formó callo en ninguno de los tratamientos (Foto 3.6.a., Fig. 3.3.1). Es de señalar que los mayores porcentajes de óvulos con callo corresponden a los 4 cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo' como planta polinizada, los cruzamientos II, III, V y VI (Foto 3.6.b). En el cruzamiento II, casi el 100% de los óvulos en todos los medios de cultivo presentan crecimiento de callo (Fig. 3.3.3.a) y una media de 73% en el cruzamiento VI con el otro híbrido 'Mirandier 617' (Fig. 3.3.4.b); en el cruzamiento V con 'Mirobolán 605' una media de 58% de óvulos con callo entre todos los tratamientos (Fig. 3.3.4.a) y el cruzamiento con *P. tomentosa* es el que tiene menor porcentaje, con 50% en los dos tratamientos SH 6% y SHH 6% y sólo el 13% en SHH 10% (Fig. 3.3.3.b).

En los cruzamientos IV y VII con los óvulos de mirobolán, el cruzamiento interespecífico IV (Fig. 3.3.2.a) presenta mayores porcentajes de óvulos con callo en los cuatro tratamientos (Fig. 3.3.2.a; Foto 3.6.c) que el cruzamiento intraespecífico VII.

De los dos cruzamientos con ciruelos hexaploides, se produjo callo en todos los tratamientos en el cruzamiento IX de los dos pollizos (Foto 3.6.d), con un mayor porcentaje en el tratamiento SHH6% que en el resto de los tratamientos (Fig. 3.3.5.a); en el cruzamiento X, sólo se produjo callo en dos de los tratamientos, SH6% y SHH 6% (Fig. 3.3.5.b; Foto 3.6.e).

FOTO 3. 5.

FOTO 3.5. CRECIMIENTO DEL EMBRION Y ENDOSPERMO EN CULTIVO "IN VITRO"

FOTO 3.5.a. Crecimiento del embrión dentro del óvulo (ov) en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') después de 5 semanas en cultivo de óvulo "in vitro".

FOTO 3.5.b. Cultivo del embrión (em) aislado después de 5 semanas en cultivo dentro del óvulo en el cruzamiento VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B').

FOTO 3.5.c. Embrión del cruzamiento interespecífico IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') después de 5 semanas en cultivo de ovulo "in vitro"(14.5 X).

FOTO 3.5.d. Endospermo del cruzamiento interespecífico III ('Cachirulo' x *P.tomentosa*) después de 5 semanas de cultivo "in vitro" (6.4 X).

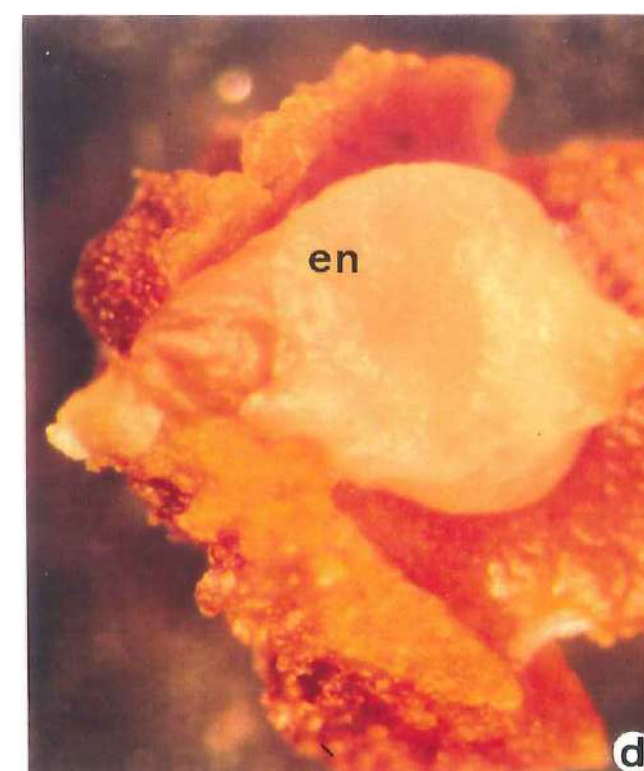
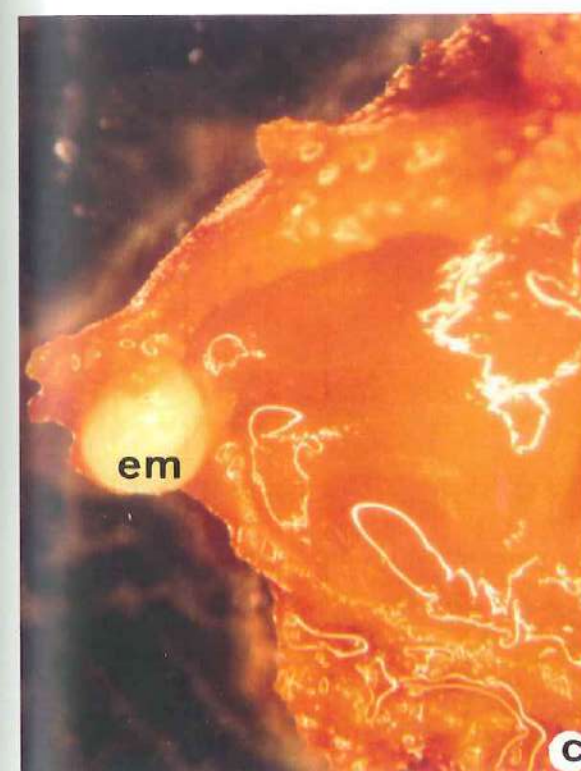
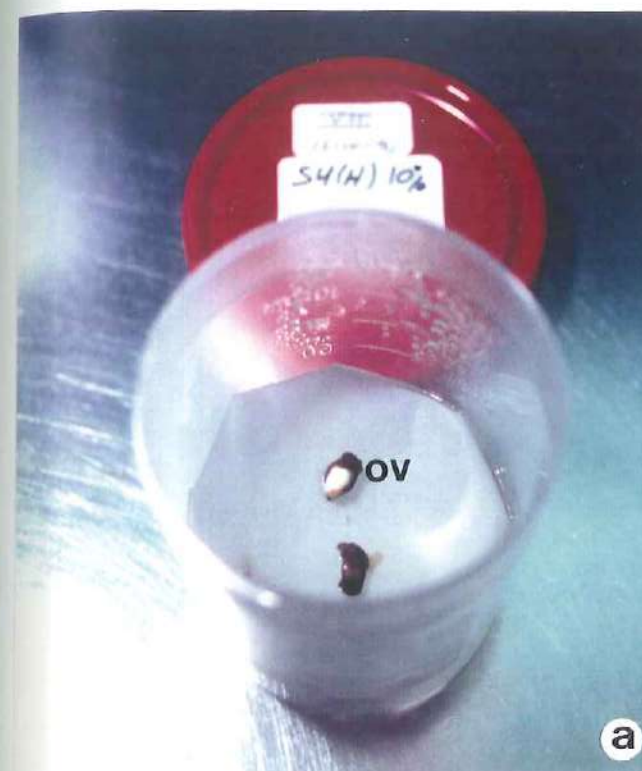


FOTO 3. 6.

FOTO 3.6. FORMACION DE CALLO EN LOS DIFERENTES CRUZAMIENTOS

FOTO 3.6.a. Ovulo de 'Moniquí' sin callo después de 5 semanas de cultivo "in vitro" (6.7X).



FOTO 3.6.b. Ovulo de 'Cachirulo' con callo después de 5 semanas de cultivo "in vitro" (10X).

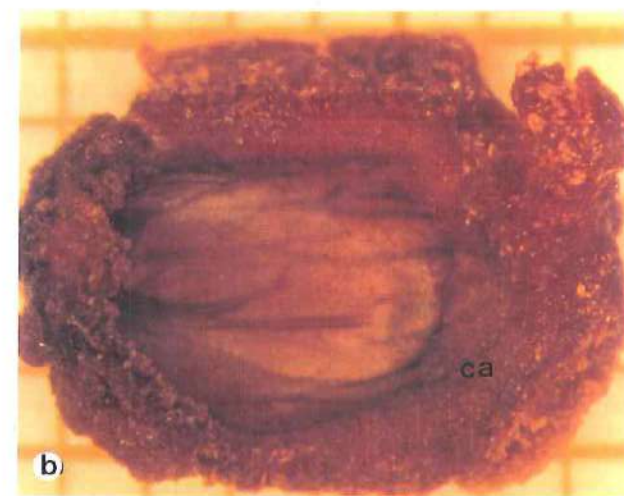


FOTO 3.6.c. Ovulo de 'Mirobolán 605' con callo (ca) después de 5 semanas de cultivo "in vitro" (10 X).

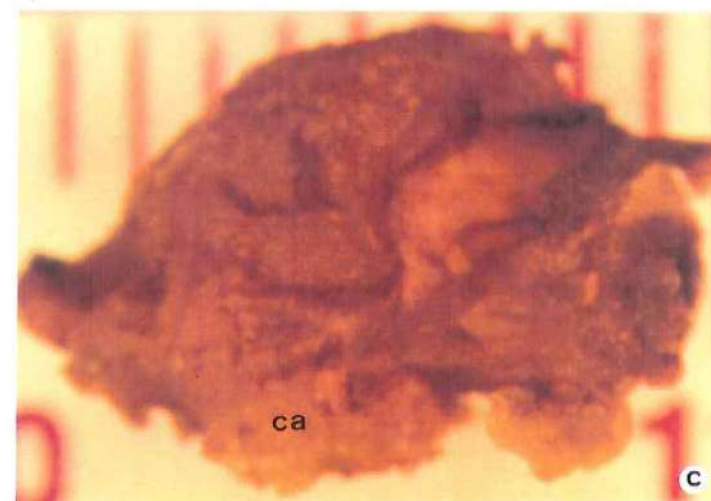


FOTO 3.6.d. Ovulo de 'Puebla de Soto 101' con callo (ca) en la parte de la calaza después de 6 semanas de cultivo "in vitro" (10 X).

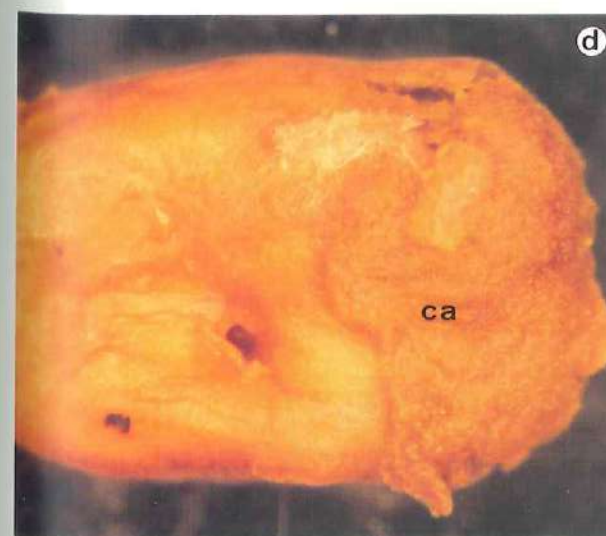
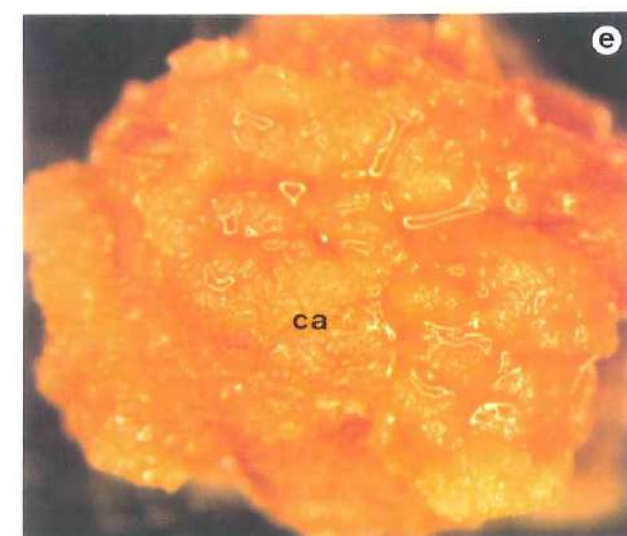


FOTO 3.6.e. Ovulo de 'Reina Claudia' con mucho callo (ca) en toda la extensión del óvulo después de 6 semanas de cultivo "in vitro" (10 X).



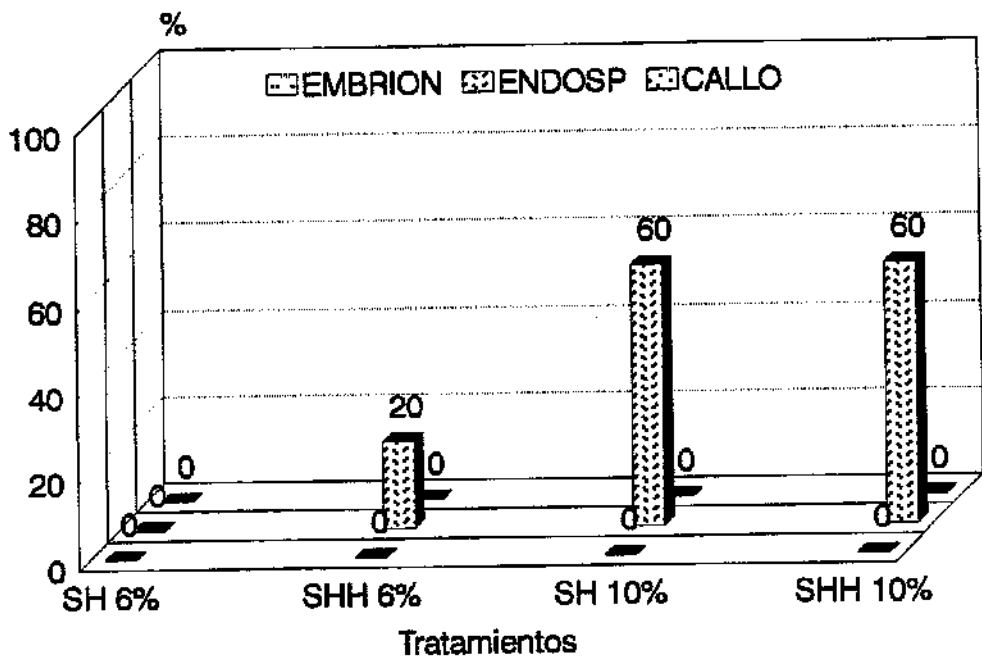


Figura 3.3.1.. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico
I: Moniquí x Canino

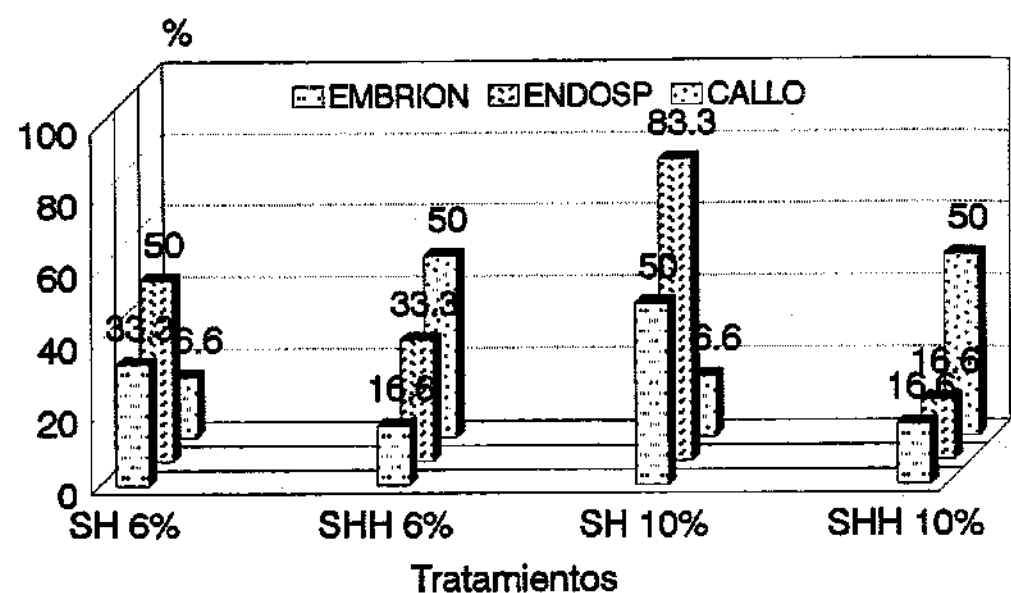


Figura 3.3.2.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B

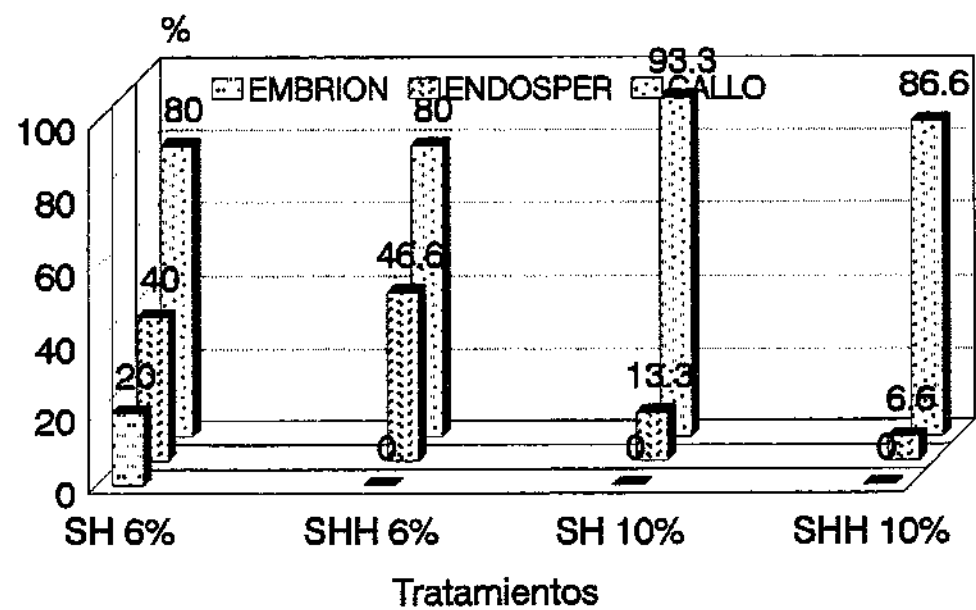


Figura 3.3.2.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí

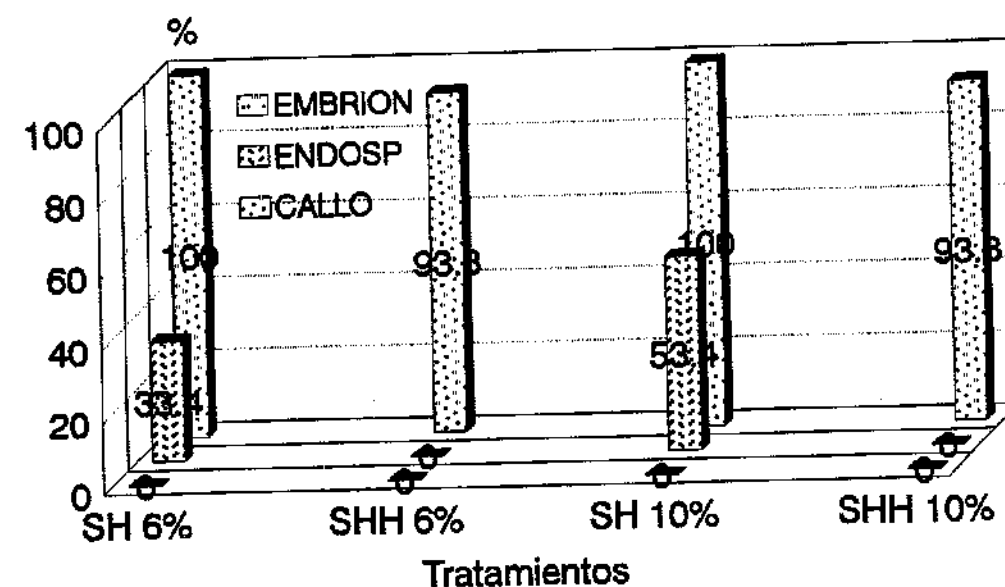


Figura 3.3.3.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo X Balones

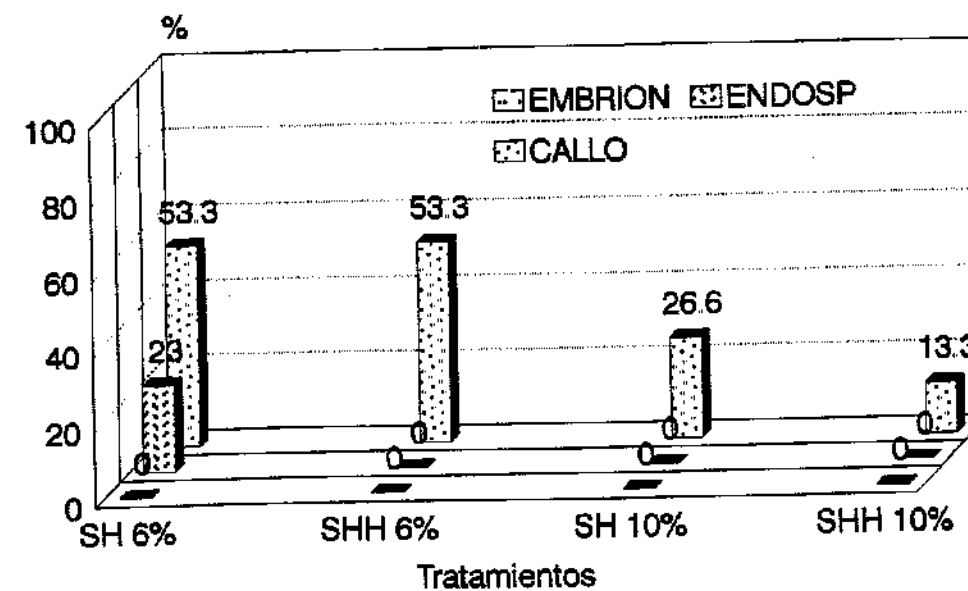


Figura 3.3.3.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo X Plomerosa

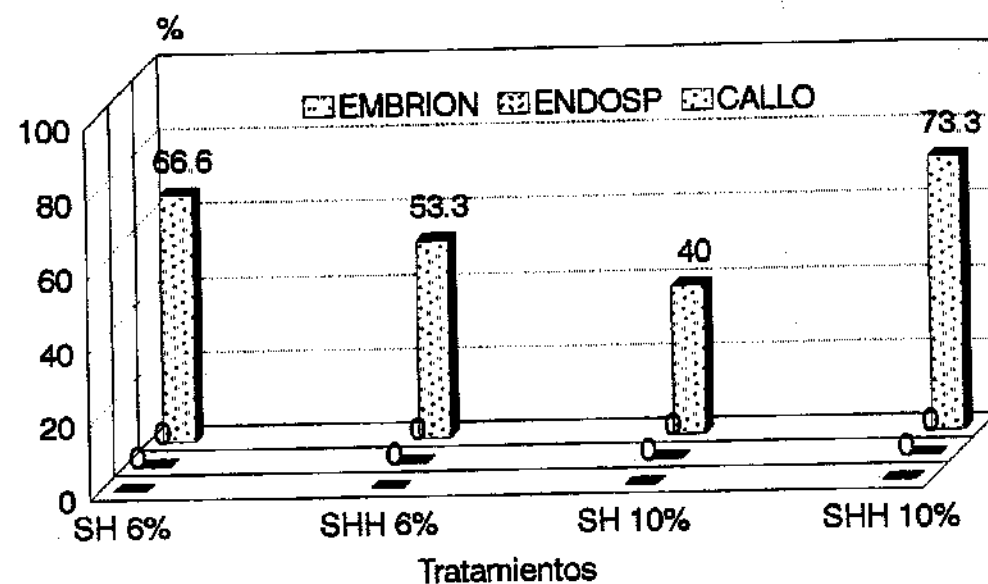


Figura 3.3.4.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo X Mirobolán 605

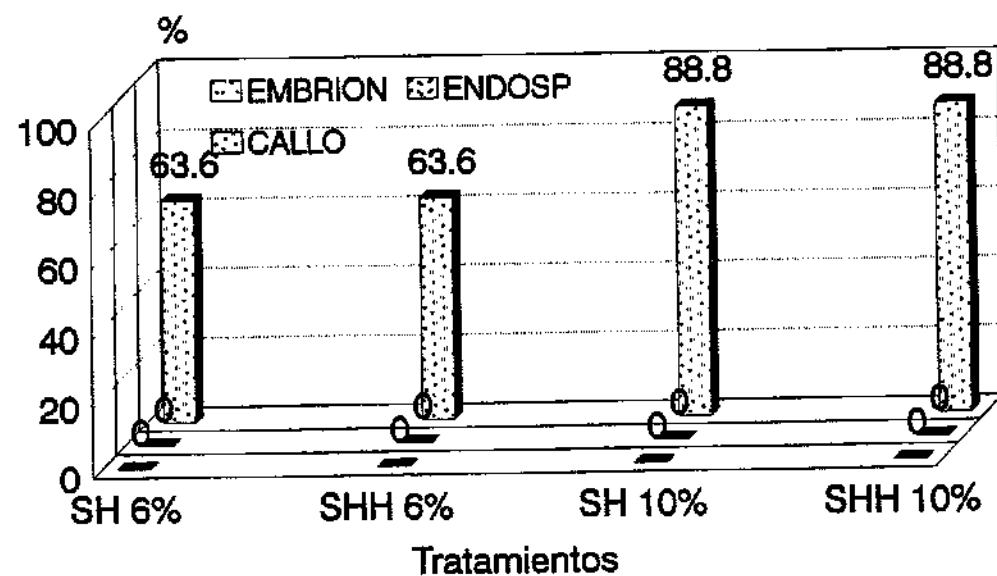


Figura 3.3.4.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo X Mirandier 617

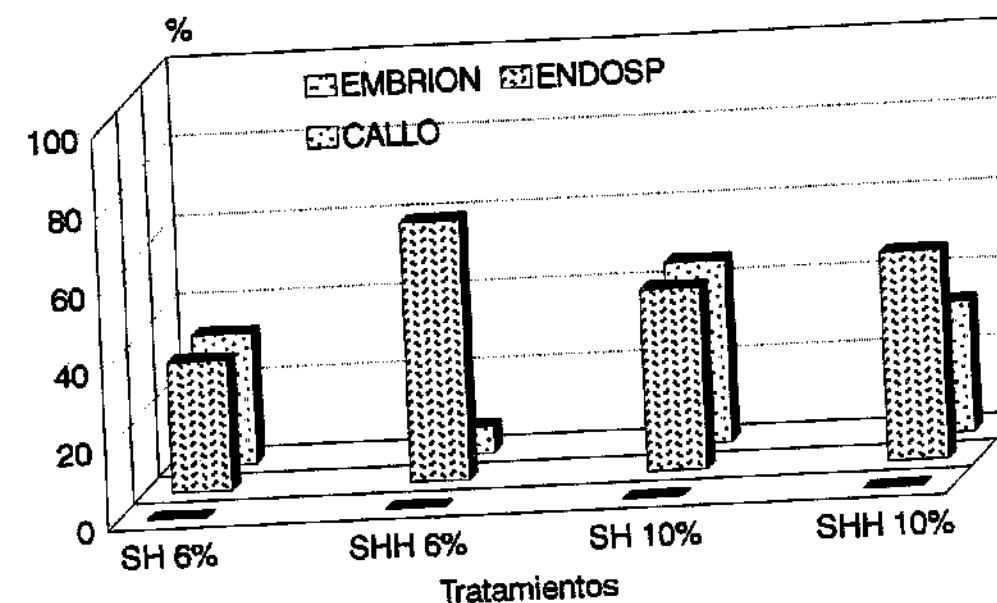


Figura 3.3.5.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto X Montizo

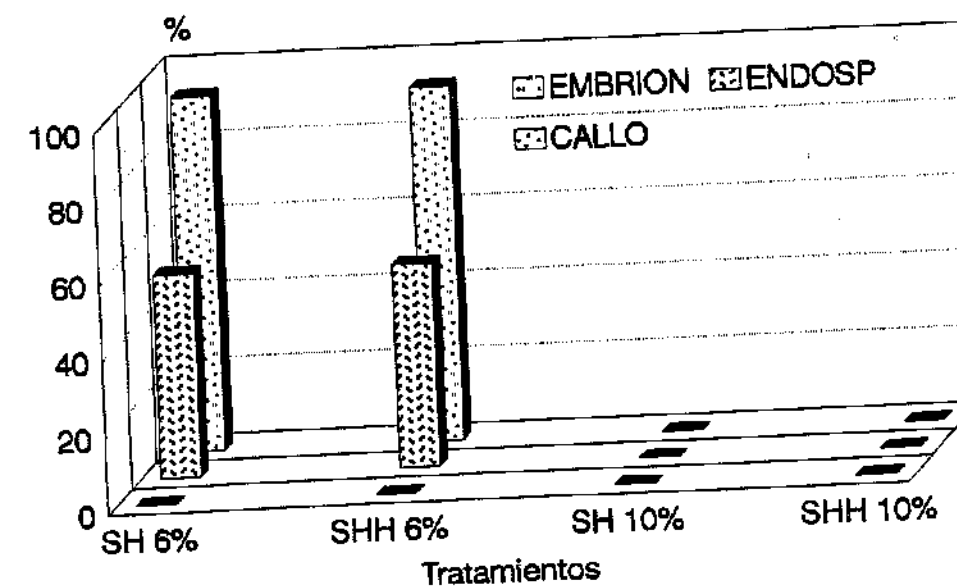


Figura 3.3.5.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia X Montizo

3.4. DISCUSION.

3.4.1. Estado de los óvulos.

En todas las especies en las que se ha seguido el desarrollo postzigótico se ha observado que la división del endospermo es al principio nuclear, junto con la división del cigoto, que posteriormente da lugar al suspensor y al verdadero embrión, siguiendo el esquema descrito en la embriología de todas las angiospermas y concretamente en *Prunus*, (DORSEY, 1919a; BRADBURY, 1929; TUKEY, 1933; JACKSON y COOMBE, 1966; LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971; HAWKER y BUTTROSE, 1980).

En todos los cruzamientos las observaciones se realizaron entre la 4ª y 5ª semana después de la polinización, cuando se realizó el cultivo de óvulos. Las primeras observaciones corresponden al cruzamiento intraespecífico I (entre los dos albaricoqueros) y al cruzamiento intraespecífico VII (de los dos mirabolanes). En ambos se observa el embrión de forma globular, con un tamaño menor en el mirabolán, y el endospermo nuclear en ambos. Estas observaciones del albaricoquero se corresponden con lo descrito para otras variedades, en las que el embrión empieza a reconocerse a los 30 días (JACKSON y COOMBE, 1966), sin embargo el endospermo permanece nuclear hasta los 25 días y en la variedad 'Moniquí' en particular el endospermo sigue nuclear a los 28 días. Esto depende sin duda del momento en que se haya llevado a cabo la polinización, lo que según las variedades puede ocurrir en diferentes períodos. En el cruzamiento interespecífico IV, el embrión posee aproximadamente el mismo tamaño que en el caso del cruzamiento intraespecífico VII. En el cruzamiento VIII del híbrido de (*P.cerasifera* x *P.salicina*) x *P.tomentosa*, a la 5ª semana después de la antesis no se ha podido identificar la presencia de núcleos de endospermo ni de embrión, pero sí sacos embrionarios con diversos pliegues que no ocupan toda la longitud del óvulo, lo cual indica que no ha tenido lugar la fecundación por haberse mostrado su incompatibilidad a nivel prezigótico. También el porcentaje de degeneración fue mayor que en los mirabolanes, lo que puede ser debido a una característica propia de su condición híbrida, como se ha observado también en los óvulos del híbrido 'Cachirulo', y como se ha descrito en otros cultivares híbridos (SOCIAS

i COMPANY et al., 1976; PIMIENTA y POLITO, 1983).

La fecundación depende de la viabilidad de los óvulos en el momento de la fecundación. Se ha podido observar por la tinción de la callosa (ANVARI y STÖSSER, 1978) que la viabilidad de los óvulos, como se ha descrito para muchas especies de *Prunus*, puede variar según la especie y el cultivar y que flores en el mismo estado de desarrollo pueden tener sacos con diferentes grados de maduración (EATON y JAMONT, 1964; STÖSSER y ANVARI, 1983; PIMIENTA y POLITO, 1983). La fecundación es mayor en el cruzamiento intraespecífico de *P.cerasifera* ('Mirobolán B' x 'Mirobolán 605') que en el interespecífico *P.cerasifera* x *P.armeniaca* ('Mirobolán B' x 'Moniquí'), a pesar de que el primero presente un mayor porcentaje de óvulos degenerados. Según STÖSSER y ANVARI (1982) en estos óvulos nunca entran tubos de polen. En el cruzamiento VII es posible que ocurra una degeneración, incluso después de la fecundación (MOGENSEN, 1975), bien por falta de translocación de nutrientes o por una competencia mayor en las plantas con mayor número de flores como son los mirabolanes.

En los cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo' se pudo afirmar la presencia de embrión y endospermo por medio de las técnicas de histoquímica y determinar el porcentaje de fecundación mediante la técnica de aclareo de óvulos en la quinta semana después de la antesis.

En los cruzamientos con el otro híbrido 'Balones' y con *P.tomentosa* se observó que se habían formado embrión y núcleos de endospermo en ambos. El tamaño del embrión en el melocotonero es de 150 μ a la 7ª semana después de polinización (LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971), pero en el almendro a la 6ª semana es sólo un grupo de células (HAWKER y BUTTROSE, 1980). Teniendo en cuenta que 'Cachirulo' es un híbrido de estas dos especies y que el estudio se realizó aproximadamente a la 5ª semana, después de la antesis, con un tamaño de embrión de 40 μ , el patrón de su desarrollo sería más similar al del almendro que al del melocotonero, independientemente del polen utilizado. También las paredes celulares empiezan a formarse a la 6ª o 8ª semana dependiendo de la variedad en melocotonero (LILIEN-KIPNIS y LAVEE, 1971; ARBELOA y HERRERO, 1989) y en el almendro a la 10ª semana (HAWKER y BUTTROSE, 1980). Aunque el embrión es del mismo tamaño, la fecundación

es mayor en el cruzamiento II, considerado como interespecífico, lo cual hace suponer que la causa del bajo nivel de fecundación en ese momento puede deberse a una manifestación de la incompatibilidad interespecífica postzigótica.

En los dos cruzamientos interespecíficos V ('Cachirulo' x 'Mirobolan AD 605') y VI ('Cachirulo' x 'Mirandier 617'), no se han observado núcleos de endospermo en ninguno de ellos mediante ninguna de las dos técnicas, que son fiables para establecer resultados cuantitativos (PALSER *et al.*, 1992). Ello indicaría que en estos cruzamientos el nivel de fecundación es cero y supondría que se trata de cruzamientos incompatibles, pero que las barreras se manifestarían a nivel prezigótico, como podría ser la parada de los tubos polínicos en el ovario al igual que en otros cruzamientos interespecíficos (WILLIAMS *et al.*, 1982).

En los dos cruzamientos con los ciruelos hexaploides, se observa una diferencia importante en su desarrollo ya que en el cruzamiento intraespecífico IX el tamaño del embrión es considerablemente mayor que en el cruzamiento interespecífico X. En el primero incluso se pueden ver las primeras formaciones de las paredes celulares, especialmente en los núcleos alrededor del embrión, como lo indica la tinción de calcofluor específica de las paredes celulares. Sin embargo, en el cruzamiento X, interespecífico, el desarrollo del embrión está más retrasado. Este desarrollo ha sido descrito en detalle en otro ciruelo europeo, en el cual a la 4ª semana después de la polinización se han observado de 4 a 8 células del embrión, pero el endospermo celular no empieza a formarse hasta la 10ª semana después de la polinización (JEFFERIES, 1975), si bien en el cruzamiento IX se ha podido observar a partir de la 5ª semana. Este retraso en *P.domestica* podría ser debido a que la fecundación se realiza más tarde, lo cual en el cruzamiento X sería menos probable porque la velocidad de los tubos polínicos es mayor que en el IX (capítulo 1.4). Por otra parte la propia embriogénesis podría estar regulada por diferentes genes que el proceso hasta la fecundación y la fase gametofítica (GOLDBERG *et al.*, 1989). Así la fecundación vendría favorecida por el buen crecimiento de los tubos polínicos, pero también por un mejor estado de los óvulos en un clon cultivado por sus frutos, y por lo tanto seleccionado hace tiempo por su buena producción, que no en un pollizo, clon utilizado como patrón y cuyo desarrollo embrionario no ha sido estudiado por

carecer de importancia su producción de frutos, por lo que los tubos polínicos podrían llegar más tarde, sin poder penetrar en los óvulos que ya podrían encontrarse en mal estado (STÖSSER y ANVARI, 1982). La fecundación no sólo depende de la llegada del tubo polínico, sino también del estado de los óvulos que van a producir la semilla, y en el estado de los óvulos pueden influir muchos factores, como nutricionales, ambientales... (THOPSOM y LIU, 1973; DUMAS y KNOX, 1983).

3.4.2. Técnicas empleadas para el estudio.

Para el estudio del material fijado el día en que se llevó a cabo la puesta en cultivo "in vitro" de los óvulos, se utilizaron dos técnicas citohistológicas. Las dos dieron buenos resultados y ambas tienen ventajas e inconvenientes. Dado el número de muestras a observar, se optó por la puesta a punto de la técnica del aclareo de óvulos, que permite una preparación rápida, lo cual posibilita la observación de un mayor número de óvulos, aunque la observación a veces es dificultosa (HERR, 1971; LEVIEYL y HUYGUE, 1985; PALSER *et al.*, 1992).

La técnica del aclareo de óvulos permite demostrar diferencias en cuanto a la observación y su respuesta bajo el microscopio de contraste de fases. Teniendo en cuenta la variabilidad del material estudiado, así como su diferente estado de desarrollo y grado de maduración, la respuesta ha sido diferente. Por una parte el estado del óvulo repercute en la cantidad de fenoles que puede haber en la testa (HERR, 1992) y los tiempos de prelavado varían. Posteriormente en relación a estas diferencias, la penetración en el óvulo tanto del tinte como del agente aclarante se produce con diferente facilidad, por lo que en función de esta penetración la observación resultó más o menos clara.

Por otro lado la técnica de inclusión, corte y tinción es más laboriosa, pero permite una observación más precisa y ofrece unos resultados más claros (HUGHES y Mc CULLY, 1975).

El método de determinación de callosa ha resultado útil (DUMAS y KNOX, 1983) para establecer el porcentaje de degeneración en cualquier momento, no así el de la fluoresceína

disódica (MOGENSEN, 1981), que ofreció resultados contradictorios y confusos con los dos cultivares utilizados.

3.4.3. Cultivo "in vitro".

Una de las aplicaciones del cultivo de óvulos "in vitro" es la de superar las barreras postzigóticas que se puedan presentar en la producción de híbridos interespecíficos e incluso intergenéricos (HOSSAIN *et al.*, 1990). El desarrollo del óvulo cultivado "in vitro" ha demostrado ser más lento en algunas especies que "in vivo" (RANGAN, 1982, 1984), con marcadas diferencias dependiendo del tiempo de la puesta en cultivo (TILTON y RUSSEL, 1983). En el caso del cultivo de óvulos en *Prunus*, los constituyentes del medio y el estado de los óvulos en el momento de la puesta en cultivo son de importancia primordial (RAMMING, 1985, 1986).

La respuesta más clara al cultivo "in vitro" ha sido la formación de callo en el tegumento. Esta respuesta ha sido distinta dependiendo de las especies y dentro de los cultivares y parece estar más asociada a la especie utilizada como planta polinizada que al polen. Mientras que en los dos cruzamientos con los dos *mirobolanes*, tanto el cruzamiento VII, intraespecífico, como el IV, interespecífico, se ha obtenido un alto porcentaje de formación de callo, en el cruzamiento I éste ha sido nulo. Igualmente ocurre en los cruzamientos IX y X de los ciruelos hexaploides, especies muy relacionadas. Por último los óvulos del híbrido 'Cachirulo' responden a la formación de callo en todos los cruzamientos, aunque se observa una mayor respuesta en los medios con hormonas. Todo ello indica que el cultivo o respuesta es independiente del cruzamiento intra o interespecífico, lo cual es lógico ya que es una respuesta del tejido materno. Esta variabilidad ha sido señalada en muchos cultivos "in vitro", bien sea de cruzamientos intra como interespecíficos (STEWART y HSU, 1978; RANGAN, 1982; RAGHAVAN, 1986; BRUUN, 1991a).

La observación en binocular del endospermo también ha mostrado claras diferencias en su desarrollo entre el híbrido 'Cachirulo' y los *mirobolanes*. La concentración de hormonas

solamente parece afectar en el cruzamiento II; sin embargo, estas diferencias no se aprecian ni en los cruzamientos de *mirobolanes* VII, IV ni en los cruzamientos IX y X. La respuesta parece más dependiente de la concentración de sacarosa, al igual que en el cruzamiento I. Tampoco los casos en los que se produce embrión se pueden asociar con las concentraciones de hormonas, al contrario de lo señalado para el melocotonero (PINTO *et al.*, 1990), sino que estos resultados muestran que no hay un efecto claro de la concentración de hormonas en el medio y de nuevo que existe una gran variabilidad entre los distintos clones.

Aunque el embrión pudo observarse al microscopio, el hecho de que no se observara después de cinco semanas en cultivo, pudo deberse al método utilizado, debido al pequeño tamaño del embrión y a la dificultad de distinguir los tejidos al binocular. Estas dificultades pueden dar lugar a la subjetividad de los resultados y muchas veces resulta difícil establecer qué tipo de tejidos corresponde a cada estructura (BRUUN, 1991a; PICKERSGILL, comunicación personal).

A pesar de que los resultados no son concluyentes, se puede decir que el cultivo "in vitro" en estas condiciones no ha ayudado a recuperar un porcentaje mayor de híbridos interespecíficos. La diferente respuesta de los cultivares al medio de cultivo indica la clara interacción del cultivar y los diferentes componentes del medio (RANGAN, 1982; RAMMING, 1985). Los resultados obtenidos indican que muchos óvulos podrían estar en mal estado, pero parece un fenómeno más asociado a los requisitos específicos en el medio de cultivo de cada clon, dados los bajos porcentajes obtenidos. Los mayores porcentajes de recuperación de embriones se han obtenido en este género cuando se trata de embriones con un tamaño superior a 1mm en el momento del cultivo (RAMMING, 1985, 1990; PINTO *et al.*, 1991; RUBIO *et al.*, 1991).

Cuando se realizó el cultivo de óvulos, sólo los cruzamientos I, II, III, IV, VII, IX y X poseían embriones formados. En este momento también se habían producido las divisiones del suspensor, órgano que parece ser el encargado de transportar los nutrientes al embrión en los primeros estados de su desarrollo (MAHESHWARI, 1966). Los resultados no indican un cambio del metabolismo ni explican que el desarrollo del endospermo esté más acusado

(BRUUN, 1991b). Por ello como se ha señalado para cruzamientos interespecíficos, no siempre es suficiente el cultivo de óvulos para superar las barreras de postfertilización (BINO *et al.*, 1988).

La velocidad de crecimiento del embrión varía de unas especies a otras (AHMAD y SLINKARD, 1991), mas aún tratándose de cruzamientos intraespecíficos e interespecíficos, en los que se ha llevado a cabo pocos estudios en cuanto al desarrollo del embrión. En general el desarrollo del embrión y del endospermo "in vitro" es menor que en "in vivo" (RANGAN, 1982; JOSHI y JOHRI, 1972).

En algunos casos se ha observado que el suspensor es necesario para el crecimiento "in vitro" (RANGAN, 1984), aunque no se ha establecido con seguridad su papel en la translocación de nutrientes hacia el embrión. Se ha observado, en todo caso, que el suspensor degenera antes en los cruzamientos interespecíficos (BRUUN, 1991b), aunque este proceso puede ser general, haciendo al embrión mas autónomo (BRUUN, 1991a), dentro de los diferentes niveles de respuesta. La placenta también puede ser un medio de aporte de nutrientes (OCHATT *et al.*, 1987), pero sólo en los casos en los que está en contacto con el medio, por lo que las diferencias que se han observado dentro de cada repetición pueden ser debidas a ello. Las modificaciones estructurales del óvulo parecen radicar principalmente en las modificaciones en el esporofito y en el tegumento, que se atrofia formando arrugas, pero no en el embrión ni en el endospermo (BRUUN, 1991a), ya que solamente se pueden diferenciar los casos en los que el endospermo crece más deprisa (BRUUN, 1991b) o más lentamente (JOSHI y JOHRI, 1972).

A excepción del cruzamiento I, en el que el día de la puesta en cultivo ya se habían detectado taninos en el tegumento, en todos los otros cruzamientos se han desarrollado taninos después de 5 semanas en cultivo, al contrario de lo observado en los cruzamientos interespecíficos en remolacha, en los que al parecer los embriones en cultivo "in vitro" germinan antes y poseen una pared más débil (BRUUN, 1991a). Solamente en el cruzamiento VII se consiguió recuperar el embrión y hacerlo germinar en medio C₂D, pero después de un período de latencia para germinar (RAMMING, 1985; RUBIO *et al.*, 1991). En el resto de

cruzamientos intraespecíficos (I, II, VII y IX), y los interespecíficos III, IV, X, en los que se observó embrión globular, los embriones se desarrollaron hasta ese estado en el campo, pero después de ello la técnica de cultivo "in vitro" no ha sido suficiente para proseguir su desarrollo. Más ejemplos de aborto en este estado se han descrito en otros cruzamientos interespecíficos (TAKAHATA y TAKEDA, 1990; ABBO y LADIZINSKY, 1991).

El medio suplementado con hormonas no ha sido suficiente para recuperar embriones en este estado globular. En melocotonero se ha indicado que no se necesitan hormonas cuando el embrión alcanza un estado de desarrollo autótrofo (RAGHAVAN, 1977b). Sin embargo, los niveles adecuados de hormonas en los medios de cultivo se encuentran todavía a un nivel empírico de estudio por lo que no se pueden definir (PICKERSGILL, 1991, PINTO *et al.*, 1990). Los niveles de hormonas recomendados en este experimento han dado resultados, aunque no muy satisfactorios, en cultivares de maduración temprana de melocotonero (PINTO *et al.*, 1991), pero el tamaño del embrión no es comparable en uno y otro caso, pues a un tamaño de 50 μ el embrión seguramente no ha alcanzado el estado autótrofo señalado por RAGHAVAN, (1977b) y todavía depende de los nutrientes aportados por el suspensor y por el endospermo. El pequeño tamaño del embrión, en el estado globular, seguramente requiere unos nutrientes más específicos que los de los medios utilizados (RAMMING, comunicación personal), aunque hayan sido útiles para el crecimiento del embrión de diversas especies de *Prunus*, (RAMMING, 1982, 1990, RAMMING y TANNER, 1983, 1987).

Se han desarrollado diversas técnicas para mejorar el rendimiento de la recuperación de embriones, como son la combinación de dos medios de cultivo, uno líquido y otro sólido, junto a la perforación de los óvulos y el cultivo tan sólo de las partes embriogénicas (MATHIAS *et al.*, 1990); esta última técnica ha tenido éxito en algunos cultivares de *Prunus*, (PINTO *et al.*, 1991) y se está ensayando en otros (EMERSHAD, comunicación personal).

En los cruzamientos V, VI y VIII, no se ha detectado el embrión, aunque en los V y VI se obtuviese un pequeño porcentaje de fecundación. Se ha observado que sin fecundación el estado de degeneración de los óvulos está más avanzado. Los núcleos observados en algunos de ellos serían los núcleos polares que no han migrado al centro del saco embrionario en el

momento de la fecundación (MASHESWARI, 1950), aunque se haya producido el crecimiento del saco embrionario. En el cruzamiento VIII se observó un menor desarrollo de los óvulos, además de presentar un porcentaje menor de óvulos formados.

La teoría del balance del número de endospermo (JOHNSTON *et al.*, 1980; HAWKES y JACKSON, 1992), podría explicar el fallo observado en los cruzamientos interespecíficos, ya que las plantas híbridas han dado los peores resultados y en uno de ellos el polinizador es híbrido. Si a cada especie se le asigna un valor constante al endospermo, en el caso de los híbridos el fallo podría encontrarse a este nivel porque el balance entre el endospermo estaría desequilibrado por su condición híbrida, causando por ello el aborto del embrión (ABBO y LADIZINSKI, 1991). La teoría de que la activación de los núcleos polares intervienen en la respuesta podría explicar también el fallo en cualquiera de los dos procesos de la doble fecundación, ya sea por el índice de activación de los núcleos polares o de la célula huevo, que dan lugar al endospermo y al embrión respectivamente (NISHIYAMA *et al.*, 1991). Estas dos teorías se han desarrollado para explicar la incompatibilidad tanto si es del tipo gametofítico como en las *Solanaceas*, como si es del tipo esporofítico como en las *Crucíferas* y *Gramíneas*.

Dado que estos cruzamientos son de la misma ploidía, diploides en el caso de los mirabolanes y 'Cachirulo' y hexaploides en el caso de los ciruelos, los cruzamientos híbridos pueden tener anomalías tanto en el aporte de la célula espermática (VI) como en la célula huevo (V y VIII).

CUAJADO FINAL EN CAMPO

4. CUAJADO FINAL EN CAMPO.

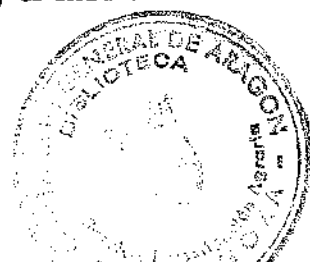
4.1. INTRODUCCION.

4.1.1. Desarrollo del fruto.

El término final del desarrollo del óvulo es la semilla, así como el del ovario es el fruto. En éste se diferencian tres partes a partir de las tres capas de la pared del ovario o pericarpio: el exocarpo exterior o piel, el mesocarpo que puede ser carnoso y el interior que es el endocarpo.

El crecimiento del fruto puede ocurrir por división celular o por aumento del volumen de las células. En la mayoría de los frutales, como el manzano, la división celular tiene lugar antes de la antesis con muy pocos ciclos de división después de la antesis, por lo que el aumento de tamaño se debe al crecimiento celular (SEDGLEY y GRIFFIN, 1989). En albaricoquero se ha observado que las diferencias en el volumen del mesocarpo de flores tempranas o tardías se deben más al número de células que al volumen (JACKSON y COOMBE, 1966). La superficie de los frutos en *Prunus*, es pubescente con estomas y la estructura del fruto es constante. Las células de la epidermis son pequeñas y tangencialmente alargadas constituyendo capas de células esféricas que forman las dos terceras partes del tejido carnoso. Hacia el hueso las células disminuyen de tamaño y se alargan radialmente (JACKSON y COOMBE, 1966), variando las capas de células desde 27 a 29 en cerezo (TUKEY y YOUNG, 1939) y de 53 a 55 en albaricoquero (ARCHIBALD y MELTON, 1987).

El fruto de los *Prunus* es una drupa caracterizada por la dureza de la capa interna del pericarpio, el endocarpo. El crecimiento del fruto en los frutales de hueso sigue un modelo de curva doble sigmoidal con tres estados de desarrollo, I, II y III, al igual que en olivo y pecanero, dos períodos de crecimiento rápido separados por un período de desarrollo lento (TUKEY, 1933; HARROLD, 1935; LILIEN-KIPNIS y LAEEVEE, 1971; JACKSON y COOMBE, 1966), en el que se produce la celularización del endospermo y el endurecimiento del endocarpo para formar el hueso (TUKEY, 1936; HESSE, 1975).



4.1.2. Caída de frutos.

En las plantas angiospermas pueden tener lugar varios procesos prezigóticos que reduzcan el cuajado, actuando en distintos puntos del proceso de la polinización, desde la interacción polen-pistilo (KNOX, 1984), siguiendo con la autoincompatibilidad (LEWIS, 1979), y los efectos de la competición gametofítica (MULCAHY y MULCAHY, 1987), hasta una selección sexual que se refleja en diferentes estrategias reproductivas como la capacidad del polen para acceder a los gametos femeninos y la capacidad de proporcionar recursos por parte de los tejidos maternos a la célula huevo o al embrión (UDOVIC, 1981). Algunos procesos postzigóticos también pueden reducir el cuajado, y entre ellos se encuentran la selección durante el desarrollo del embrión (WEINS, *et al.*, 1987); la selección por parte de la planta madre (STEPHENSON y BERTIN, 1983; STEPHENSON y WINSOR, 1986), los factores nutricionales disponibles (LLOYD, 1980; STEPHENSON, 1981), la incompatibilidad en el ovario (BAWA y WEBB, 1984), y otros muchos como la posición de la flor en el árbol (WILLSON y BURLEY, 1983). En general, la selección que se produce desde la semilla hasta la planta adulta ha sido motivo de muchos estudios, pero las causas e implicaciones de la mortalidad entre la fertilización y la semilla madura no han recibido demasiada atención hasta época muy reciente (LLOYD, 1980; STEPHENSON y BERTIN, 1983; BAWA y WEBB, 1984).

El número inicial de flores en la antesis es muy superior al número de frutos que alcanzan la maduración. DARWIN (1877) ya señaló el significado de la excesiva producción de flores (citado por BAWA y WEBB, 1984), hecho muy relevante en los árboles frutales, dado los efectos que puede tener en el cuajado final (JANICK y MOORE, 1975). El cuajado inicial en los cultivos leñosos es bastante alto, normalmente de 50 a 100% de las flores en la antesis, hasta un cuajado final que varía de 0,01% en algunos frutos tropicales en comparación con un porcentaje cercano al 100% en algunos frutos secos (SEDGLEY y GRIFFIN, 1989; LLOYD, 1980). Los estudios de cuajado en los árboles frutales y los factores que influyen en él han sido constantes a lo largo de los años, dada la importancia comercial que tiene el volumen de la cosecha final (DORSEY, 1919a; BRADBURY, 1929; HARROLD, 1935; EATON y JAMONT, 1964; HERRERO, 1992a).

Las condiciones climáticas durante la floración influyen notablemente en la germinación del polen y el crecimiento de tubos polínicos (DORSEY, 1919b; BINI y BELLINI, 1971; THOMPSON y LIU, 1973; SOCIAS i COMPANY *et al.*, 1976) al igual que en el período de receptividad del estigma (DORSEY, 1919b; THOMPSON y LIU, 1973; MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982). También influyen en el desarrollo invernal de las yemas (RICHARDSON *et al.*, 1975). Las condiciones de cultivo pueden dar lugar a flores de mayor o menor calidad, condicionando las posibilidades de ser fecundadas (WILLIAMS, 1965), y de producir frutos igualmente de mayor o menor calidad (DORSEY, 1919a; WILLSON y BARLEY, 1983; SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1993).

Así WILLIAMS (1966) introdujo el concepto de "período efectivo de polinización" (P.P.E.) como una función de la longevidad del óvulo y la tasa de crecimiento del tubo polínico, es decir, la longevidad del óvulo menos el tiempo transcurrido entre la polinización y la fecundación. Una diferencia intervarietal considerable en el período efectivo de polinización ha sido señalada para perales y manzanos, que igualmente varía de un año a otro, siendo el mayor determinante del valor del cuajado final (WILSON y WILLIAMS, 1970).

Las condiciones climáticas tal como temperatura, lluvia y viento pueden afectar directa o indirectamente al cuajado final de una especie (DORSEY, 1919b), tal es el caso de muchos árboles frutales que dependen de los insectos para la transferencia del polen (KESTER y GRIGGS, 1959; FREE, 1970), lo que es de vital importancia en las especies autoincompatibles ya que la disponibilidad de polen es uno de los principales factores que afectan a su polinización (WILLIAMS, 1970). En especies como el almendro, con una mayoría de variedades autoincompatibles, parece ser que la autocompatibilidad del polen y la potencialidad para una autopolinización son caracteres independientes (WEINBAUN *et al.*, 1989), ya que dependen de la morfología de la flor que permita la autogamia natural.

También la fertilidad de la planta madre es decisiva para determinar los niveles de cuajado y viene determinada por el número total de óvulos presentes (WILSON y WILLIAMS, 1970). La posición de la yema floral influye en el estado de desarrollo del saco embrionario en manzano (HARTMAN y HOWLETT, 1954) y por otro lado el estado de desarrollo del saco

embrionario en el momento de la antesis determina el número de óvulos que pueden ser fecundados. La relación del desarrollo del saco embrionario con el cuajado ha sido estudiado en varias especies frutales, como cerezo (EATON, 1959), albaricoquero (EATON y JAMONT, 1964), ciruelo (DORSEY, 1919b), almendro (PIMIENTA y POLITO, 1983) y olivo (RALLO *et al.* 1981).

Si bien se considera que uno de los dos óvulos de *Prunus* degenera, hay excepciones, y no sólo en el caso de la producción de pepitas dobles en almendro (SOCIAS i COMPANY y FELIPE, 1993), pero generalmente la selección del óvulo no funcional tiene lugar muy pronto y se produce el depósito de callosa en el extremo de la calaza (PIMIENTA y POLITO, 1982; STÖSSER y ANVARI, 1982).

En los frutales, al igual que en otras muchas especies leñosas, se produce una pérdida de flores y frutos prematura (STEPHENSON, 1981). La abscisión se divide en tres picos de caída para varias especies de *Prunus*. La primera caída se establece a las dos semanas de la antesis como consecuencia de la esterilidad femenina, causada por flores defectuosas con óvulos no funcionales debido a alteraciones en el saco embrionario (EATON y JAMONT, 1964; PIMIENTA y POLITO, 1982; RALLO *et al.*, 1981). El segundo pico de caída es el más importante y ocurre a los dos meses de la antesis, debido a frutos fecundados (SEDGLEY y GRIFFIN, 1989) o según otros autores a una falta de fecundación e insuficiente polinización (HARROLD, 1935; KESTER y GRIGGS, 1959). La tercera caída es la de precosecha debido a frutos que han aumentado de tamaño pero que están inmaduros (KESTER y GRIGGS, 1959), llamada también caída de Junio, probablemente a causa del aborto del embrión (HARROLD, 1935). En algunos casos en los que ha sido estudiado en detalle, los frutos que van a caer tienen una tasa de crecimiento reducida en comparación con los que continúan creciendo (WEINBAUM y SIMONS, 1974; DYBING *et al.*, 1986), aunque no siempre las diferencias anatómicas pueden explicar el aborto (WEINBAUM y SIMONS, 1974). El aborto del embrión, sin embargo, no necesariamente conduce a la pérdida del fruto, ya que diferentes cultivares de maduración temprana de cerezo muestran aborto a los dos meses de la antesis, sin que ello repercuta en su cosecha final (TUKEY, 1933). También esta tercera caída puede ser de frutos desarrollados defectuosamente debido a la limitación de recursos (STEPHENSON, 1981;

RALLO y FERNANDEZ-ESCOBAR, 1985).

La caída de frutos ocurre como resultado de la separación celular en la zona de abscisión, que puede ser localizada en la base del fruto, en la del pedicelo o en la del pedúnculo. Estas zonas de abscisión varían de unos frutos a otros; en el guindo la abscisión puede ocurrir en las tres zonas y solamente en las dos últimas en el cerezo (SEDGLEY y GRIFFIN, 1989); en almendro esta capa de abscisión se presenta entre el extremo del pedúnculo y el fruto, con lo que el pedúnculo persiste sobre el árbol (KESTER y ASAY, 1975).

4.1.3. Identificación de los híbridos interespecíficos.

Antes de la utilización de los híbridos interespecíficos se deben identificar para evitar confusiones, ya que las semillas procedentes de cruzamientos interespecíficos pueden dar lugar a plantas que no son los híbridos esperados. Los híbridos pueden ser identificados por su morfología intermedia o por la presencia de caracteres marcadores procedentes de ambos padres. Los marcadores moleculares han resultado muy útiles para ello, aunque en general consisten en técnicas que requieren una sofisticación mayor que la simple descripción morfológica. En el género *Prunus* los más utilizados han sido los marcadores isoenzimáticos para la identificación de híbridos F_1 de almendro x melocotonero y ciruelo x albaricoquero (BYRNE y LITTLETON, 1988, 1989; CHAPARRO *et al.*, 1987; FRIEND, 1989; MOWREY *et al.*, 1989). Los marcadores moleculares han servido también para el estudio de la filogenia de este género (KANEKO *et al.*, 1986; MOWREY y WERNER, 1990). Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) de genes ribosomales han sido utilizados también para la relación filogenética de tres especies del subgénero *Prunophora* (REYNDERS y SALETTES, 1990) y pueden ser aplicables para la identificación de los híbridos interespecíficos. Otras técnicas moleculares se están desarrollando para la identificación de híbridos, como es la reacción en cadena de la polimerasa PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990).

4.2. MATERIAL Y METODOS.

4.2.1. Polinizaciones en campo.

4.2.2.1. Cruzamientos intraespecíficos:

- I. 'Moniquí' (*P. armeniaca*) X 'Canino' (*P. armeniaca*)
- II. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X 'Balones'
(*P. amygdalus x P. persica*)
- VII. 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*) X 'Mirobolán B'
(*P. cerasifera*)
- IX. 'Puebla de Soto 101' (*P. insititia*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

4.2.2.2. Cruzamientos interespecíficos.

- III. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X (*P. tomentosa*)
- IV. 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*) X 'Moniquí' (*P. armeniaca*)
- V. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X 'Mirobolán AD 605'
(*P. cerasifera*)
- VI. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X 'Myrandier 617'
(*P. amygdalus x P. cerasifera*)
- VIII. 'GF 31' (*P. cerasifera x P. salicina*) X *P. tomentosa*
- X. 'Reina Claudia' (*P. domestica*) X 'Montizo' (*P. insititia*)

FOTO 4. 0.

Los cruzamientos dirigidos en campo se realizaron polinizando manualmente las flores. Las ramas fueron emasculadas en campo en el estado D (BAGGIOLINI, 1984), (Foto 4.0.a), para evitar su autopolinización, así como un posterior acercamiento de insectos polinizadores que pudieran aportar cualquier polen ajeno al ensayo. Trascurridos 2 días se polinizaron manualmente mediante el uso de un pequeño pincel impregnado de polen con el que se roza el estigma (Foto 4.0.c). Una parte de las flores emasculadas se dejaron sin polinizar en todos los cruzamientos en el año 1992 para observar la caída en flores vírgenes (Foto 4.0.b).

FOTO 4.0. METODOLOGIA DE LA HIBRIDACION

FOTO 4.0.a. Emasculación de las flores de 'Mirobolán B' en estado D de Bagliolini con unas pinzas.

FOTO 4.0.b. Flores de 'Cachirulo' emasculadas en estado D y dejadas dos días hasta alcanzar el estado de madurez en antesis.

FOTO 4.0.c. Polinización por medio de un pincel de las flores emasculadas de 'Cachirulo'.



Previamente se obtuvo el polen de todas las variedades que se utilizaron como polinizadoras. La extracción del polen se realizó según el método descrito en el apartado 1.2.1.1.

CUADRO 4.2.1. Día de la antesis en los diferentes años en que se han realizado los cruzamientos.

Cruzamiento	1990	1991	1992
I	28/2	13/3	12/3
II	1/3	14/3	13/3
III	1/3	14/3	13/3
IV	2/3	16/3	14/3
V	1/3	14/3	13/3
VI	1/3	14/3	13/3
VII	4/3	13/3	17/3
VIII	4/3	15/3	12/3
IX	15/3	23/3	23/3
X	23/3	25/3	25/3

4.2.2. Determinación de los niveles de caída y cuajado.

En los árboles en los que se realizaron las polinizaciones, se realizó un conteo semanal del número de flores y frutos por rama. En el año 1990, debido a las bajas temperaturas, la mayoría de los flores se helaron. En el año 1991 este conteo se realizó hasta el día en que se llevó a cabo la puesta en cultivo de los óvulos (apartado 3.2.1.2), día en que se recogieron una media de 75 óvulos por cruzamiento para su puesta en cultivo. Se hizo el seguimiento del resto de frutos en el árbol aunque no se expresaron como índice de cuajado final debido a la eliminación de una parte de los frutos. En el año 1992 se realizó el conteo tanto de flores polinizadas como no polinizadas, desde la floración hasta la caída o recolección.

Los ensayos se realizaron los dos años en los mismos árboles, excepto en los cruzamientos IV y VII de los dos mirabolanes que en el año 1991 se realizaron en árboles más

viejos y no sometidos a poda. La fructificación se midió aproximadamente 13 semanas después de la polinización como representación del cuajado final en campo.

Los conteos se realizaron con la ayuda de un contador de mano y se repitieron dos veces en cada rama, asegurándose que la diferencia entre los dos conteos no fuera superior al 10% (WILLIAMS, 1970). Cada semana se calculó el índice de cuajado como el porcentaje del número de flores iniciales.

El análisis estadístico de los datos permitió comparar el porcentaje de cuajado inicial en los dos años 1991 y 1992 a la 5ª semana, día en que se realizó el cultivo "in vitro" de los óvulos. Se realizó un test de igualdad de los dos porcentajes mediante una *t* de Student a nivel de significación de $p < 0.05$, para observar las diferencias significativas de un año a otro.

Así mismo se comparó la caída hasta la quinta semana (el día de cultivo de óvulos) en los años 1991 y 1992; y la caída hasta la fructificación en el año 1992 de las flores polinizadas y no polinizadas.

4.3. RESULTADOS.

4.3.1. Cuajado inicial.

En la tabla 4.3.1. se presentan los porcentajes medios de cuajado en los años 1991 y 1992, obtenidos a la 5ª semana, en el momento que se realizó el cultivo de óvulos "in vitro" (apartado 3.2.1.2.). En el año 1990 no se expresan los porcentajes de cuajado ya que todos ellos se vieron afectados por una helada. En el apéndice 1 quedan reflejadas las temperaturas del mes previo a la floración y de los dos siguientes. En todos los clones la floración en 1990 fue más temprana que en los dos años posteriores, 1991 y 1992, debido a las altas temperaturas del mes de Febrero y el posterior descenso en el mes de Marzo. La temperatura media en el mes de Febrero fue de 11,6 siendo de 10,96 y 12,4 en los meses de Marzo y Abril. En los días siguientes a las polinizaciones las temperaturas mínimas fueron inferiores a cero durante varios días.

CUADRO 4.3.1. Cuajado inicial a la 5ª semana en los dos años consecutivos.

Cruzamiento	Año 1991		Año 1992	
	Nº Inicial de flores	Cuajado inicial %	Nº Inicial de flores	Cuajado inicial %
I	662	37.46 ^a	1070	51.00 ^b
II	873	27.38 ^a	1480	18.00 ^b
III	1025	21.76 ^a	830	27.60 ^b
IV	1005	7.96 ^a	2154	18.10 ^b
V	1518	14.56 ^a	975	17.80 ^a
VI	603	14.10 ^a	580	27.20 ^b
VII	758	4.35 ^a	1531	0.00 ^b
VIII	971	1.24 ^a	899	1.78 ^a
IX	1125	22.13 ^a	1128	17.10 ^b
X	553	24.77 ^a	1070	47.80 ^b

En ninguno de los cruzamientos en campo se obtuvo un cuajado superior al 50 % a la 5ª semana de la polinización. Solamente en dos de los cruzamientos, el I y X se obtuvo un cuajado cercano al 50%. En la mayoría de los cruzamientos se observó una diferencia significativa entre los cuajados obtenidos a la 5ª semana; los únicos que no mostraron diferencias fueron los cruzamientos V y VIII (Fig. 4.3.1.4.a y 4.3.1.2.a).

Igualmente se observó en la mayoría de los cruzamientos un cuajado superior en el año 1992 que en el año 1991, con la excepción del cruzamiento intraespecífico II (Fig. 4.3.1.3.a; Foto 4.1.c) y el cruzamiento intraespecífico IX (Fig. 4.3.1.5.a). En el cruzamiento intraespecífico VII el cuajado obtenido el año 1992 fue nulo (Fig. 4.3.1.2.a).

La dinámica de la caída hasta la 5ª semana es diferente en los diferentes cruzamientos. Así en los cruzamientos del híbrido 'Cachirulo', se observa en ambos años un pico de caída a la 3ª semana de la polinización (Fig. 4.3.1.3.a.b y Fig. 4.3.1.3.a.b). Este pico no se observa en el cruzamiento I de los dos albaricoqueros, en el que parece que la caída es más constante observándose un pico de caída mas débil a la primera semana después de la polinización (Fig.4.3.1.1.a). En los cruzamientos de los mirbolanes se observa una caída brusca a la segunda semana de la polinización, tanto en el cruzamiento intraespecífico VII (Fig.4.3.1.1.b), como en los interespecíficos IV y VIII (Fig. 4.3.1.2.a.b; Foto 4.1.b), si bien ésta es más brusca en los cruzamientos VII y VIII, en los que el número de frutos es prácticamente nulo a la 5ª semana de la polinización (Foto 4.1.a). En los cruzamientos IX y X (Fig. 4.3.1.5.a.b), también se observó una caída a la segunda semana, aunque es más suave que en el grupo de los mirbolanes; esta caída es más pronunciada en el cruzamiento intraespecífico de los dos pollizos (4.1.d.).

FOTO 4. 1.

FOTO 4.1. CUAJADO INICIAL

FOTO 4.1.a. Frutos de 'Mirobolán 605' x 'Mirobolán B' a la 3ª semana de la polinización cuando se han caído varios frutos y el cuajado ha descendido considerablemente.

FOTO 4.1.b. Frutos de 'Mirobolán B' x 'Moniquí' a la 3ª semana de la polinización con frutos que siguen su desarrollo normal.

FOTO 4.1.c. Frutos híbridos de 'Cachirulo' x 'Balones' a la 5ª semana de la polinización.

FOTO 4.1.d. Frutos híbridos de 'Puebla de Soto' x 'Montizo' a la 3ª semana de la polinización.



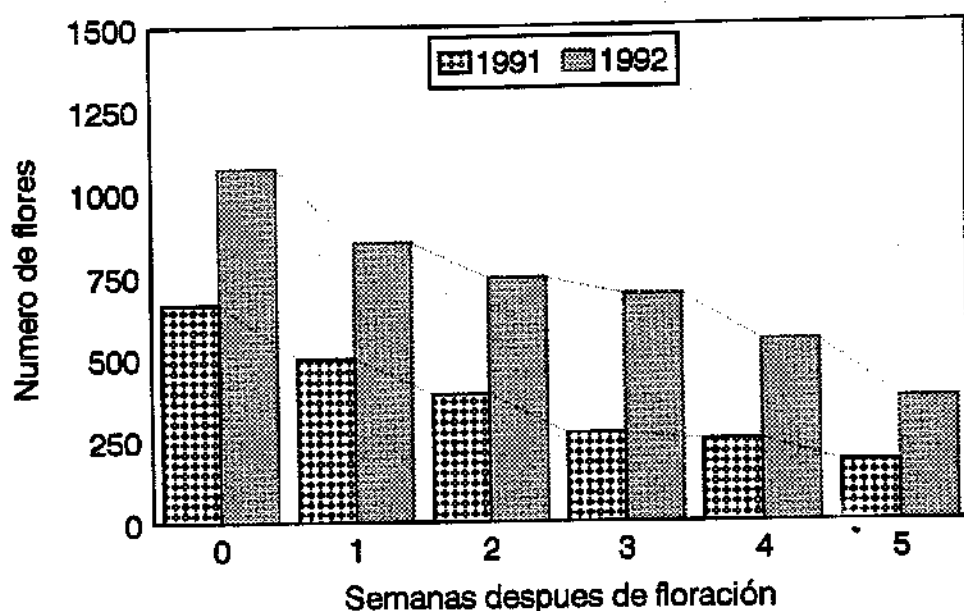


Figura 4.3.1.1.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino

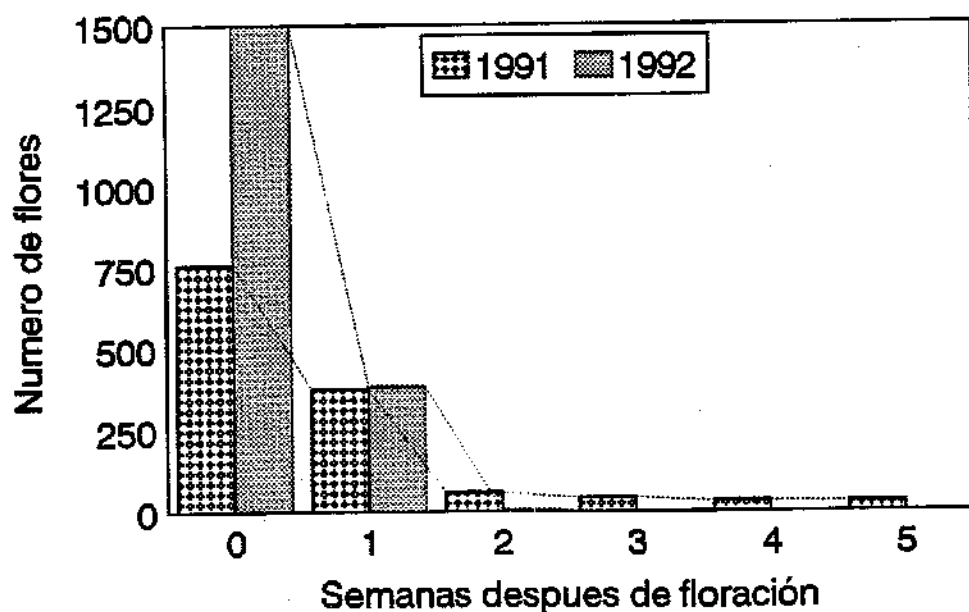


Figura 4.3.1.1.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B

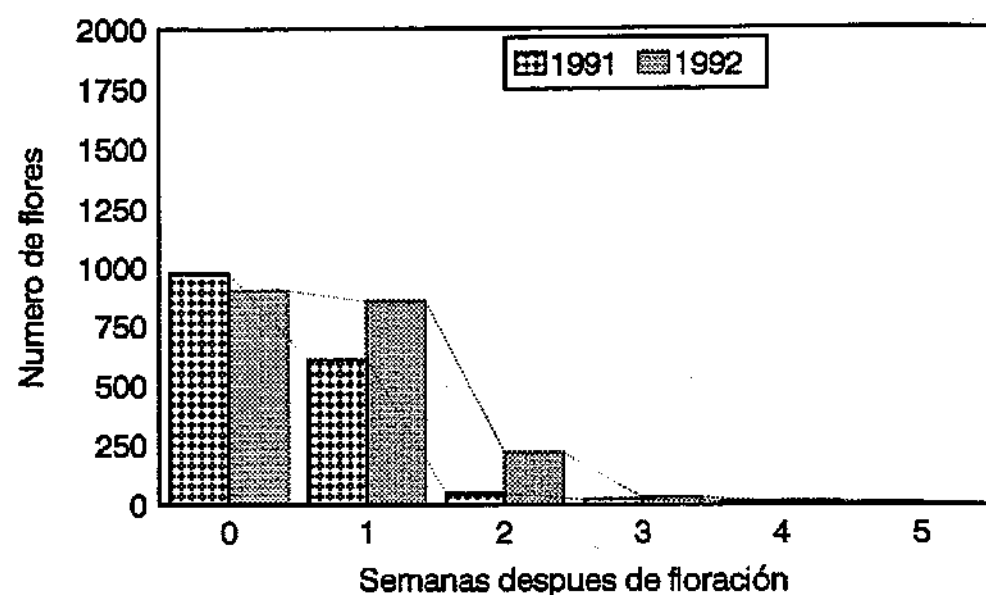


Figura 4.3.1.2.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x *P. tomentosa*

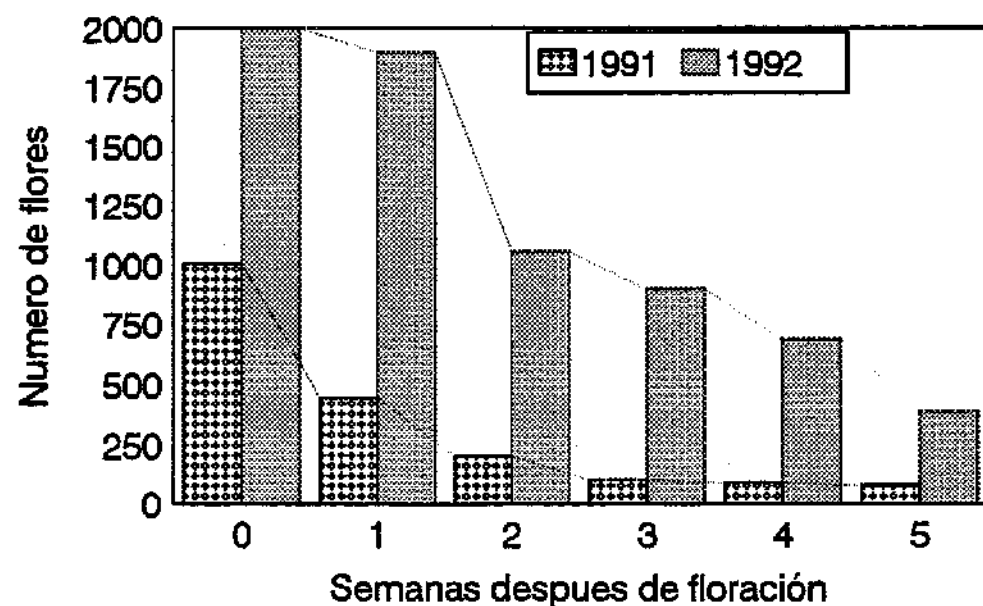


Figura 4.3.1.2.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.

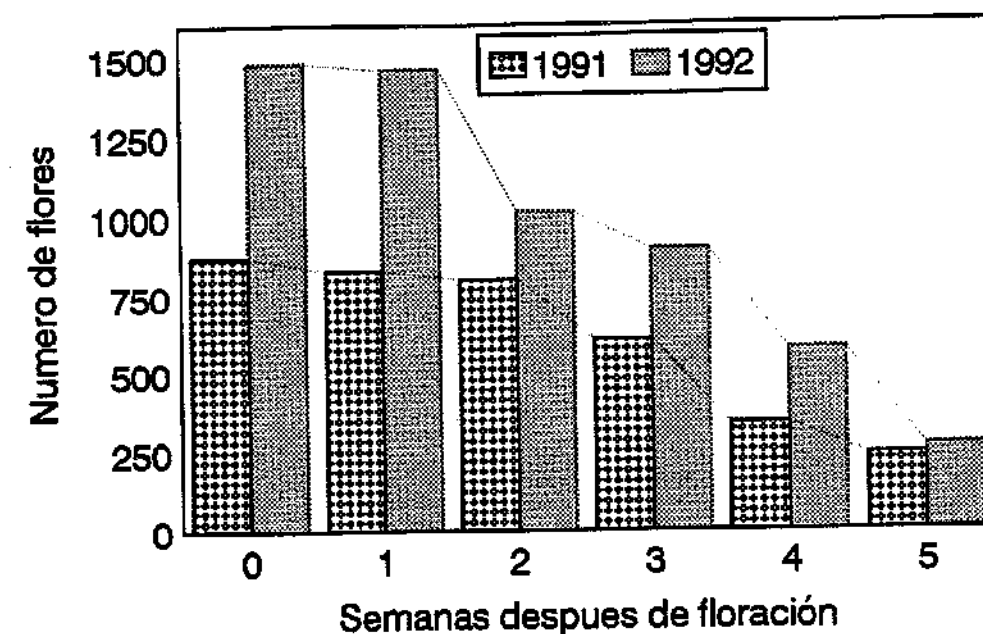


Figura 4.3.1.3.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.

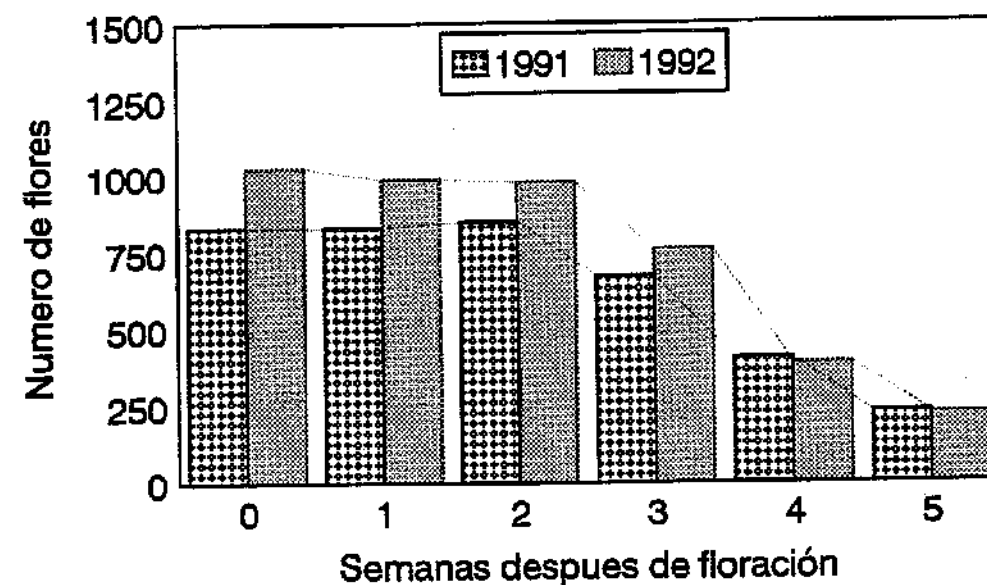


Figura 4.3.1.3.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x *P. tomentosa*



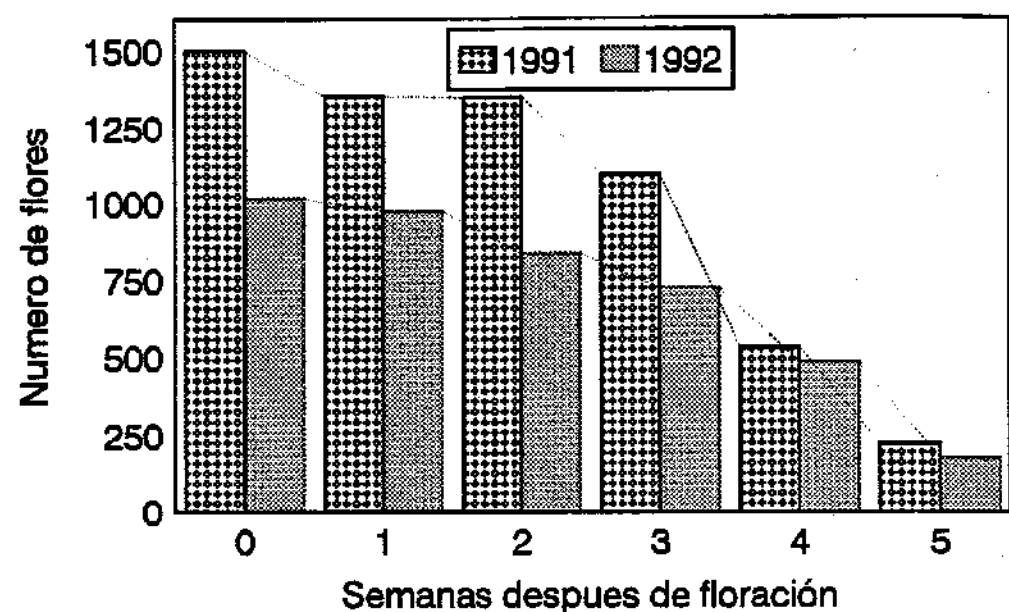


Figura 4.3.1.4.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605.

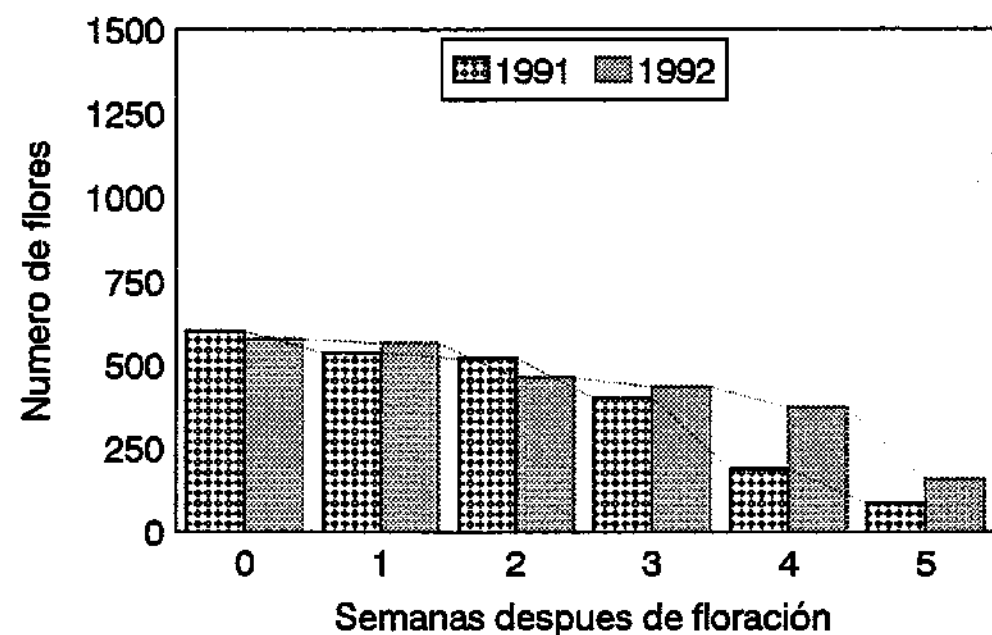


Figura 4.3.1.4.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617

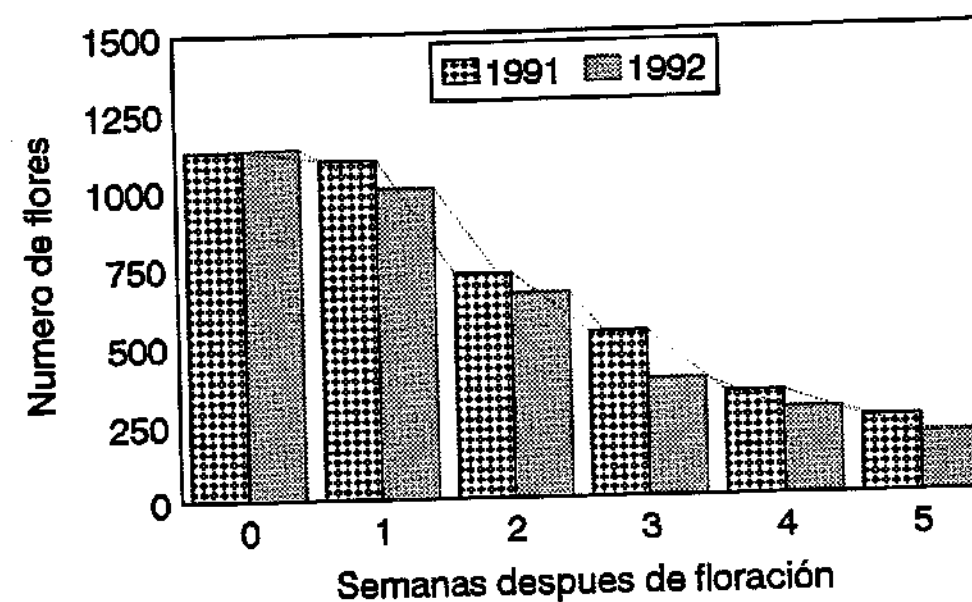


Figura 4.3.1.5.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo

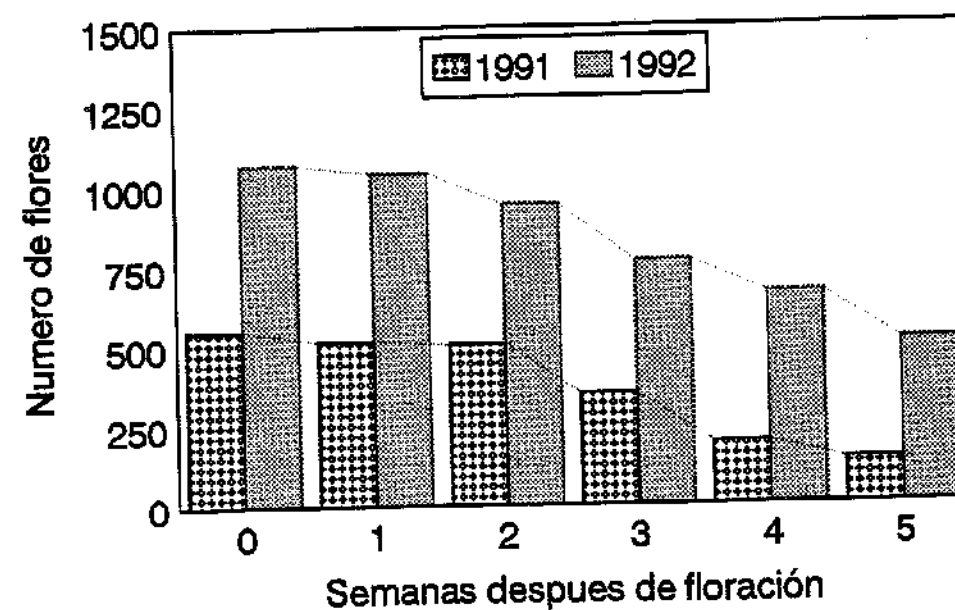


Figura 4.3.1.5.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo

4.3.2. Cuajado final y caída de flores polinizadas y no polinizadas.

En el año 1992 el seguimiento del cuajado se hizo hasta la maduración del fruto y se observó la caída tanto en flores polinizadas como en no polinizadas. El cuadro 4.3.2. muestra el cuajado final en este año, calculado a las 13 semanas después de la polinización.

CUADRO 4.3.2. Cuajado final de flores vírgenes (V) y polinizadas (X) a las 13 semanas de la polinización en el año 1992.

Cruzamiento	NºInicial de flores (V)	NºInicial de flores (X)	Cuajado final % (V)	Cuajado final % (X)
I	615	1070	0.00	7.00
II	585	1480	0.00	9.45
III	242	850	0.00	0.62
IV	958	2154	0.00	10.68
V	548	975	0.00	0.00
VI	235	580	0.00	0.00
VII	338	1531	0.00	0.00
VIII	12	899	0.00	0.00
IX	354	1128	0.00	0.88
X	421	1070	0.00	2.15

Como puede observarse en el cuadro 4.3.2. el mayor cuajado se obtuvo en el cruzamiento interespecífico IV (Fig. 4.3.2.2.a; Foto 4.2.b.c), mayor que en dos de los cruzamientos intraespecíficos (I, VII; Fig. 4.3.2.1.a.b). De los cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo' sólo dos produjeron un cuajado: el cruzamiento intraespecífico II (Foto 4.2.e), seguido por el cruzamiento interespecífico III (Fig. 4.3.2.3.a.b; Foto 4.2.d). En este último el porcentaje fue similar al cruzamiento intraespecífico IX (Fig. 4.3.2.5.a), en el cual es inferior al 1%, que a su vez es menor que en el cruzamiento interespecífico X que es del orden del 2% (Fig. 4.3.2.5.b).

FOTO 4. 2.

FOTO 4.2. CUAJADO FINAL EN CAMPO

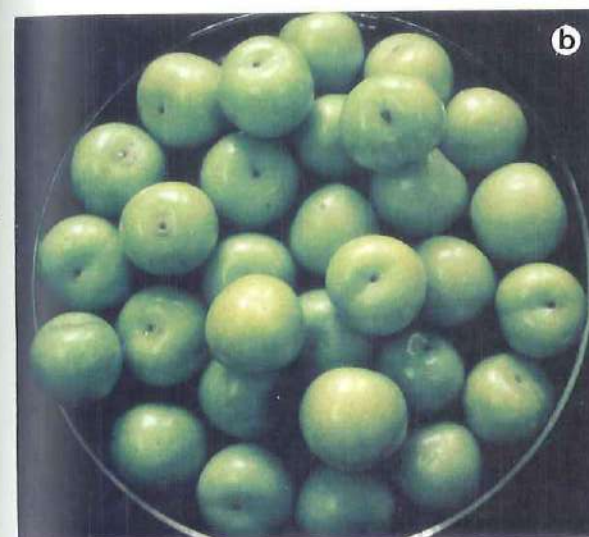
FOTO 4.2.a. Frutos híbridos del 'Cachirulo' x 'Balones' a la 5ª semana de la polinización cuando se llevó a cabo el cultivo "in vitro".

FOTO 4.2.b. Frutos híbridos de 'Mirobolán B' x 'Moniquí' a las 12 semanas de la polinización, todavía sin madurar.

FOTO 4.2.c. Frutos híbridos de 'Mirobolán B' x 'Moniquí' a las 14 semanas de la polinización en estado maduro.

FOTO 4.2.d. Frutos híbridos de 'Cachirulo' x *P.tomentosa* a las 13 semanas de la polinización.

FOTO 4.2.e. Frutos híbridos de 'Cachirulo' x 'Balones' a las 13 semanas de la polinización.



Analizadas las curvas de caída tanto en las flores polinizadas como en las no polinizadas se puede observar que a la 5ª semana hay una caída considerable tanto en las flores no polinizadas como en las polinizadas. En las flores no polinizadas esta caída es más constante, sin apreciarse una caída pronunciada anterior a la 5ª semana, con la excepción de los cruzamientos VII (Fig.4.3.2.1.b) y VIII (Fig.4.3.2.2.b). En las flores polinizadas se observan caídas más pronunciadas a la 2ª o 3ª semana después de la polinización, dependiendo de los cruzamientos.

Estos picos de caída son claramente observables en el cruzamiento intraespecífico I (Fig. 4.3.2.1.a.) y en los cruzamientos del híbrido 'Cachirulo' II, III, V y VI (Fig. 4.3.2.3.a.b y 4.3.2.4.a.b). En los cruzamientos VII y VIII esta caída drástica se produce a la 2ª semana, (Fig. 4.3.2.1.b y 4.3.2.2.b.), teniendo lugar en ambos tipos de flores, polinizadas y no polinizadas; en estas últimas prácticamente la presencia de frutos en el árbol es nula. No así en el cruzamiento interespecífico IV (Fig. 4.3.2.2.a), en el que se observan dos picos de caída muy marcados en la 2ª y 5ª semana tanto en las no polinizadas como en las polinizadas. En los cruzamientos IX y X (Fig. 4.3.2.5.a.b), se pueden apreciar también dos picos fuertes a la 3ª y 7ª semana, también en ambos tipos de flores, aunque es más notable en las flores polinizadas.

En todos los cruzamientos en los que se ha obtenido cuajado, a la 13ª semana de la polinización éste ya se había estabilizado, pudiéndose considerar constante a partir de la 5ª semana en los cruzamientos I (Fig. 4.3.2.1.a.), II, III (Fig. 4.3.2.3.a.b) y IV (Fig. 4.3.2.2.a.) y desde la 7ª semana en los cruzamientos IX y X (Fig. 4.3.2.5.a.b). En los cruzamientos V, VI en los que el cuajado final fue cero, se observó que a partir de la 7ª semana eran muy pocos los frutos en el árbol (Fig. 4.3.2.4.a.b). En el cruzamiento VII (Fig. 4.3.2.1.b), la reducción es drástica a la 2ª semana de la polinización al igual que en el VIII (Fig. 4.3.2.2.b), en el que esta caída se produce a la 2ª semana.

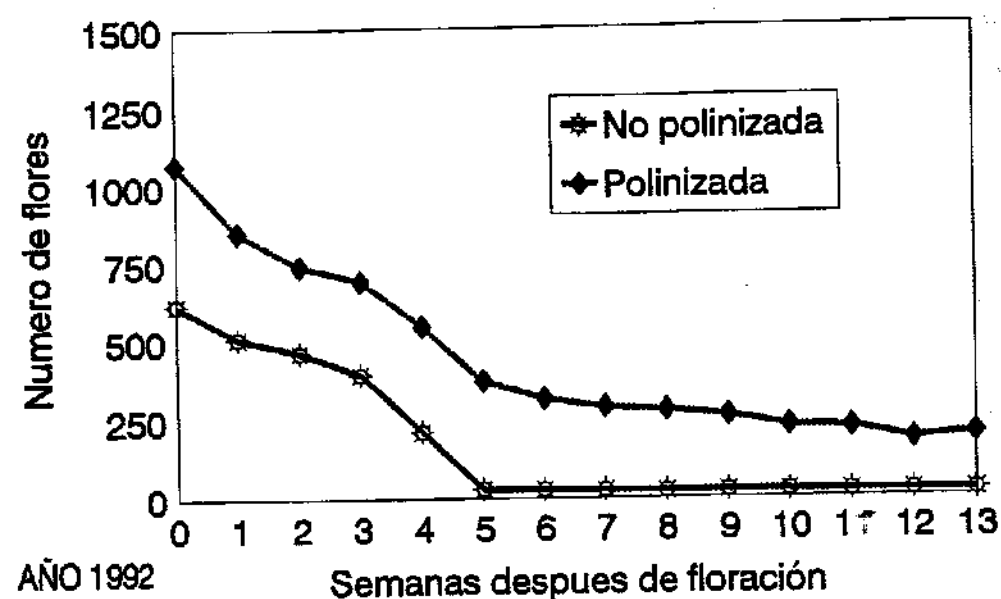


Figura 4.3.2.1.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino

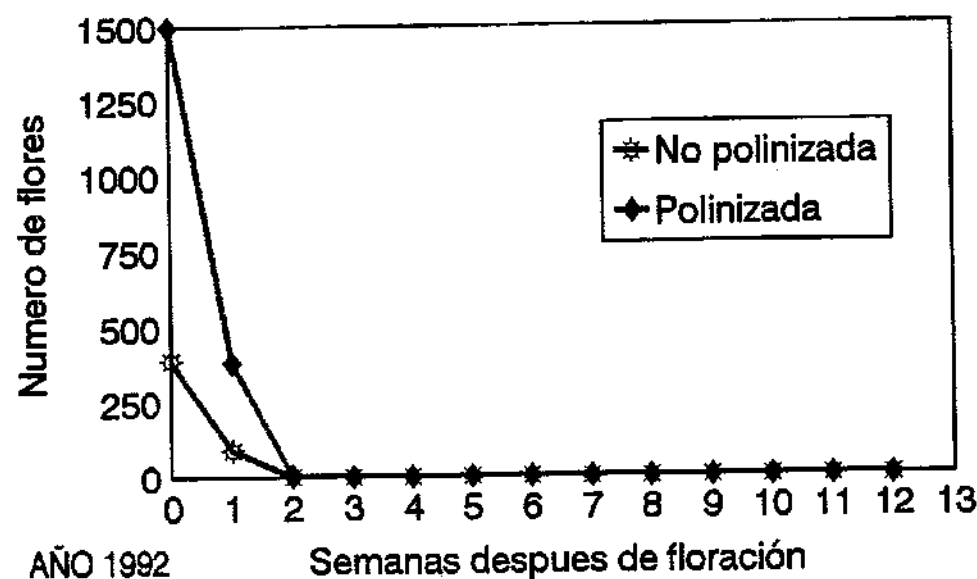


Figura 4.3.2.1.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B

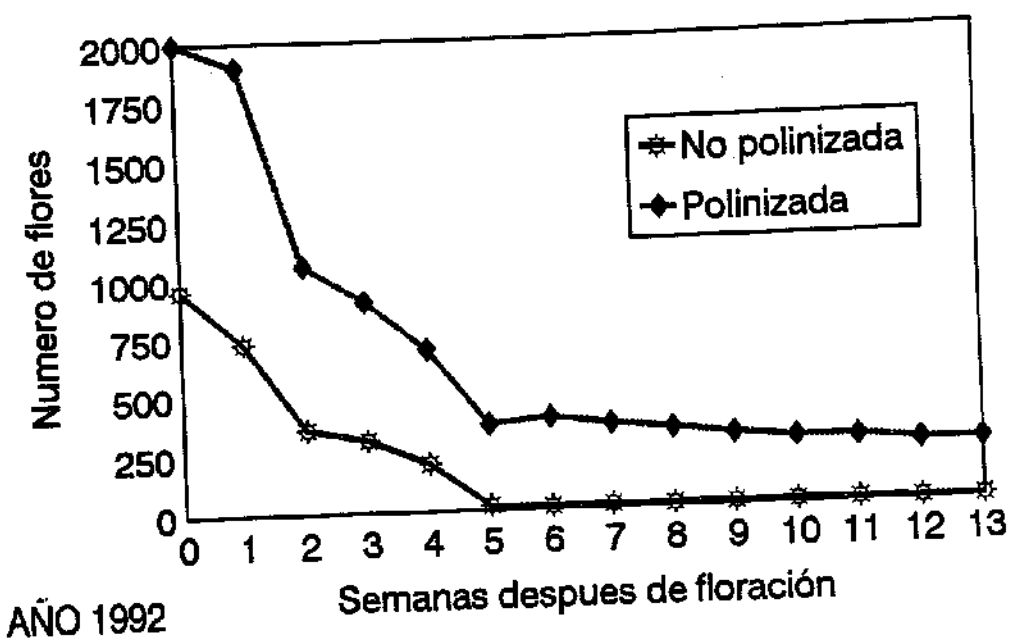


Figura 4.3.2.2.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.

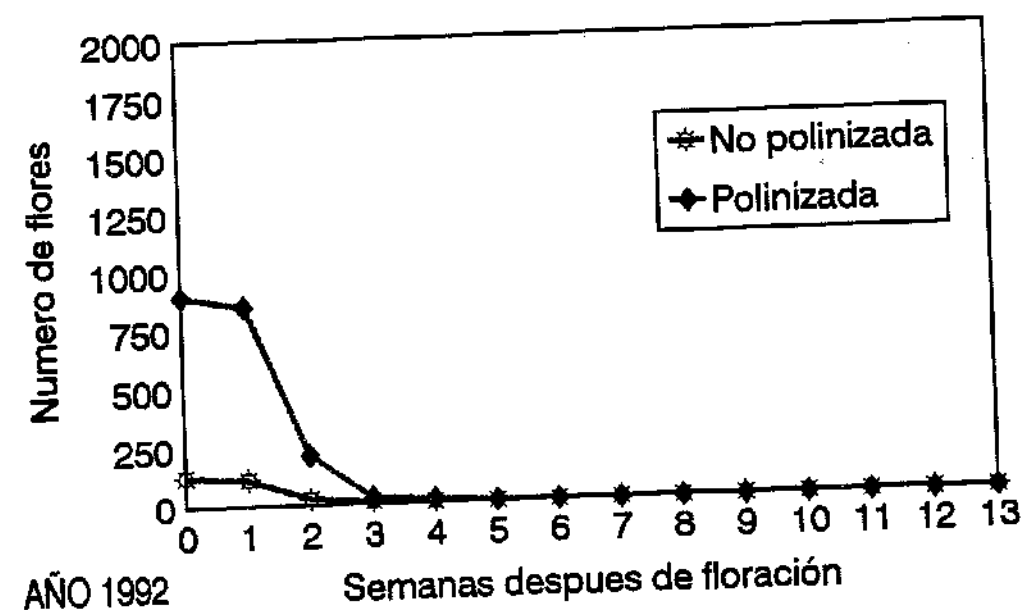


Figura 4.3.2.2.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x *P. tomentosa*

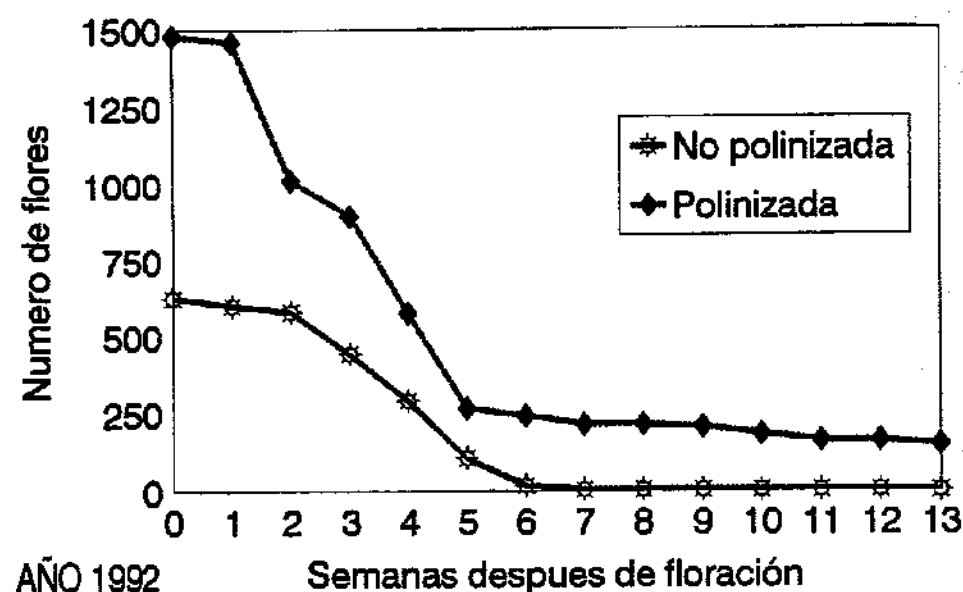


Figura 4.3.2.3.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.

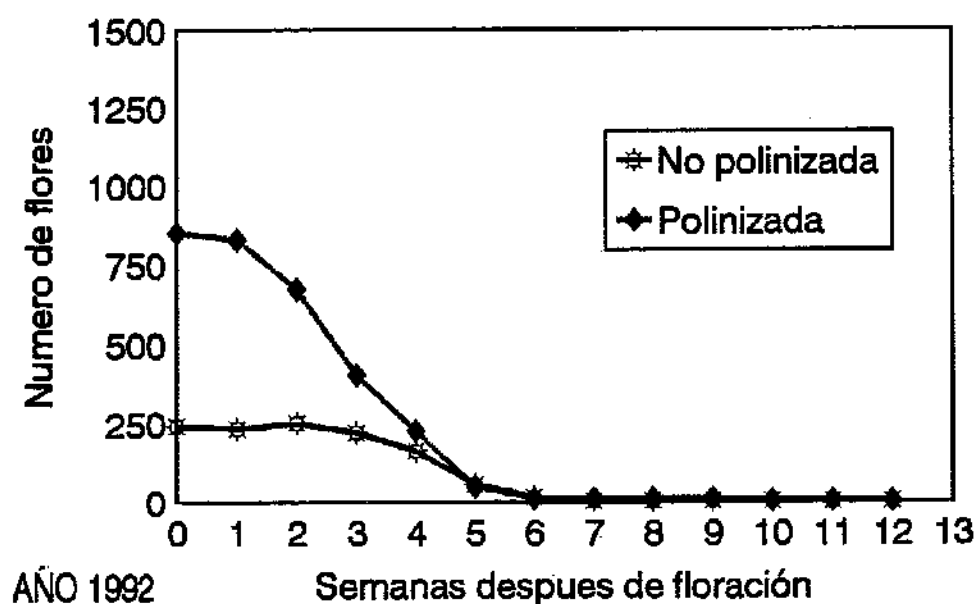


Figura 4.3.2.3.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x *P.tomentosa*

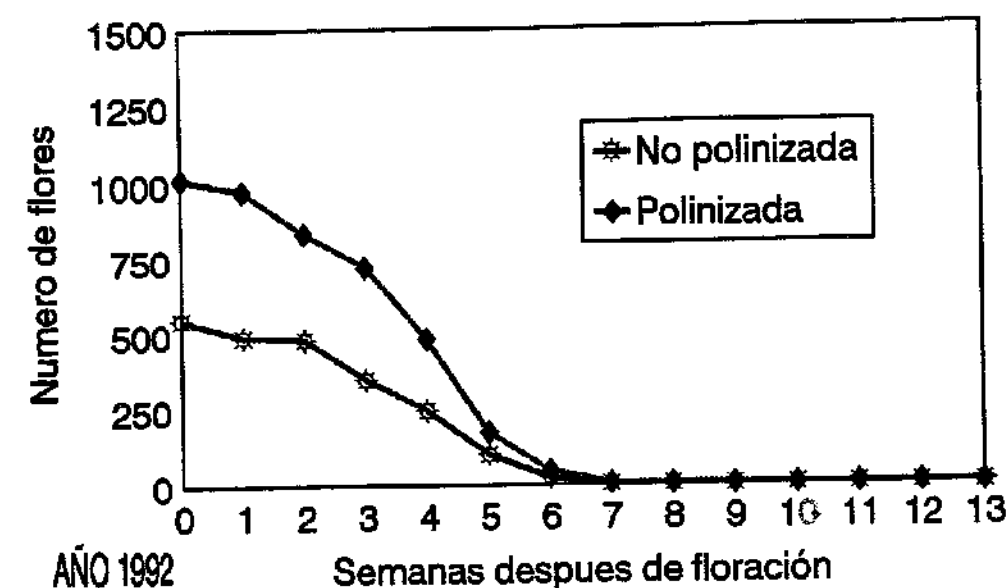


Figura 4.3.2.4.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605

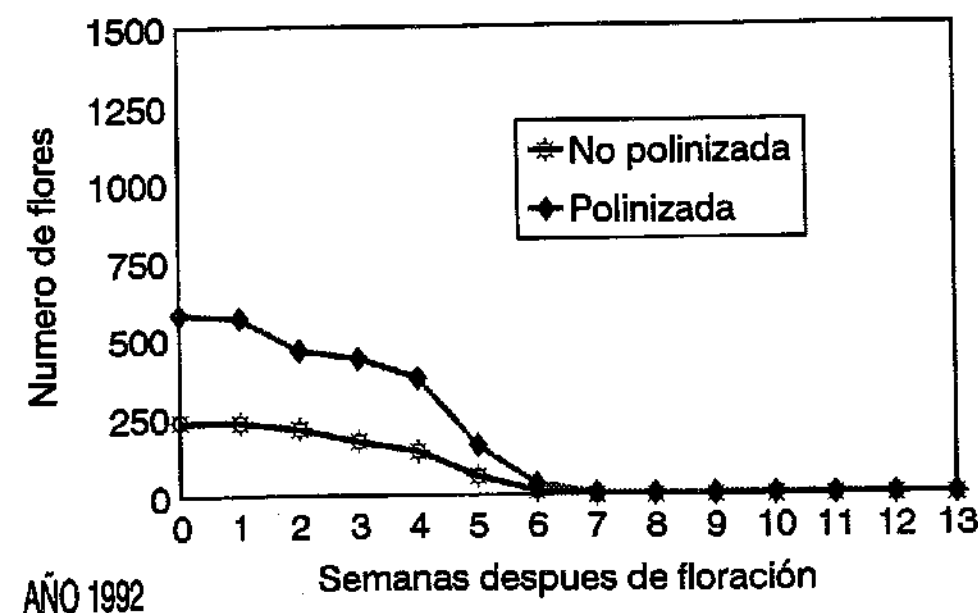


Figura 4.3.2.4.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617

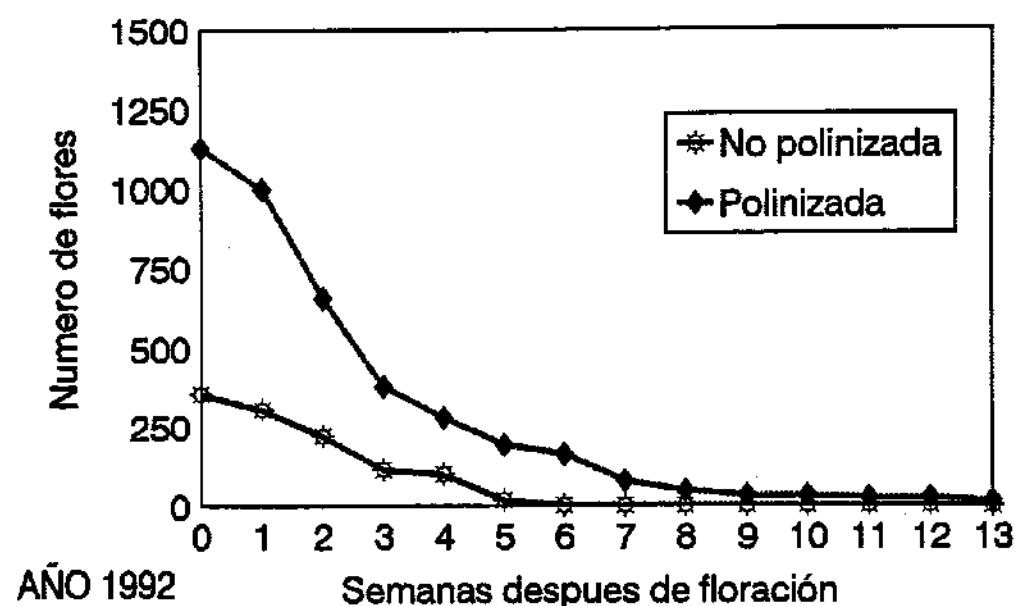


Figura 4.3.2.5.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo

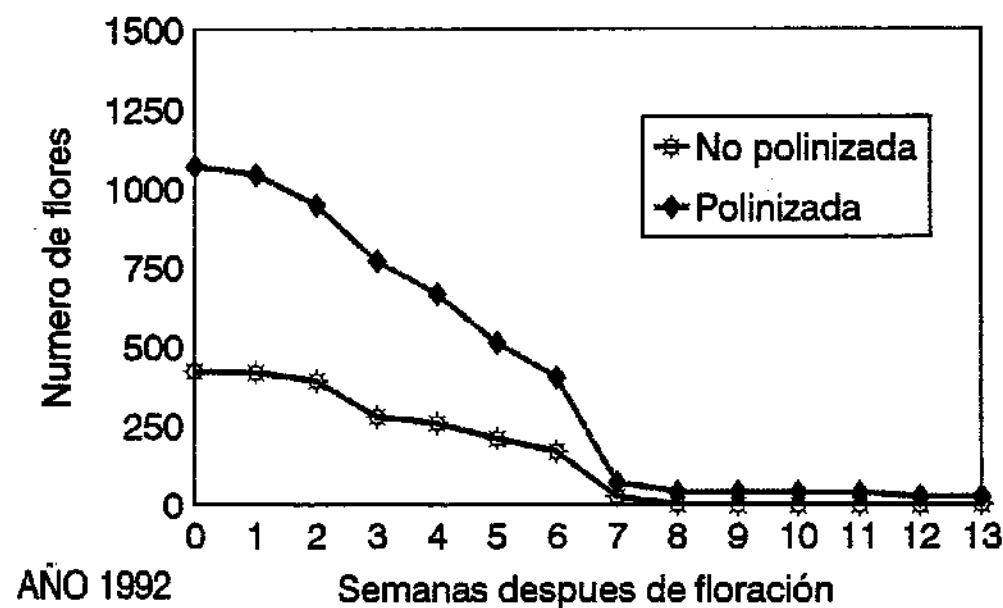


Figura 4.3.2.5.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde la antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo

4.4. DISCUSION.

4.4.1. Desarrollo del fruto y cuajado inicial.

El desarrollo del fruto en los distintos cruzamientos en los que se ha conseguido un cuajado ha sido el general de todas las drupáceas siguiendo un crecimiento de doble curva sigmoide con tres fases diferenciadas, detallado para diferentes especies de este género, como el albaricoquero (JACKSON y COOMBE, 1966), el ciruelo europeo (JEFFERIES, 1975), el cerezo (TUKEY, 1933) y el melocotonero (HARROLD, 1935; LILIEN-KIPNIS y LAEEVEE, 1971), con la excepción del almendro, en el que la tercera fase no existe (HAWKER y BUTTROSE, 1980). Sin embargo, en variedades de maduración temprana de cerezo y melocotonero, se ha señalado una diferencia con respecto al período II, que en estas variedades es más corto (TUKEY, 1936). Estos mismos resultados se han observado para el ciruelo europeo en variedades de maduración temprana relacionando además este desarrollo del fruto con la abscisión, ya que en el período I se observan tres fases, a,b,c y en la segunda fase b se produce una caída de frutos mayor (JEFFERIES, 1975). Teniendo en cuenta que la maduración del mirobolán es muy temprana (primeros de junio), la excesiva caída producida en las dos primeras semanas, tanto en el cruzamiento IV (intraespecífico) como en el VII (interespecífico), podría relacionarse con este período específico de desarrollo, ya que se asemeja más al ciruelo que al albaricoquero, incluso desde el punto de vista botánico, por lo que la diferencia con el albaricoquero en el momento del desarrollo del fruto radica en este período de desarrollo lento.

Las temperaturas durante el reposo invernal afectan al cuajado y al período de polinización efectivo. Generalmente en frutales se ha indicado que la influencia de la temperatura tiene mayor trascendencia en el momento de la antesis, cuando se procede a la polinización con todos los procesos anteriormente estudiados (EATON, 1959; BINI, 1984; FUROKAWA y BUKOVAC, 1989). También las temperaturas en el momento de la floración se encuentran estrechamente relacionadas con el período de polinización y las temperaturas elevadas durante la floración están asociadas con cosechas elevadas (THOMPSON y LIU,

1973). En algunas especies de hueso la elevada temperatura en floración limita el P.P.E. (TOYAMA, 1980), ya que produce un desarrollo acelerado de las flores y una degradación más rápida de los pistilos.

En el año 1990 no se obtuvo cuajado, debido a que se produjo una helada en todas las flores polinizadas. Este año la floración se produjo mucho antes debido a las altas temperaturas del mes de Febrero (11,46), superior a la temperatura media durante la floración durante años normales, hasta que se produjeron las heladas. En el año 1991 se obtuvo un cuajado inicial relativo, medido a la 5ª semana, en todos los cruzamientos, excepto en el cruzamiento intraespecífico VIII. En este año durante el mes de Febrero la temperatura media fue menor y la floración se retrasó 15 días con respecto al año anterior. Un comportamiento similar se observó en el año 1992, año en el que se midió el cuajado final.

El cuajado inicial medido a la 5ª semana después de la floración, indica que fue mayor en el año 1992 que en 1991. El único cruzamiento en el que se obtuvo un cuajado cercano al 50% fue en el I, menor del indicado para esta especie (TOYAMA, 1980). Los resultados en otras especies son muy variables (TOYAMA, 1980; THOMPSON y LIU, 1973; STÖSSER y ANVARI, 1983; FUKOKAWAC y BUKOVAC, 1989). El cuajado inicial resultó más alto en la mayoría de los cruzamientos en el año 1992, en el que la temperatura media durante la floración (11,01) fue menor que en el año 1991 (12,36), pero fue más alta durante el desarrollo del fruto en 1992 (14,47) que en 1991 (11,24). Sin embargo, los cuajados, dentro de su variabilidad, se pueden considerar normales para flores emasculadas y polinizadas artificialmente (LAYNE, 1983), considerando todas las limitaciones de compatibilidad y fertilidad floral que las condicionan.

Solamente en el cruzamiento intraespecífico IX de los pollizos se obtuvo un cuajado mayor en el año 1991, cuando la temperatura en floración fue menor que en el año 1992. En el cruzamiento interespecífico X el cuajado fue mayor en el año 1992, cuando la temperatura en floración fue menor que en el año 1991, al contrario de lo expuesto por THOMPSON y LIU, (1973).

En el cruzamiento VII, no se obtuvo cuajado en el año 1992, aunque la temperatura fue semejante en los dos años y muy constante a lo largo del tiempo. Este hecho parece estar directamente relacionado con aspectos que atañen a la planta madre, ya que fue uno de los dos casos en los que el ensayo no se llevó a cabo en la misma planta. En 1992 la polinización se realizó en una planta más joven que la utilizada en el año anterior, ya que se trataba de un planta de un seto productor de estaquillas para propagación vegetativa en un campo de selección de plantas para patrones. Sin embargo, a este mismo tratamiento fue sometido el otro clon utilizado en el cruzamiento interespecífico IV, el 'Mirobolán B', en el que se obtuvo cuajado en los dos años. Al parecer esta juvenilidad que se trata de mantener influye de diferente forma en los dos clones de tal manera que la calidad de flor en el 'Mirobolán 605' es peor que en el 'Mirobolán B'. Por ello se podría suponer que la mayoría de los óvulos se encontraban ya degenerados en el momento de la fecundación, reduciendo al mínimo las posibilidades de ser fecundados (STÖSSER y ANVARI, 1983). Esta técnica de cultivo influye directamente en la calidad de la flor de este clon lo que hace que su influencia en el cuajado sea evidente (WILLIAMS y WILLSON, 1970). Por ello no se puede afirmar que el cruzamiento entre los dos mirabolanes sea incompatible o compatible, sino que la diferencia de comportamiento se debe a la influencia de la planta madre.

4.4.2. Caída en los diferentes cruzamientos.

Los cruzamientos en los que se ha podido establecer un cuajado final son los intraespecíficos I y IX y los interespecíficos III, IV y X. En el cruzamiento intraespecífico III del híbrido 'Cachirulo' x *P. tomentosa*, se obtuvo un cuajado muy bajo, inferior al 1%, que sin embargo es muy similar al del cruzamiento intraespecífico IX, de los dos clones de pollizo (*P. insititia*) que es inferior también al interespecífico X.

Generalmente la primera caída se realiza a las dos semanas y media después de la polinización, la segunda alcanza el máximo una semana más tarde y la tercera ocurre tres semanas después de la segunda (BRADBURY, 1929). Aunque ésta es la tendencia general, se presentan variaciones según los cruzamientos. La primera caída es debida a los pistilos en los



que el óvulo ha cesado su crecimiento como ha sido observado en varias especies de *Prunus*, como cerezo (BRADBURY, 1929), ciruelo europeo (DORSEY, 1919b) y melocotonero (HARROLD, 1935), pero también de óvulos fecundados, en oposición a lo afirmado por DORSEY (1919b) de que sólo caen pistilos.

Esta caída se produce semana y media después de la floración en los cruzamientos del albaricoquero, en los cruzamientos del híbrido 'Cachirulo', tanto en el intraespecífico como en los interespecíficos, y también de forma muy similar en los cruzamientos IX y X de los ciruelos hexaploides. La segunda caída tiene lugar durante la fase de endospermo libre nuclear y primeros estados de desarrollo del embrión. Según HARROLD (1935) y KESTER y GRIGGS (1959) la primera y segunda caídas se deben a una falta de polinización, pero mientras ello se ha confirmado en ciruelo europeo (DORSEY, 1919a), en cerezo también caen flores con óvulos fecundados (BRADBURY, 1929). Este fenómeno es el que ocurriría alrededor de la 5ª semana en el albaricoquero y en los cruzamientos del híbrido II, III, V y VI. En los ciruelos hexaploides, cruzamientos IX y X, esta caída se produce alrededor de la tercera semana, lo que indicaría que la fecundación se produciría antes en estos ciruelos que en los otros dos clones si se tratara de óvulos no fecundados (DORSEY, 1919b). La tercera caída es de embriones sin diferenciar que han cesado su crecimiento y que poseen los tegumentos negros y la calaza oscura (HARROLD, 1935), aunque este pardeamiento también se ha observado en los óvulos de la segunda caída en ciruelo (DORSEY, 1919a). Esta tercera caída no se observa claramente en los cruzamientos del híbrido 'Cachirulo' ni tampoco en el albaricoquero, ya que no es tan pronunciada como las otras dos, y se encontraría dentro de la línea establecida a partir de la 7ª semana, que sería la caída debido a competencia de nutrientes, por lo que se trataría de flores polinizadas (STEPHENSON, 1981).

En los cruzamientos de los mirobolanes las caídas más pronunciadas se producen a la primera semana y se deberían a los pistilos mal formados tanto en los cruzamientos interespecíficos IV y VIII, como en el cruzamiento intraespecífico VII, por lo que no tienen relación con el proceso de la polinización como afirman varios autores (DORSEY, 1919a; BRADBURY, 1929; EATON y JAMONT, 1964). La segunda caída se produce una semana más tarde que se debería también a una falta de fecundación (KESTER y GRIGGS, 1959) o

probablemente, en este caso, a un porcentaje de óvulos mal formados debido a las características específicas de las plantas utilizadas en el ensayo. Esta caída es total en los cruzamientos VII y VIII, en los que no se obtuvo cuajado este mismo año 1992. La segunda caída en el cruzamiento IV se debería en parte a óvulos fecundados, pues la fecundación ya se ha producido la segunda semana y serían embriones sin diferenciar, debidos a algún fallo en la fecundación (HARROLD, 1935). La tercera caída de precosecha se observa claramente en el cruzamiento IV, alrededor de la 9ª semana, por aborto del embrión, como en algún caso anterior (HARROLD, 1935) o por la competencia de nutrientes en un momento cercano a la maduración (RALLO y FERNANDEZ-ESCOBAR, 1985).

La caída se produce de forma similar en flores polinizadas y no polinizadas hasta la 5ª semana en los cruzamientos I, II, III, V y VI, cuando se produce la segunda caída, excepto en los cruzamientos VII y VIII de mirobolán y los V y VI del híbrido 'Cachirulo', ya que estos dos últimos se pueden considerar incompatibles como el cruzamiento VIII.

DISCUSION GENERAL

VI. DISCUSION GENERAL

VI. 1. Crecimiento de los tubos polínicos e incompatibilidad en el estilo.

En todos los cruzamientos estudiados se ha seguido el proceso desde la germinación del grano de polen en la superficie estigmática hasta la llegada de los tubos polínicos a la base del estilo así como su crecimiento a través del pistilo.

Este estudio se ha llevado a cabo a dos temperaturas diferentes, 12 y 22°C. La temperatura inferior es comparable a la temperatura a la que han crecido los tubos polínicos en el campo, que ha sido de una media de 12,36 en el año 1991 y de 11,01 en 1992 en el mes de marzo, mes a lo largo del cual se han realizado los cruzamientos. La temperatura mayor se ha utilizado para favorecer el estudio, ya que las temperaturas elevadas aceleran el crecimiento de los tubos polínicos compatibles y refuerzan los mecanismos de incompatibilidad. La velocidad media de los tubos polínicos (CUADRO 1.3.2.3.4.) a las dos temperaturas ha sido mayor en los cruzamientos compatibles. Estos son los cruzamientos intraespecíficos VII, II y I y los interespecíficos IV y X, sin que se pueda afirmar que esta velocidad sea mayor en los cruzamientos intraespecíficos que en los cruzamientos interespecíficos. Una velocidad mayor se observa en los cruzamientos intraespecíficos de *P.armeniaca* y *P.cerasifera* en los que el polen crece en el pistilo de la misma especie que cuando lo hace en el pistilo de otra especie (CUADRO 1.3.2.1.3.). Pero estas diferencias son solamente apreciables en las primeras horas después de la germinación, lo que indica que la diferencia sería debida más bien a un retraso en la emisión del tubo polínico en el estigma de la otra especie, como se ha propuesto en los cruzamientos con polen autoincompatible para otras especies de *Prunus* (PIMIENTA *et al.*, 1982; SOCIAS i COMPANYY y FELIPE, 1989).

Solamente en el caso del cruzamiento intraespecífico IX se ha observado una velocidad menor que en el cruzamiento interespecífico X, en el que tanto la velocidad de los tubos polínicos a las primeras horas de la germinación como la velocidad media total es mayor.

El género *Prunus* posee una autoincompatibilidad de tipo gametofítico (CRANE y LAWRENCE, 1929; LEWIS y CROWE, 1958), que se manifiesta por la parada de los tubos polínicos en el estilo. Para otras familias, como las *Solanaceas* que también poseen un sistema de autoincompatibilidad gametofítica, DE NETTANCOURT (1977) ha propuesto que la incompatibilidad interespecífica estaría regulada del mismo modo, es decir, por el alelo S de la autoincompatibilidad. En los cruzamientos estudiados no hay ninguna evidencia de que los tubos polínicos hayan detenido su crecimiento en el estilo, ya que al menos un tubo polínico ha alcanzado la base del estilo en todos los casos, por lo que no se puede decir que la incompatibilidad se manifieste a nivel del estilo, pudiéndose considerar todos los cruzamientos compatibles desde el punto de vista del crecimiento de los tubos polínicos. Se ha observado en general una parada en el primer tercio del estilo, donde se produce un cribado de los tubos polínicos en la zona de interferencia (BHATTACHAJYA y LINSKENS, 1954) y donde la concentración de las proteínas responsables de la reacción de autoincompatibilidad es mayor que en el ovario (ANDERSON *et al.*, 1989). Sin embargo, la parada a este nivel ocurre por igual tanto en los cruzamientos intra como en los interespecíficos, como se ha descrito en cruzamientos compatibles intraespecíficos (HERRERO, 1992b).

El efecto de la temperatura en el crecimiento de los tubos polínicos ya fue señalado por LEWIS, (LEWIS, 1949a) quien indicó que la velocidad es mayor a altas temperaturas, al mismo tiempo que señaló un efecto negativo para los tubos incompatibles en cruzamientos interespecíficos, por lo que detendrían su crecimiento antes a mayor temperatura. En todos los cruzamientos interespecíficos estudiados, se ha observado que la velocidad es mayor a 22° C que a 12° C, incluso en los cruzamientos interespecíficos que han resultado incompatibles, quizás porque la temperatura superior no ha sido suficientemente alta para acentuar las reacciones de incompatibilidad interespecífica. Este efecto positivo de la temperatura en el crecimiento de los tubos polínicos ha sido observado en este género en polinizaciones intraespecíficas (SOCIAS i COMPANY *et al.*, 1976). Otros autores atribuyen la mayor velocidad del crecimiento de los tubos polínicos en cruzamientos interespecíficos, a un efecto inherente del polen más que a un efecto directo de la temperatura (PEREZ y MOORE, 1985).

VI. 2. Incompatibilidad en el ovario. Estudio del óvulo.

En el cruzamiento interespecífico VIII se ha observado que los tubos polínicos se detienen en el ovario después de haber alcanzado el canal micropilar. En este caso no se ha observado que haya tenido lugar la fecundación, lo que hace pensar que el crecimiento ha quedado detenido a nivel de la epidermis que rodea los óvulos. Esta parada en el ovario se ha observado en cruzamientos interespecíficos de otras especies (WILLIAMS *et al.*, 1982; ELLIS *et al.*, 1991; SAMIMY, 1991).

Se debe tener en cuenta que a este nivel se han localizado algunos de los productos del locus S responsables de la autoincompatibilidad, como son las glicoproteínas con función RNAasa en la epidermis de la placenta que rodea al óvulo (HARING *et al.*, 1990; THOMPSON y KIRCH, 1992). Sin embargo, esta proteína no se ha detectado como producto génico del locus S en el polen (THOMPSON y KIRCH, 1992) por lo que la reacción de especificidad no esta clara. Si los tubos se han detenido en el ovario podría pensarse que se ha manifestado la incompatibilidad de igual forma que se produciría en el caso de los tubos polínicos autoincompatibles. Serían necesarios estudios moleculares en ambos tejidos, tanto del polen como del tejido maternal y comprobar si estas sustancias de autoincompatibilidad son similares en las especies de un género y se ponen de manifiesto cuando el polen de una germina y crece en el pistilo de otra diferente. De esta forma podría afirmarse la teoría propuesta por DE NETTANCOURT (1977) de que la incompatibilidad interespecífica está regulada de igual forma que la autoincompatibilidad.

En los demás cruzamientos analizados el proceso de fecundación ocurre de forma similar en los cruzamientos intraespecíficos I (de los dos albaricoqueros) y VII (de los dos mirobolanes) y el cruzamiento interespecífico IV (Mirobolán x Albaricoquero), considerados compatibles puesto que se ha obtenido un cuajado importante en los tres. Se puede afirmar que en el cruzamiento interespecífico VIII, las barreras para la hibridación se establecen a nivel prezigótico. No se ha observado ninguna diferencia apreciable en el desarrollo inicial del embrión en el cruzamiento interespecífico IV respecto a los dos cruzamientos intraespecíficos I y VII.

En los cruzamientos interespecíficos con el híbrido 'Cachirulo' V (con *mirobolán*) y VI (con un híbrido de *mirobolán*) no hubo evidencia de fecundación a la quinta semana ya que no se encontraron núcleos de endospermo, por lo que parece que la incompatibilidad también se produciría a nivel del ovario, quizás en el tejido transmisor que se prolonga hasta su interior. Por ello las barreras de incompatibilidad se establecerían a nivel prezigótico como en el cruzamiento VIII.

En los otros dos cruzamientos con 'Cachirulo' el II (con el otro clon híbrido) y el interespecífico III (con *P. tomentosa*) se observaron embrión y endospermo a la 5ª semana después de la polinización. Se observó una diferencia en el porcentaje de fecundación a esta semana, lo cual puede ser atribuible al estado de los óvulos en el momento de la fecundación. El período receptivo debería ser igual en los cuatro cruzamientos, por lo que su variabilidad estaría más bien condicionada por la llegada de los tubos polínicos al ovario, fenómeno que mantendría al óvulo en mejor estado (PIMIENTA y POLITO, 1983). En el cruzamiento interespecífico III la velocidad de los tubos polínicos es menor y la llegada se produce más tarde que en el cruzamiento II, lo que explicaría el mayor porcentaje de óvulos degenerados y en mal estado que no llegan a ser fecundados en el primer caso como proponen STÖSSER y ANVARI (1982). Otros autores atribuyen la diferencia en el cuajado en diferentes especies de *Prunus* solamente a efectos de la receptividad del óvulo y no a un efecto directo de la temperatura en el crecimiento de los tubos polínicos, al comparar variedades androestériles con fértiles (MARTINEZ-TELLEZ y CROSSA-RAYNAUD, 1982), pero no sería el caso de estos cruzamientos ya que 'Cachirulo' es un híbrido fértil.

Sin embargo, en los cruzamientos con los *mirobolanes*, el porcentaje de cuajado inicial de fecundación en el momento en que se realizó el cultivo "in vitro" (5ª semana después de la polinización), es menor en el cruzamiento interespecífico IV que en el cruzamiento intraespecífico VII. Ello no se explicaría por una falta de receptividad del óvulo, ya que es mayor esta degeneración en el 'Mirobolán 605' (cruzamiento VII) que en el 'Mirobolán B' (cruzamiento IV). En este caso a pesar de producirse la fecundación, parece tener lugar el aborto del embrión híbrido, como es típico de muchos cruzamientos interespecíficos (WILLIAMS *et al.*, 1987; ABBO y LADIZINSKY, 1991; AHMAD y SLINKARD, 1991). Las

causas del aborto del embrión son múltiples, ya sea por una falta de homología de los genomas híbridos o por una diferencia en la tasa de crecimiento del embrión de cada una de las especies implicadas en el cruzamiento.

Estas diferencias de fecundación podrían apuntar a que el mecanismo de la incompatibilidad interespecífica se explicaría mejor por medio de un concepto más amplio como el propuesto por HOGENBOON (1973, 1975) de incongruencia en la que la falta de información genética en cada uno de los procesos reproductivos desde el crecimiento de los tubos polínicos en el estilo hasta la fecundación es la responsable de esta incongruencia entre especies distintas, debido a una no co-evolución de las mismas (HOGENBOON, 1983). Por ello puede decirse que las barreras que mantienen el aislamiento reproductivo en las especies del género *Prunus*, pueden separarse perfectamente en prezigóticas y postzigóticas como propusieron PEREZ y MOORE (1985).

VI. 3. Cultivo "in vitro".

El uso del cultivo de óvulos "in vitro" no ha sido efectivo para aumentar el porcentaje de embriones híbridos recuperables en ninguno de los cruzamientos más que en el caso del cruzamiento intraespecífico VII, entre los dos *mirobolanes*. En el cruzamiento interespecífico IV, con el otro clon de *mirobolán*, el desarrollo del embrión no fue suficiente para poder ser cultivado independientemente, lo que sugiere que se puede deber por una parte al aborto del embrión híbrido del cruzamiento interespecífico, pero también a una respuesta diferente del medio, puesto que se trata de cultivares diferentes, que podrían tener requisitos diferentes en cuanto a las condiciones de cultivo de los óvulos (RAMMING, 1985), a pesar de que el desarrollo del embrión en el momento del cultivo es similar en ambos cruzamientos. En otros casos la diferencia de desarrollo de los parentales frente al embrión híbrido ha dado lugar al aborto de este último (ABBO y LADIZINSKY, 1991), explicándose por una falta de homología de los cromosomas. En este caso parece más bien atribuible a la especificidad del medio y a la interacción del cultivar, dada la variabilidad también observada en la formación de callo como respuesta al medio.



El cultivo "in vitro" de óvulos ha sido efectivo en unos pocos casos, en particular en gramíneas (WILLIAMS y DE LA TOUR, 1980). Los mejores resultados se han obtenido por medio del cultivo del embrión aislado (SHII *et al.*, 1982) o cigoto aislado (MOL *et al.*, 1993). El momento más común de aborto del embrión corresponde a su estado globular, fenómeno que se ha observado en muchas especies y que casi siempre es atribuible a una falta de desarrollo del endospermo, ya que deja de nutrir al embrión y se produce el aborto (WHITE y WILLIAMS, 1976; WILLIAMS y WHITE, 1976). Por ello en todos los cruzamientos se mantuvo el tejido materno como sugieren muchos autores (WILLIAMS y DE LA TOUR, 1980). Sin embargo, el cultivo "in vitro" de los óvulos en estas condiciones ha fallado en muchas otras especies a pesar de que se encuentra tejido materno, por lo que también se ha atribuido a un desarreglo en la nutrición y a un mal funcionamiento de los tejidos maternos (GRITTON y WIERZBICKA, 1975; RAMSAY y PICKERSGILL, 1986; BINO *et al.*, 1989). Las mayores modificaciones en tejidos cultivados "in vitro" se han descrito para el tejido materno, lo que atribuye una importancia mayor a éste que al tejido diploide del suspensor o el embrión, y al papel que desempeñan en la nutrición (BRUUN, 1991a, 1991b). Este tipo de modificaciones se han obtenido en la mayoría de los cruzamientos donde se ha observado la respuesta al medio con la formación de callo.

La teoría del número de balance del endospermo ha servido para explicar el fallo en cruzamientos interespecíficos, debido a que se produce una falta de correspondencia en el número cromosómico del endospermo, lo que da lugar a un desarreglo funcional de éste y posteriormente del embrión (JOHNSTON *et al.*, 1980). En los cruzamientos interespecíficos estudiados todos los cruzamientos tenían el mismo nivel de ploidía, por lo que si el híbrido interespecífico utilizado en el cruzamiento III como planta polinizadora se comportara como diploide, esta teoría no explicaría el aborto que parece producirse en este cruzamiento. Quizás la teoría posterior formulada por NISHIYAMA *et al.* (1991) explicaría de forma más amplia el aborto del embrión así como del endospermo; esta teoría asigna un valor específico a un índice de activación de los núcleos polares, que dan lugar al endospermo, y otro al de la célula huevo, que da lugar al embrión, y así cada especie tendría un valor específico del índice de activación. En el cruzamiento III, el desarreglo en uno de los dos procesos de la doble fecundación podría ser la causa de la baja fecundación. En otros géneros se ha señalado un

aislamiento reproductivo intersubgenérico (ELLIS *et al.*, 1991), pero en el caso de *P. tomentosa*, perteneciente al género *Cerasus*, y el híbrido 'Cachirulo' del subgénero *Amygdalus*, no se puede afirmar que exista este aislamiento.

VI. 4. Curvas de caída.

Al analizar las curvas de caída de flores y frutos se pueden relacionar las curvas de las flores no polinizadas y las polinizadas para explicar el número de frutos obtenidos hasta el momento en que se llevó a cabo el cultivo "in vitro". Seguramente la caída sería de flores sin polinizar, lo que se corresponde con la segunda caída observada en las diferentes especies de *Prunus* (DORSEY, 1919b; BRADBURY, 1929; HARROLD, 1935).

En el cruzamiento VIII no se obtuvo una cantidad suficiente de frutos porque no se produce la fecundación y la caída mayor tiene lugar a la segunda semana, mucho antes de la puesta en cultivo "in vitro". También en el cruzamiento VII a la 2ª semana se produce el pico de caída más acentuado y la falta de cuajado en el año 1992 apunta más a una mala calidad de las flores que a otros factores limitantes del cuajado. Los frutos recogidos en los cruzamientos V y VI para el cultivo "in vitro" contenían óvulos sin fecundar, como se determinó con la técnica del aclareo de óvulos. Por ello las curvas de caída de mayor incidencia son las de la 2ª caída, debida fundamentalmente a óvulos no fecundados, como se ha observado en diferentes especies de *Prunus*, como melocotonero y almendro (HARROLD, 1935; KESTER y GRIGGS, 1959). Estos cruzamientos se han realizado con 'Cachirulo', un híbrido de almendro x melocotonero, con caracteres similares a los dos, lo que podría explicar esta baja fecundación inicial observada en el momento de la puesta en cultivo "in vitro", ya que se trata siempre de óvulos no fecundados. Se puede asegurar que en estos dos cruzamientos actúan barreras prezigóticas de incompatibilidad.

En el cruzamiento III, el bajo porcentaje obtenido puede atribuirse a un mayor aborto del embrión híbrido, así como a la falta de fecundación. Esta falta de fecundación sería debida a que el polen de *P. tomentosa*, ha sido el que más ha tardado en alcanzar el ovario y

Discusión General

la falta de fecundación podría ser también la causa de este bajo cuajado (KESTER y GRIGGS, 1959). El aborto más importante del embrión híbrido en los cruzamientos interespecíficos ha sido el III, pero las causas no se han podido determinar, aunque el estado de la planta polinizada puede ser muy influyente en la fecundación.

Las diferencias en la calidad de flor han quedado de manifiesto en la falta de cuajado en el cruzamiento VII de 'Mirobolán 605' por tratarse de una planta joven, en el año 1992, en la que las flores parecen tener un desarrollo peor que en el cultivar 'Mirobolán B' del cruzamiento IV.

CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONES

VII.1. El crecimiento del tubo polínico ha mostrado la compatibilidad de la polinización en todos los cruzamientos. En los casos de incompatibilidad interespecífica esta no parece deberse a efectos del locus S sino probablemente a la incongruencia entre especies distintas. La mayor afinidad entre polen y pistilo solamente se manifiesta en una mayor velocidad de germinación y de crecimiento inicial de tubos polínicos, igualándose posteriormente la velocidad en los diferentes tipos de cruzamientos.

VII.2. El aumento de la temperatura ha producido un aumento en la velocidad de los tubos polínicos.

VII.3. La llegada de los tubos polínicos al ovario no ha supuesto la fecundación de los óvulos en los cruzamientos interespecíficos incompatibles, lo que indica que la manifestación de la incompatibilidad interespecífica es en el ovario.

VII.4. El nivel de fecundación depende del estado de la planta madre y especialmente del porcentaje de óvulos bien desarrollados. Ello obliga a una elección cuidadosa de las plantas y a unas técnicas de cultivo adecuadas que aseguren una alta viabilidad de los óvulos con el fin de que los cuajados, especialmente en los cruzamientos más difíciles, resulten en un nivel aceptable de frutos y por ende de semillas en el proceso de selección de patrones.

VII.5. En los cruzamientos compatibles, tanto intraespecíficos como interespecíficos, el desarrollo del óvulo y del embrión sigue el patrón de desarrollo de la planta polinizada, independientemente del polen utilizado.

VII.6. El cultivo de óvulos en los cruzamientos estudiados sólo ha servido para aumentar parcialmente el número de embriones híbridos obtenidos. Ello puede ser debido a que se ha utilizado para todos ellos los mismos medios de cultivo, mientras que se ha observado que cada uno puede presentar unos requisitos más específicos en cuanto al medio de cultivo de óvulos.

VII.7. El aborto de embriones en los cruzamientos interespecíficos se ha producido en el estado globular.

VII.8. La caída de frutos más pronunciada en todos los cruzamientos se ha correspondido con la segunda caída, indicada para todos los frutales de hueso, que es debida a flores no fecundadas.

VII.9. En los cruzamientos V, VI y VIII las barreras de incompatibilidad parecen producirse a nivel prezigótico.

VII.10. Solamente en el cruzamiento interespecífico III se observa que la barrera de incompatibilidad es a nivel postzigótico, por lo que el cultivo de embriones en este cruzamiento sería interesante.

VII.11. El cruzamiento interespecífico IV, entre mirobolán y albaricoquero, se puede considerar compatible y con posibilidades de obtención de un buen cuajado, para una selección posterior de plantas híbridas.

VII.12. El nivel de cuajado puede depender más del estado de la planta que de la afinidad del polen utilizado, ya que cruzamientos interespecíficos pueden tener un cuajado mayor que los intraespecíficos como se indica en el cruzamientos IX, intraespecífico y X interespecífico.

VII.13. La diferencia de comportamiento del pollizo 'Puebla de Soto 101' en relación con el 'Reina Claudia' puede reforzar la hipótesis de considerar a los pollizos como una especie *P. insititia*, independiente de *P. domestica* y no como una subespecie de ésta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- ABBO, S.; LADIZINSKY, G. 1991. Anatomical aspects of hybrid embryo abortion in the genus *ens.L. Bot. Gaz.* 152, 3, 316-320.
- AFIFY, A. 1933. Pollen tube growth in diploid and polyploid fruits. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 11, 113-119.
- AGNIHOTY, A.; GUPTA, V.; LAKSHMIKUMARAN, M.S.; SHIVANNA, K.R.; PRAKASH, S.; JAGANNATHAN, V. 1990a. Production of *Eruca-Brassica* hybrids by embryo rescue. *Plant Breed.* 104, 281-289.
- AGNIHOTY, A.; SHIVANNA, K.R.; RAINA, S.N.; LAKSHMIKUMARAN, M.; PRAKASH, S.; JAGANNATHAN, V. 1990b. Production of *Brassica napus* x *Raphanobrassica* hybrids by embryo rescue. *Plant Breed.* 105, 292-299.
- AHMAND, F.; SLINKARD, A.E. 1991. Relative embryo growth rates in the annual *Cicer L.* species. *Ann. Bot.* 68, 489-493.
- ANDERSON, M.A.; McFADDEN, G.I.; BERNATZKY, R.; ATKINSON, A.; ORPIN, T.; DEDMANH.; TREGGAR, G.; FERLEY, R.; CLARKE, A. 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell.*, 1, 483-490.
- ANDRADE-AGUILAR, J.A.; JACKSON, M.T. 1988. Attempts at interspecific hybridization between *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. Gray using embryo rescue. *Plant Breed.*, 101, 173-180.
- ANVARI, D.F.; STOSSER, R. 1978. Eine neue fluoreszenzmikroskopische Methode zur Samenangen bei *Prunus*. *Z. Pflanzenzücht.*, 81, 333-336.

Referencias bibliográficas

- ARASU, N.T. 1968. Self-incompatibility in Angiosperms: A review. *Genetica*, 39, 1-24.
- ARBELOA, A.; HERRERO, M. 1987. Germinación y difusión de proteínas del polen del melocotonero. *I TEA*, 69, 47-53.
- ARBELOA, A.; HERRERO, M. 1991. Development of the ovular structures in peach *Prunus persica* (L.) Batsch. *New Phytol.*, 118, 527-533.
- ARCHIBALD, R.D.; MELTON, L.D. 1987. The anatomy of the fleshy pericarp of maturing Moorpark apricot, *Prunus armeniaca*. *N. Z. J. Bot.*, 25, 181-184.
- ARORA, R. L.; RANVIR-SING, 1988. Breakdown of incompatibility on *Prunus salicina* and *P. persica*. *Ind. J. Hort.*, 45, 1-2, 39-44.
- AUDERGON, J.M.; DUFFILLOL, J.M.; SIGNORET, V.; GILLES, F. 1988. Les variétés. Special apricot. *L'Arboric. Frut.* 403, 22-56.
- BAGGLIOLINI, A. 1984. EPPO crop growth stage keys. Almond, Apricot and Peach. *Bull. OEPP*, 14, 4, 567-570.
- BAILEY, C.H.; HOUGH, L.F. 1975. Apricots En: *Advances in Fruit Breeding*. J. Janick and J.N. Moore eds. Purdue University Press. West Laffayette, Indiana. pp. 367-383.
- BATEMAN, A.J. 1952. Self-incompatibility systems in Angiosperms. I. Theory. *Heredity*, 6, 285-310.
- BATEMAN, A.J. 1954. Self-incompatibility systems in Angiosperms. II. *Iberis amara*. *Heredity*, 8, 305-332.
- BATEMAN, A.J. 1955. *Cruciferae*, *Heredity*, 9, 53-68.

Referencias bibliográficas

- BAWA, K.S.; WEBB, C.J. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive pattern. *Amer.J.Bot.*, 71, 5, 736-751.
- BELL, R.L.; HOUGH, L.F. 1986. Interspecific and intergeneric hybridization of *Pyrus*. *HortScience*, 21, 1, 62-64.
- BERNHARD, R. 1949. Le pecher-amandier et son utilisation, *Rev. Hort*, 121, 2164, 97-101.
- BERNHARD, R. 1962. Les hybrides Prunier x Amandier et Prunier x Pêcher, principales caractéristiques, comportement comme porte-greffe éventuels du Pêcher. *Adv. Hort. Science and their Application*. Vol. II. 71-81.
- BERNHARD, R. 1981. Hybridation interspecifique and amélioration des plantes. *C.R. Acad. Agric.Fr.* 1013-1024.
- BERNHARD, R.; DUQUERNE, J. 1961. Les porte-greffes de l'abricotier. *Journées nationales de l'abricotier*. Perpignan. Octobre, 101-117.
- BHATTACHAJYA, S.S.; LINSKENS, H.F. 1955. Recent advances in the physiology of self-sterility in plants. *Sci. Cult.*, 20, 8, 370-373.
- BINI, G. 1984. Fioritura e impollinazione nell'olivo. Indagini sul periodo d'impollinazione, recettività dello stigma ed evoluzione del gametofito femminile. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.*, 68, 57-69.
- BINI, G.; BELLINI, E. 1971. Macrosporgenesi nella cultivar di pero "Decana del Comizio" ricerca del periodo più opportuno per la sua impollinazione. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 55, 4, 332-336.
- BINI, G.; BELLINI, E. 1973. Preliminary results on the embryo culture technique applied to plum breeding, using the variety "Ruth Gerstetter". *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 57, 4,

259-267.

- BINO, R.J.; JANSSEN, M.G.; FRANKEN, J.; DE VRIES, J.N. 1989. Enhanced seed development in the interspecific cross *Allium cepa* x *A. sphaerocephalon* through ovary culture. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 16, 135-142.
- BRADBURY, D. 1929. A comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus cerasus*. *Amer. J. Bot.* 16, 525-543.
- BREWBAKER, J.L. 1957. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *J. Hered.*, 48, 271-277.
- BROWN, A.P.; BROWN, J.; DYER, A.F. 1991. Optimal pollination conditions for seed set after a self-pollination, an intraspecific cross and a interspecific cross of narrow-stem *Kole B. oleracea* var. *acephala*. *Euphytica*, 51, 207-214.
- BRUUN, L. 1991 a. Histological and semi-quantitative approaches to in vitro cellular responses of ovule, embryo and endosperm in sugar beet, *Beta vulgaris*. *Sex. Plant. Reprod.*, 4, 64-72.
- BRUUN, L. 1991 b. A statistical analysis of some genetical, physiological and anatomical parameters of the development of in situ and in vitro grown ovules from intra and interspecific crosses in the genus *Beta*. *Sex. Plant Reprod.*, 4, 118-125.
- BURGOS, L. 1991. *Biología Floral de variedades de albaricoquero Prunus armeniaca* L. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Murcia. 260 pp.
- BYRNE, D.H.; LITTELTON, T.G. 1988. Verification of the parentage of presumed peach x almond hybrids by isozyme analyses. *Fruit Var. J.* 42, 4, 130-134.
- BYRNE, D.H.; LITTELTON, T.G. 1989. Interspecific hybrid verification of plum x apricot

hybrids via isozyme analyses. *HortScience*, 24, 1, 132-134.

- CAMBRA, R. 1979. Selección clonal de "Pollizo de Murcia". *I.T.E.A.* 36, 21-30.
- CAMBRA, R. 1983. Selección y experimentación de patrones para especies de hueso en la E.E.A.D. III Jornadas Nacionales de Hortofruticultura. Zaragoza, Mayo, 1983.
- CAMBRA, R. 1990. 'Adafuel' an almond x peach hybrid rootstock. *HortScience*, 25, 5, 584.
- CAMPELL, J. ASCHER, P.D. 1975. Incorporation of radioactive label into nucleic acids of compatible and incompatible pollen tubes of *Lilium longiflorum* Thunb. *Theor. Appl. Gen.*, 46, 143-148.
- CAP, G.B.; ROBERTS, P.A.; THOMASON, I.J.; MURASHIGE, T. 1991. Embryo culture of *Lycopersicum esculentum* x *L. peruviaum* hybrid genotypes possessing heat stable resistance to *Meloidogyne incognita*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116, 16, 1082-1088.
- CARRERA, M. 1987. El melocotonero en España, su cultivo y situación. *Frut.*, II, Sept. 1987. 138-143.
- CAUDERON, A. 1981. Hybridation interspécifique et amélioration des plantes. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 997-1012.
- CLARKE, A.E.; RAFF, J. MAU, S.L. 1981. Nature of some components of *Prunus avium* styles including two antigenic glycoproteins. *Phytomorphology*, 31, 314, 180-190.
- COMEAU, A.; NADEAN, P.; PLOURDE, A.; SIMARD, R.; MAES, O.; KELLY, S.; HARPE, L.; LETTRE, J.; LOSELY, . 1992. Media for the in ovulo culture of proembryos of wheat and wheat derived interspecific hybrids or haploids. *Plant Sci.*, 81, 117-125.



Referencias bibliográficas

- COSTA-TURA, J.; MACKENZIE, K.A.D. 1990. Ovule and embryo sac development in *Malus pumila* L. cv. Cox's orange pippin, from dormancy to blossom. *Ann. Bot.*, 66, 443-450.
- COYLE, J. E. 1982. Interspecific hybridization among *Prunus* species. M. S. Thesis, Cornell University Ithaca. N. Y. 123 pp.
- CRANE, M.B. LAWRENCE, W.J.C. 1929. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *J. Pomol. Hort. Sci.*, 7, 276-301.
- CRANE, M.B.; LAWRENCE, W.J.C. 1931. Studies in sterility. *Proc. 9th Int. Hort. Congr.*, 100-116.
- CRESTI, M.; PACINI, E.; CIAMPOLINI, F.; SARFATTI, G. 1977. Germination and early tube development in vitro of *Lycopersicum peruvianum* pollen. *Planta*, 136, 139-247.
- CROSSA-RAYNAUD, P.; AUDERGON, J.M. 1987. Apricot rootstocks. En: *Rootstocks for fruit crops*. Ed. Roy C. Rom y Robert F. Carlson. New York. 295-320.
- CROWE, L.K. 1964. The evolution of outbreeding in plants. I. The angiosperms. *Heredity*, 19, 435-457.
- CUMMING, W. 1963. New hybrid of the Genus *Prunus*, *P. nigra* x *P. tenella*. *Batsh. Bailey* 11, 1, 5-7.
- CUMMINS, J.N. 1985. A preliminary trial of stone exotic stocks for apricots. *Fruit. Var. J.* 39, 4, 41-43.
- CHAPARRO, J. SHERMAN, W.B. 1988. Pollen source effects on peach embryo size. *HortScience*, 23, 4, 753-754.

Referencias bibliográficas

- CHAPARRO, J.; DURHAM, R. E.; MOORE, G. A.; SHERMAN, W.B. 1987. Use of techniques to identify peach x Nonpareil almond hybrids. *HortScience*, 22, 2, 300-302.
- CHARLESWORTH, D. 1982. On the nature of the self-incompatibility locus in homomorphic and heteromorphic systems. *Amer. Natur.*, 119, 732-735.
- CHARLESWORTH, D. 1985. In: *Evolution-essays in honour of John Maynard Smith*, P.J. Greenwood, P.H. Harvey, M. Slatterm, Eds. Cambridge, Uni. Press, Cambridge. pp. 237-268.
- CHEE, R.; POOL, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for "in vitro" shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Hort.*, 32, 85-95.
- CHEN, F.; HAYES, P. 1991. Effect of exogenous plant growth regulators on in vitro seed growth, embryo development, and haploid production in a cross between *H. vulgare* L. and *L. bulbosum* L., *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 26, 179-184.
- CHUNG, G.H.; KIM, J.H. 1990. Production of interspecific hybrids between *Glicine max* and *G. tomentella* through embryo culture. *Euphytica*, 48, 97-101.
- DORSEY, J.M. 1919 a. A study of sterility in plums. *Genetics*, 4, 417-488
- DORSEY, J.M. 1919 b. Relation of weather to fruitfulness in the plum. *J. Agric. Res.*, 17, 103-126.
- DUMAS, C. 1974. Some aspects of stigmatic secretion in *Forysthia* sp. En: *Linskens H.F. ed. Fertilization in higher plants*. Elsevier, Nort Holland/Oxford. New York, pp. 119-126.
- DUMAS, C.; CLARKE, A.; KNOX, R.B. 1985. La fecundación de las flores. *Mundo Cientifico*, 5, 188-197.

Referencias bibliográficas

- DUMAS, C.; DUPLAN, J.C.; SAID, C; SOULIER, J.P. 1983. Nuclear magnetic resonance to correlate water content and pollen viability. En: Pollen biology and implication in plant breeding. D.L. Mulcahy y E. Ottaviano eds. pp. 15-20.
- DUMAS, C.; KNOX, R.B. 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. Theor. Appl. Genet. 67, 1-10.
- DYBING, C.D.; CHIASI, H.; PAECH, C. 1986. Biochemical characterization of soybean ovary growth from anthesis to abscission of aborting ovaries. Plant Physiol., 81, 1069-1074.
- EAST, M.; MANGELSDORF, A.J. 1925. A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 11, 166-171.
- EATON, G.W. 1959. A study of the megagametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting. Can. J. Plant. Sci., 39, 466-476.
- EATON, G.W.; JAMONT, A.M. 1964. Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. cv. Constant. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 86, 95-101.
- EGEA-CABALLERO, J.; BURGOS, L. 1991. Estudio comparativo de algunos portainjertos de almendro. ITEA. 87 V, 1, 36-40.
- ELLIS, M.F.; SEDGLEY, M.; GARDNER, J.A. 1991. Interspecific pollen-pistil interaction in *Eucalyptus* L' Hér. Myrtaceae. The effect of taxonomic distance. Ann. Bot., 68, 185-194.
- EMERSHAD, R.C.; RAMMING, D.W.; SERPE, M.D. 1989. In ovulo embryo development and plant formation from stenospermic genotypes of *Vitis vinifera*. Amer. J. Bot., 76, 3, 397-402.

Referencias bibliográficas

- ERREA, M.P. 1991. Compatibilidad de injertos en albaricoquero *P. armeniaca* L. Anatomía y bioquímica de uniones compatibles e incompatibles. Tesis Doctoral. Universidad de Navarra. 263 pp.
- ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants. John Wiley, and Sons, New York, 550 pp.
- FAROOK-LODHI, A. 1962. Comparative cytology of self-compatible and self-incompatible apricots. Tesis M. Sc. Univ. California, Davis.
- FELIPE, A.J. 1989. Patrones para albaricoquero, ciruelo y cerezo. Frutic. Prof., 30, 3-6.
- FELIPE, A.J. 1990. Patrones para Frutales de Hueso. Ediciones técnicas europeas. Barcelona. 181 pp.
- FELIPE, A.J. 1991. Patrones para albaricoquero y ciruelo. Curso sobre "Frutales de hueso y pepita: tecnología de la producción frutal". Cogullada, Noviembre. 1991.
- FENSTER, B.C.; SORK, L.V. 1988. Effect of crossing distance and male parent on in vivo pollen growth in *Chamaecrista fasciculata*. Amer.J. Bot., 75, 12, 1898-1903.
- FISHER, D.B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie, 16, 92-96.
- FOGLE, H. W. 1975. Cherries. En: Advances in Fruit Breeding. J. Janick and J.N. Moore eds. Purdue University Press. West Laffayette, Indiana. pp. 348-366.
- FREE, J.B. 1970. Insect pollination of crops. Academic Press, London, XI, 544 pp.
- FRIEND, H.A. 1989. Isozyme analisis for the identification of *Prunus* species and F_1 hybrids. Acta Hortic., 254. 243-248.

Referencias bibliográficas

- FURUKAWA, Y.; BUKOVAC, M. J. 1989. Embryo sac development in sour cherry during the pollination period as related to fruit set. HortScience, 24, 6, 1005-1008.
- GALLETTA, G.J. 1983. Pollen and seed management. En: Methods in Fruit Breeding. J.N. Moore and J. Janick eds. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana. pp. 23-47.
- GAUDE, T.; FUMES, B.; DUMAS, CH. 1983. Are lectin like compounds involved in stigma-pollen adhesion and/or recognition in Populus and Brassica?, En: Pollen biology and implications for Plant Breeding. D. Mulcahy y E. Ottaviano eds. Elsevier. pp. 265.
- GERACI, G.; TUSA, N. 1988. Calli and plants from Citrus limon Burm., cv. "Ferminello" ovules in vitro. Acta Hort., 227, 381-383.
- GERLACH, G. 1969. A rapid safranin-crystal violet-light green staining sequence for paraffin sections of plant materials. Stain Technol., 44, 210-211.
- GMITTER, F.G.; LING, X. 1991. Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from a developed citrus ovules treated with colchicine. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1162, 317-321.
- GOLDBERG, R.B.; BARKER, S.J.; PEREZ-GRAU, L. 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. Cell, 56, 149-160.
- GRADZIEL, T.M.; ROBINSON, R.W. 1989. Solanum lycopersicoides gene introgression to tomato, Lycopersicon esculentum, through the systematic avoidance and suppression of breeding barriers. Sex. Plant. Reprod., 2, 43-52.
- GRADZIEL, T.M.; ROBINSON, R.W. 1991. Overcoming unilateral barriers between Lycopersicon peruvianum and cultivated tomato, Lycopersicon esculentum. Euphytica, 54, 1-9.

Referencias bibliográficas

- GRASSELLY, CH.; DAMAVANDY, H.I. 1974. Etude des possibilités de production d'hybrides F1 intra et interespecificques chez le sous-genre Amygdalus, II. Combinaisons reciproques: P.persica et P. amygdalus. Ann.Amélior Plant., 24, 4, 405-414.
- GRASSELLY, CH.; OLIVIER, G. 1987. Les hybrides myrobolan x amandiers: nouveaux porte-greffes possibles pour l'amandier. VII Colloque GREMPA Rap.EUR 11557, 99-109.
- GRASSELLY, CH.; OLIVIER, G. 1988. Possibilités d'amélioration des porte-greffes de l'amandier par hybridation interspecificque. VIII Coloquio GREMPA, IAMZ, pp. 47-49.
- GRAY, J.E.; MECLURE, B.A.; BONIG, I.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, A.E. 1990. Action of the style product of the self-incompatibility gene of Nicotiana glauca S-RNase on in vitro-growth pollen tubes. Plant Cell., 3, 271-283.
- GRITTON, E.T.; WIERZBICKA, B. 1975. An embryological study of Pisum sativum x Vicia faba cross. Euphytica, 24, 277-284.
- GROSSER, J.W.; GMITTER, F.G.; CHANDLER, J.C. 1988. Intergeneric somatic hybrid plants from sexually incompatible woody species: Citrus sinensis and Severinia disticha. Theor. Appl. Genet., 75, 3, 397-401.
- GUERRIERO, R.; AUDERGON, J.M.; MARTINEZ-CUTILLAS, A. 1988. Apricot for mediterranean. Acta Hort., 209.
- HARING, V.; GRAY, J.E.; McCLURE, B.A.; ANDERSON, M.A.; CLARKE, A.E. 1990. Self-incompatibility: a self recognition system in plants. Science, 250, 937-941.
- HARROLD, T.J. 1935. Comparative study of the developing and aborting fruits of Prunus persica. Bot. Gaz., 96, 505-520.

Referencias bibliográficas

- HARTMAN, F.O.; HOWLETT, F.S. 1954. Fruit setting of the Delicious apple as affected by cytological within the flowers and young fruits. Res. Bull. Ohio. Agr. Exp. Sta., 745, 64 pp.
- HAUPT, A.W. 1930. A gelatin fixative for paraffin sections. Stain Technol., 5, 97-98.
- HAWKER, J.S.; BUTTROSE, M.S. 1980. Development of the almond nut. Ann. Bot., 46, 313-321.
- HAWKES, J.G.; JACKSON, M.T. 1992. Taxonomic and evolutionary implications of the endosperm balance number hypothesis in potatoes. Theor. Appl. Genet., 84, 180-185.
- HERMSEN, J.G.T. 1977. General considerations on interspecific hybridization in plant breeding. En: Interspecific hybridization in plant breeding. Proc. 8th Eucarpia Congress. Madrid. Spain. 299-304.
- HERR, J.M. 1971. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms. Amer. J. Bot., 58, 8, 785-790.
- HERR, J.M. 1972. Applications of a new clearing technique for the investigation of vascular plant morphology. J. Mitchell Soc. Fall. 137-143.
- HERR, J.M. 1982. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a half type clearing fluids. Stain Technol., 57, 3, 161-169.
- HERR, J.M. 1992. Recent advances in clearing techniques for study of ovule and female gametophyte development. En: Angiosperm pollen and ovules. E. Ottaviano, D.L. Mulcahy, Sari Gorla, G.B. Mulcahy. Eds. Springer-Verlag. 149-154.
- HERRERO, J. 1969. Patrones de otras especies de hueso albaricoquero, I Jornadas C.I.D.A.E. Aula Dei, 26-28 Marzo 1969. pp. 2-14.

Referencias bibliográficas

- HERRERO, M. 1992 a. From pollination to fertilization in fruit trees, Plant Growth Regul., 11, 27-32.
- HERRERO, M. 1992 b. Mechanisms in the pistil that regulate gametophyte population in peach (*Prunus persica*). En: Angiosperm pollen and ovules. E. Ottaviano, D.L. Mulcahy, Sari Gorla, G.B. Mulcahy. Eds. Springer-Verlag. 377-381.
- HERRERO, M.; ARBELOA, A. 1989. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). Amer. J. Bot., 76, 10, 1441-1447.
- HERRERO, M.; ARBELOA, A.; GASCON, M. 1988. Pollen pistil interaction in the ovary in fruit trees. En: Sexual Reproduction in Higher Plants. M. Cresti, P. Gori, E. Pacini. Eds. Springer Verlag. 297-302.
- HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. 1979. Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*, changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. J. Cell Sci., 36, 1-18.
- HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. 1980. Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Petunia hybrida*, Planta, 148, 217-221.
- HERRERO, M.; DICKINSON, H.G. 1981. Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. J. Cell. Sci., 47, 365-383.
- HERRERO, M.; GASCON, M. 1987. Prolongation of embryo sac viability in pear (*Pyrus communis*) following pollination or treatment with gibberellic acid. Ann. Bot., 60, 3, 287-294.
- HESLOP-HARRISON, J. 1975. Incompatibility and the pollen-stigma interaction. Annu. Rev. Plant Physiol, 26, 403-425.

Referencias bibliográficas

- HESLOP-HARRISON, J. 1978. Recognition and response in the pollen-stigma interaction. S.E.B. Symp., 32, 121-138.
- HESLOP-HARRISON, J. 1987. Pollen germination and pollen tube growth. En: Pollen: Cytology and Development. K.L. Giles and J. Prakash. eds. International Review of Cytology, 107, 1-78.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technol., 45, 3, 15-120.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. 1975. Enzymic removal of the proteinaceous pellicle of the stigma papilla prevents pollen tube entry in the Caryophyllaceae. Ann. Bot., 39, 163-165.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; KNOX, R.B.; HOWLETT, B. 1973. Pollen-wall proteins: "gametophytic" and "sporophytic" fractions in pollen walls of Malvaceae. Ann. Bot., 37, 402-412.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. 1984. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. Theor. Appl. Genet., 67, 367-375.
- HESLOP-HARRISON, J.; KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, Y.; MATTSON, O. 1975. Pollen-wall proteins: emission and role in incompatibility responses. Biol. J. Linn. Soc. 7, Suppl.1, 189-202.
- HESLOP-HARRISON, Y. 1977. The pollen-stigma interaction: pollen-tube penetration in crocus. Ann. Bot., 41, 913-922.

Referencias bibliográficas

- HESLOP-HARRISON, Y.; HESLOP-HARRISON, J. 1981. The digestive glands of Pinguicula: structure and cytochemistry. Ann. Bot., 47, 293-319.
- HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. Ann. Bot., 41, 1233-1258.
- HESLOP-HARRISON, J. HESLOP-HARRISON, Y. RIEGER, B.J. 1985. The pollen-stigma interaction in the grasses. Pollen tube guidance and the regulation of tube number in Zea mays. L. Acta Bot. Neerl., 34, 193-211.
- HESSE, C. O. 1975. Peaches En: Advances in Fruit Breeding. En: J. Janick and J.M. Moore Eds. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. pp. 285-335.
- HOGENBOOM, N. G. 1972. Breaking breeding barriers in Lycopersicon. 4. Breakdown of unilateral incompatibility between L. peruvianum L. Mill. and L. esculentum Mill. Euphytica, 21, 397-404.
- HOGENBOOM, N. G. 1973. A model for incongruity in intimate partner relationships. Euphytica, 22, 219-233.
- HOGENBOOM, N. G. 1975. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non functioning of intimate partner relationships. Proc. Royal. Soc. London, Ser. B. 188, 361-375.
- HOGENBOOM, N. G. 1983. Incongruity: non functioning of intercellular and intracellular partner relationships through non matching information. En: Cellular interactions. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. J. Heslop-Harrison.
- HORMAZA, J.I.; HERRERO, M. 1992. Pollen selection. Theor. Appl. Genet., 83, 663-672.

Referencias bibliográficas

- HOSSAIN, M. M.; INDEN, H.; ASAHIRA, T. 1990. In vitro ovule culture of intergeneric hybrids between *Brassica oleracea* and *Raphanus sativus*. *Scientia Hort.*, 41, 181-188.
- HUGHES, J.; McCULLY, M.E. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technol.*, 50, 319.
- ISHIDA, B.K. 1991. Developmental regulation is altered in the calyx during in vitro culture of tomato. *Plant Cell*, 3, 219-223.
- IWANAGA, M.; FREYRE, R.; WATANABE, K.J.P. 1991. Breaking the crossability barriers between disomic tetraploid *S. acaule* and tetrasomic tetraploid *S. tuberosum*. *Euphytica*, 52, 183-191.
- JACKSON, D.I.; COOMBE, B.G. 1966. The growth of apricot fruit I. Morphological changes during development and the effects of various tree factors. *Aust. J. Agric. Res.*, 17, 465-477.
- JANICK, J.; MOORE, J.M. 1975. *Advances in Fruit Breeding*. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. 623 pp.
- JEANNINN, G.; HAHNE, G. 1991. Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants from somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breed.*, 107, 280-287.
- JEFFERIES, C.J. 1975. *Floral biology and Fruit development in the European plum*. Ph.D. Univ. of Bristol, Research St. Long. Asthon. 114 pp.
- JEFFERIES, C.J.; BELCHER, A.R. 1974. A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Technol.*, 49, 199-202.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry*, W.H. Freeman. San Francisco. VII + 408 pp.

Referencias bibliográficas

- JENSEN, W. A. 1973. Fertilization in flowering plants. *BioScience*, 23, 21-27.
- JENSEN, W. A.; ASHTON, N. E.; BEASLEY, C. A. 1983. Pollen tube embryo sac interaction in cotton. En: D.L. Mulcahy and E. Ottaviano, eds. *Pollen Biology and Implications for Plant Breeding*, pp. 67-72. New York: Elsevier Biomedical.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant microtechnique*, Mc Graw-Hill. New York.
- JOHANSON, E.L.; SMITH, B.W. 1956. *Arachis hypogea* x *A. diogeni* embryo and seed failure. *Amer. J. Bot.*, 43, 250-258.
- JOHNSTON, S.A.; DEN NIJS, T.P.M.; PELOQUIN, S.J.; HANNEMAN, JR. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theor. Appl. Genet.*, 57, 5-9.
- JOHRI, B.M.; RAO, P.S. 1984. *Experimental embryology* En: Johri B.M. eds. *Embriology in angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 735-802.
- JOSHI, P.C.; JOHRI, B.M. 1972. In vitro growth of ovules of *Gossypium hirsutum*. *Phytomorphology*, 22, 195-209.
- JONES, R. W. 1969. Selection of intercompatible almond and root-knot nematode resistant peach rootstocks as parents for production of hybrid rootstock seed. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 94, 89-91.
- KANEKO, T.; TERACHI, T.; TSUMEWAKI, K. 1986. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. *Jap. J. Genet.*, 61, 157-168.
- KESTER, D.E. 1970. Transfer of self-fertility from peach (*Prunus persica* L.) to almond (*Prunus amygdalus* Batsch) West Sec. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, Berkeley (Abstract).

- KESTER, D. E. ASAY, R. 1975. Almonds. En: Advances in Fruit Breeding. J. Janick and J.N. Moore eds. Purdue University Press. West Lafayette, Indiana. pp. 285-335.
- KESTER, D. E.; ASAY, R. N. 1986. Hansen '2168' and Hansen '5362' two new Prunus rootstock clones. HortScience, 21, 12, 331-332.
- KESTER, D. E.; HANSEN, C. J. 1966. Rootstock potentialities of F₁ hybrids between peach (*P. persica* L.) and almond (*P. amygdalus* Batsch.). Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 89, 100-109.
- KESTER, D.E.; GRASSELLY, CH. 1983. Almond rootstocks. En: Rootstocks for fruit crops. Rom, R.C. y Carlson, E.F. Eds. John Wiley and Sons, New York: 265-293.
- KESTER, D.E.; GRIGGS, W.H. 1959. Fruit setting in the almond: the pattern of flower and fruit drop. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 74, 214-219.
- KHO, Y.O.; BAER, J. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. Euphytica, 17, 298-302.
- KIN, M.S.; FRASER, L.G.; HARVEY, C.F. 1990a. Rescue of hybrids of Actinidia species. Scientia Hort., 44, 97-106.
- KIN, M.S.; FRASER, L.G.; HARVEY, C.F. 1990b. Initiation of callus and regeneration of plantlets from endosperm of Actinidia interspecific hybrids. Scientia Hort., 44, 107-117.
- KNIGHT, R.L. 1969. Abstract bibliography of fruit breeding and genetics to 1965. Prunus, Commonwealth bureau of horticulture and plantation crops. Tech. comm., 31, 649 pp.
- KNOX., R.B. 1984. Pollen-pistil interactions. En: H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison. eds. Cellular Interactions. Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series. Vol 17, pp. 508-608. Springer-Verlag, Berlin.

- KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, J. 1969. Cytochemical localisation of enzymes in the wall of the pollen grain, Nature, 223, 92-94.
- KNOX, R.B.; WILLIAMS, E.G.; DUMAS, C. 1986. Pollen, pistil and reproductive function in crop plants. Plant Breed, Revi., 4, 9-79.
- KNOX, R.B.; WILLING, R.R.; ASHFORD, A.E. 1972. Role of pollen wall proteins as recognition substances in Interspecific Incompatibility in Poplars. Nature, 237, 5355, 381-383.
- KORBAN, S.S. 1986. Interspecific hibridation in Malus. HortScience, 21, 1, 41-47.
- KRANZ, E.; LORZ, H. 1992. In vitro fertilization with isolated gametes of maize and its applications to study fertilization process and early events of zygote development. En: Angiosperm pollen and ovules. E.Ottaviano, D.L. Mulcahy, M.Sari Gorla. G. Bergamini. eds. Springer Berlag. 298-302.
- KUBOYAMA, T.; SHINTAKU, Y.; TAKEDA, G. 1991. Hybrid plant of Phaseolus vulgaris L. and P. lunatus L. obtained by means of embryo rescue and confirmed by restriction endonuclease analysis of cDNA. Euphytica, 54, 177-182.
- KURSAKOV, G.A.; DUBOVITSKAYA, L. A. 1971. A study of embryogenesis in interspecific crosses in the genus Prunus Mill. Tr.Tsentr. Genet. Labor. I.V. Michurina, 12, 145-156. P.B.A.(14) Vol.47 Abst. 4628.
- KURSAKOV, G.A.; SEDYSHEVA, L. A. 1975. Growth of the pollen tubes in crosses of plum species differing in chromosome number. Tr.Tsentr. Genet. Labor. I.V. Michurina, 22, 43-47. P.B.A. (14). Vol 47. Abst. 9782.
- KYOTANI, H.; YOSHIDA, M. 1988. Breeding of plum-mume parental lines 'PM-1-1' and 'PM-1-4'. Interspecific hybrids of japanese plum and mume. P. salicina and P. mume.

- Bull. Fruit Tree Res. Sta. A. 15, 1-10.
- LAYNE, R. E. 1983. Hybridization. En: Methods in Fruit Breeding. J.N. Moore and J. Janick eds. Purdue Univ. Press, West. Lafayette, Indiana. 23-47.
- LAYNE, R. E. C.; SHERMAN, W. B. 1986. Interspecific hybridization of *Prunus*. HortScience, 21, 1, 48-51.
- LEDUC, N.; DOUGLAS, G. C.; MONNIER, M.; CONNDLY, V. 1990. Pollination in vitro: effects on the growth of pollen tubes, seed set and gametophytic self-incompatibility in *Trifolium pratense* and *T. repens* L. Theor. Appl. Genet., 80, 657-664.
- LESHEM, B.; GILBOA, N.; IZHAR, S.; FRANKEL, R. 1990. Acquired tolerance to exogenous cytokinin during the maturation of tomato embryos. J. Plant Physiol., 136, 122-125.
- LEVIEIL, C.; HUYGHE, CH. 1985. Cytologie végétale. C.R. Acad. Sci. Paris. 301. Sér. III, n 7. pp.
- LEWIS, D. 1942. The physiology of incompatibility in plants: I. The effect of temperature. Proc. Roy. Soc. Ser. B, 131, 13-26.
- LEWIS, D. 1949 a. Incompatibility of flowering plants. Biol. Rev., 24, 472-496.
- LEWIS, D. 1949 b. Structure of the incompatibility gene. II. Induced mutacion rate. Heredity, 3, 339-355.
- LEWIS, D. 1960. Genetic control of specifity and activity of the S antigen in plants, Proc. Roy. Soc. Ser. B, 151, 468-477.
- LEWIS, D. 1979. Sexual incompatibility in plants. Eduawrd Arnold, ed. Institute of Biology.

- Studies in Biology, n 110. 59 pp.
- LEWIS, D.; CROWE, L.K. 1958. Unilateral incompatibility in flowering plants. Heredity, 12, 233-256.
- LILIEN-KIPNIS, H.; LAVEE, S. 1971. Anatomical changes during the development of 'Ventura' peach fruits. J. Hort. Sci., 46, 103-110.
- LINSKENS, H.F. 1974. Fertilization in higher plants. Elsevier, Nort Holland/Oxford. New York. XIV+373 pp.
- LINSKENS, H.F. 1976. Pollen, Encycl. Plant. Physiol., 18, 368-406.
- LINSKENS, H.F.; ESSER, K.L. 1957. Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. Dic. Naturwissenschaften, 44, Jahrgang.
- LIU, CH.; SHUN, J.; LIU, J. 1992. In vitro interspecific fertilization, embryo development and formation of hybrid seedlings between *Gossypium hirsutum* and *G. arboreum*, Euphytica, 60, 79-88.
- LORENZI, R.; BENCINI, A.; CIONINI, P.G.; ALPI, A.; D'AMATO, F. 1978. Embryo suspensor relations in *Phaseolus coccineus*: cytokinis during seed development. Planta, 143, 59-62.
- LUZA, J.G.; POLITO, V.S.; WEINBAUN, S.A. 1987. Staminate bloom date and temperature responses of pollen germination and tube growth in two walnut *Juglans* species. Amer. J. Bot., 74, 12, 1898-1903.
- LLOYD, D.G. 1980. Sexual strategies in plants I. An hypothesis of serial adjusment of maternal investment during one reproductive sesion. New Phytol., 86, 69-79.

- MANSHARDT, R.M.; WENSLAFF, T.F. 1989a. Interspecific hybridization of papaya with other *Carica* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114, 4, 689-694.
- MANSHARDT, R.M.; WENSLAFF, T.F. 1989b. Zygotic polyembryony in interspecific hybrids of *Carica papaya* and *C. cauliflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 114, 4, 684-689.
- MARTIN, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34, 125-128.
- M.A.P.A. 1989. Manual de Estadística Agraria.
- MARTIN, F.W. 1961. The inheritance of self-incompatibility in hybrids of *Lycopersicon esculentum* Mill. x *L. chinensi* Dun. *Genetics*, 46, 1443-1454.
- MARTIN, F.W. 1968. The behavior of *Lycopersicon* incompatibility alleles in an alien genetic milieu. *Genetics*, 60, 101-109.
- MARTINEZ-TELLEZ, J; CROSSA-RAYNAUD, P. 1982. Contribution à l'étude du processus de la fécondation chez trois espèces de *Prunus*. *Agronomie*, 2, 4, 333-340.
- MARULL, J. 1992. Evaluación de resistencia en Patrones de almendro, *Prunus dulcis* (Mill). D.A. Webb, melocotonero, *Prunus persica* (L.) Batsch e híbridos de melocotonero x almendro, frente a *Meloidogyne* y *Pratylenchus*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 179 pp.
- MASCARENHAS, J. P. 1975. The biochemistry of the angiosperm pollen development. *Bot. Rev.*, 41, 259-314.
- MAHESHWARI, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. Mc Grawhill, N.Y. 453 pp.

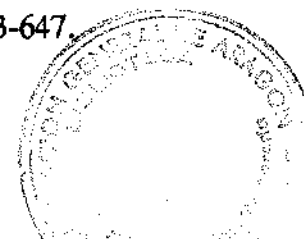
- MAHESHWARI, P. 1966. The embryology of angiosperms. A retrospect and prospect. En: E.Cutter eds. *Trends in Plants Morphogenesis*. Wiley, New York.
- MATHIAS, R.; ESPINOSA, S.; ROBBELEN, G. 1990. A new embryo rescue procedure for interspecific hybridization. *Plant Breed.*, 104, 258-261.
- MATTSON, O.; KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, J. HESLOP-HARRISON, Y. 1974. Protein pellicle of stigmatic papillae as a probable recognition site in incompatibility reactions. *Nature*, 247, 298-300.
- MAU, S.L.; WILLIAMS, E.G.; ATKINSON, A.; ANDERSON, M.A.; CORNISH, E.C.; GREGO, B.; SIPMSON, S.J.; KHEYR-POUR, A.; CLARKE, A.E. 1986. Style proteins of a wild potato *Lycopersicon peruvianum* associated with expression of self-incompatibility. *Planta*, 169, 2, 184-191.
- MEHLENBACHER, S. A. 1986. Rooting of interspecific peach hybrids by semihardwood cuttings. *HortScience*, 21, 6, 1374-1377.
- MEHLENBACHER, S. A.; COCIU, V.; HOUGH, L.F. 1990. Apricots. *Prunus armeniaca*. Interspecific hybridization. *Acta Hort.*, 290, 90-93.
- MICHURIN, V. 1948. *Sochineniia*: Vol I. Printsipy i metody. Ogiz Moscow.
- MOGENSEN, H.L. 1973. Some histochemical, ultrastructural, and nutritional aspects of the ovule of *Quercus gambelii*. *Amer. J. Bot.* 60, 1, 48-54.
- MOGENSEN, H.L. 1975. Ovule abortion in *Quercus* Fagaceae. *Amer. J. Bot.*, 62, 2, 160-165.
- MOGENSEN, H.L. 1981. Translocation of uranin within the living ovules of selected species. *Amer. J. Bot.*, 68, 2, 195-199.

- MOINDRA, V.; MINOCHA, J.L. 1991. Pollen pistil interactions and interspecific incompatibility in *Pennisetum*. *Euphytica*, 56, 1-5.
- MOL, R.; MATTHYS-ROCHON, E.; DUMAS, CH. 1993. In vitro culture of fertilized embryo sacs of maize: zygotes and two-celled proembryos can develop into plants. *Planta*, 189, 213-217.
- MORENO, M.A. 1991. Selección del patrón Pollizo de Murcia a partir de una población de semilla. *An. Estac. Exp. Aula Dei*. 20 (3-4), 51-56
- MOWREY, B.D.; WERNER, D.J.; BYRNE, D.H. 1989. Inheritance of isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase in peach and peach almond hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115, 2, 313-319.
- MOWREY, B.D.; WERNER, D.J. 1990. Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 129-133.
- MULCAHY, D. L.; MULCAHY, G. B. 1987. The effects of pollen competition. *Amer. Sci.*, 75, 44-50.
- MULCAHY, G. B.; MULCAHY, D. L. 1983. A comparison of pollen tube growth in bi- and trinucleate pollen. En: *Pollen: biology and implications in plant breeding*. Mulcahy, D.L. y E. Ottaviano eds. Ed. Elsevier. pp. 29-33.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 3, 473-497.
- MURRAY, D.R. 1988. Nutrition of the angiosperm embryo. Research Studies Press LTD. J. Wiley & Sons Inc. 237 pp.
- MUSACCHI, S. 1992. 'Plumcot', nuovo frutto ibrido tra susino ed albicocco. *Frutticoltura*, 10,

- 35-38.
- NATESH, S.; RAU, M.A. 1984 The embryo. En: *Embriology of angiosperm*. B.M. Johri eds. Springer-Verlag, Berlin, pp. 273-317.
- NETTANCOURT, D. de, 1977. Incompatibility in angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics, 3. Springer-Verlag, Berlin. 222 pp.
- NETTANCOURT, D. de; DEVREUX, M.; BOZZINI, A.; CRESTI, M.; PACINI, E.; SARFATTI, G. 1973. Ultrastructural aspects of self-incompatibility mechanism in *Lycopersicon peruvianum*. *Moll. J. Cell. Sci.*, 12, 403-419.
- NETTANCOURT, D. de; DEVREUX, M.; BOZZINI, A.; CRESTI, M.; PACINI, E.; SARFATTI, G. 1974. Genetical and ultrastructural aspects of self, and cross-incompatibility in interspecific hybrids between self-compatible *Lycopersicon esculentum* and self-incompatible *L. peruvianum*. *Theor. Appl. Genet.*, 44, 278-288.
- NEWCOMB, W. 1973. The development of embryo sac in sunflower *Helianthus annuus* after fertilization. *Can. J. Bot.*, 51, 879-890.
- NIHIYAMA, I.; SARASHIMA, M.; MATSUZAWA, Y. 1991. Critical discussion on abortive interspecific crosses in Brassica. *Plant Breed.*, 107, 288-302.
- OCHATT, E.C.; COCKING, E.C.; POWER, J.B. 1987. Isolation, culture and plant regeneration of Colt cherry (*P. avium* x *pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Sci.*, 50, 139-143.
- OCHATT, E.L.; POWER, J.B. 1988. An alternative approach to plant regeneration from protoplasts of sour cherry *Prunus cerasus* L. *Plant Sci.*, 56, 75-79.

- OCHATT, S.J.; PATAT-OCHATT, E.M.; DAVEY, M.R.; POWER, J.B. 1989. Somatic hybridization of sexually incompatible top-fruit tree rootstocks, wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*). *Theor. Appl. Genet.*, 78, 35-41.
- OLSON, A.R. 1981. Embryo and endosperm development in ovules of *Papaver nudicaule* after in vitro placental pollination. *Can. J. Bot.*, 59, 1738.
- OZIAS-AKINS, P.; SINGSIT, G.; BRANCH, D.W. 1992. Interspecific hibrid inviability in crosses of *Arachis hypogea* x *A. stenosperma* can be overcome by in vitro embryo maturation or somatic embryogenesis. *J. Plant. Physiol.*, 140, 207-212.
- PALSER, B.F.; ROUSE, J.L.; WILLIAMS, E.G. 1992. Techniques for clearing ovules for studies of megagametophyte and early postfertilization development in *Rhododendron*. *Biotechnic Histochem.*, 67, 4, 207-218.
- PANDEY, K.K. 1958. Time of the S allele action. *Nature*, 181, 1220-1221.
- PANDEY, K.K. 1960. Evolution of gametophytic and sporophytic systems of self-incompatibility in Angiosperms. *Evolution*, 14, 98-115.
- PANDEY, K.K. 1962. Interspecific incompatibility in *Solanum* species. *Amer. J. Bot.* 49: 874-882.
- PANDEY, K.K. 1968 Colchicine-induced changes in the self-incompatibility behaviour of *Nicotiana*. *Genetica*, 39, 257-271.
- PANDEY, K.K. 1969. Elements of the S-gene complex. V. Interspecific cross-compatibility relationships and the theory of evolution of the S-complex. *Genetica*. 40, 447-474.
- PANDEY, K.K. 1970. Time and site of the S gene action, breeding systems and relationships

- in incompatibility. *Euphytica*, 19, 364-372.
- PARFITT, D. E.; GANESHAN, S. 1989. Comparison of procedures for stimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience*, 24, 2, 354-356.
- PARMAR, C.; SHARMA, A.K. 1992. 'Chulli', a wild apricot from Himalayan cold desert region. *Fruit Var. J.*, 46, 1, 35-36.
- PECHOUTRE, F. 1902. Contributions à l'etude du development de l'ovule et de la graine des Rosacées. *Ann. Sci. Natur. Ser.B.* 16, 60-87.
- PEREZ, S.; MOORE J. N. 1985. Prezygotic endogenous barriers to interspecific hybridization in *Prunus* J. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110, 2, 267-273.
- PICKERSGILL, B. 1980. Some aspects of interspecific hybridization in *Capsicum*. IV Eucarpia Meeting *Capsicum Working Group*, 14-16 Oct. 1980. Wageningen, The Netherlands. 1-5.
- PICKERSGILL, B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. En Tsuchiya T. y Gupta, P.K. Eds. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics Breeding. Evolution. Part B.* Elsevier. 139-160.
- PIMIENTA, E.; POLITO, V.S. 1982. Ovule abortion in Nonpareil (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) *Amer. J. Bot.*, 69, 6, 913-920.
- PIMIENTA, E.; POLITO, V.S. 1983. Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) as affected by cross-, self- and non-pollination. *Ann. Bot.*, 51, 469-479.
- PIMIENTA, E.; POLITO, V.S.; KESTER, D.E. 1983. Pollen tube growth in cross- and self-pollinated 'Nonpareil' almond. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 180, 4, 643-647.



Referencias bibliográficas

- PINOCHET, J.; MARULL, J.; FELIPE, A.J. 1990. Respuesta de patrones de melocotonero, ciruelo y cerezo de reciente introducción en España a *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*, 22, 99-102.
- PINTO, A.C.Q.; BYRNE, D.H.; ROGERS, S.M.D. 1990. Influence of in vitro conditions on growth of immature embryos of peach (*P. persica* (L.) Batsch). *HortScience*, 25, 9, 1098.
- PINTO, A.C.Q.; ROGERS, S.M.D.; BYRNE, D.H. 1991. Ovule perforation: A new technique to increase growth of immature peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) embryos in vitro. *HortScience*, 26, 6, 109.
- PISANI, P. L.; ROSELLI, G. 1983. Interspecific hybridization of *P. persica* x *P. davidiana* to obtain a new peach rootstock. *Genet. Agrar.* 37, 1/2, 197-198.
- PUERTA-ROMERO, J. 1984. Importancia económica de la producción frutal. 1º Congreso internacional de fruta dulce, Tomo I. Ponencias y comunicaciones. Lerida, 1984.
- RAGHAVAN, V. 1976. Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic press. London. 232 pp.
- RAGHAVAN, V. 1977a. Applied aspects of embryo culture. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj eds. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, New York. pp. 375-397.
- RAGHAVAN, V. 1977b. Diets, culture media and food supplements, En: CRC Handbook Series in Nutrition and Food CM Rechigl, Jr. Ed. Section G: Vol.IV, CRC Press, Cleveland. pp. 361-413.
- RAGHAVAN, V. 1986. Embryogenesis in angiosperm. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 303 pp.

Referencias bibliográficas

- RAGHAVAN, V.; SRIVASTAVA, P.S. 1982. Embryo culture. En: B. M. Johri eds. Experimental embryology of vascular plants. Springer-Verlag, New York. pp. 195-230.
- RALLO, L.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. 1985. Influence of cultivar and flower thinning within the inflorescence on competition among olive fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110, 2, 303-308.
- RALLO, L.; MARTIN, G.C.; LAVEE, S. 1981. Relationship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106, 6, 813-817.
- RAMMING, D. W. 1976. Crossability morphological characteristics and frequency of chiasmata of diploid prunus, apricots, and their hybrids. Thesis, Rutgers University, U.S.A. 74 pp.
- RAMMING, D.W. 1982. In ovule embryo culture of immature *P. persica* (L.) embryos. *HortScience*, 17, 3,2, 531.
- RAMMING, D. W. 1985. In ovule embryo culture of early maturing *Prunus*. *HortScience*, 20, 3, 419-420.
- RAMMING, D. W. 1986 Embryo rescue techniques in nectarine and peach breeding. *N. Z. Agronomy Society. Sp publication.* 5, 371-374.
- RAMMING, D.W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience*, 25, 4, 393.
- RAMMING, D. W.; EMERSHAD, R. L. 1990. Embryo culture of early ripening seeded grape *Vitis vinifera* (L.) genotypes. *HortScience*, 25, 3, 339-342.
- RAMMING, D. W.; TANNER, O. 1983. 'Nemared' peach rootstock. *HortScience*, 18, 3, 376.
- RAMMING, D. W.; TANNER, O. 1987. 'Mayfire' nectarine by embryo culture. *Fruit Var. J.*, 41, 2, 80-81.

Referencias bibliográficas

- RAMSAY, G.; PICKERSGILL, B. 1986. Interspecific hybridization between *Vicia faba* and other species of *Vicia*: approaches to delaying embryo abortion. *Biol. Zentralbl.*, 105, 171-179.
- RANGAN, T. S. 1982. Ovary, ovule and nucellus culture. En: B.M. Johri ed., *Experimental embryology of vascular plants*. Springer-Verlag, New York. pp. 105-129.
- RANGAN, T. S. 1984. Culture of ovules, En: I.K. Vasil ed. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol 1. Academic Press, London. pp. 227-231.
- RANGLAND, C. H. 1934. The development of the peach fruit with special reference to split pit and gumming. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 31, 1-21.
- REDHER, A. 1940. *Manual of cultivated trees and shrubs* 1ª ed. Byosistematics, Floristic y Philogeny Series. Vol. 1. Ed. Theodores R. Dudley. Ph D.
- REDHER, A. 1990. *Manual of cultivated trees and shrubs*. Byosistematics, Floristic y Philogeny Series. Vol. 1. Ed. Theodores R. Dudley. Ph D.
- RENAUD, R.; BERNHARD, R.; GRASSELLY, CH.; DOSBA, F. 1988. Diploid plum x peach hybrid rootstocks for stone fruit trees. *HortScience* 23, 1, 115-116.
- REYNDERS, S.; SALETTES, G. 1990. Study of the genetic relationships within the subgenus *Prunophora*. Restriction maps of the ribosomal genes in *P. cerasifera* and *P. spinosa*. *Acta Hort.*, 283. 16-25.
- RICHARDSON, E.A.; SEELEY, S.D.; WALKER, D.R.; ANDERSON, J.L.; ASHROFT, G.L. 1975. Pheno-climatography of spring peach bud development. *HortScience*, 10, 3, 236-237.

Referencias bibliográficas

- RIEGER, R.; MICHAELIN, A.; GREEN, M.M. 1976. *Glossary of genetics and cytogenetics*. Springer-Verlag, Berlin. 100 pp.
- ROBERTS, I.N.; DICKINSON, H.G. 1981. Intraspecific incompatibility on the stigma of *Brassica*. *Phytomorphology*, 31, 314, 165-174.
- ROBERTS, D.R.; SUTTON, C.S.; FLINM, B.S. 1989. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. B.*, 68, 5, 1086-1087.
- RODRIGUEZ NAVARRO, J. 1983. Observaciones de comportamiento de los distintos híbridos almendro x melocotonero. selecciones nacionales y GF-677 como patrones de melocotonero y Mariana 26-24 como patron de ciruelo. 5ª Jornadas de Horticultura. Zaragoza, Mayo, 1983.
- ROSEN, W.G. 1964. Chemotropism and fine structure of pollen tubes. En: *Pollen physiology and fertilization*. H.F. Linkens, eds. North Holland Publ. Co. Amsterdam, pp. 159-166.
- ROSEN, W.G. 1971. Pollen-pistil interactions in *Lillium*. En: Heslop-Harrison J. eds. *Pollen: Development and physiology*. Butterworths, London, pp. 239-254.
- ROY, B. 1938. Studies on pollen tube growth in *Prunus*. *J. Pomol Hort. Sci.*, 16, 320-328.
- RUBIO, M.J.; SOCIAS i COMPANY, R.; RAMMING, D.W.; EMERSHAD, R. 1991. Cultivo de óvulos en diferentes clones del género *Prunus*. L. IX Reunión Nacional de Fisiología Vegetal. II Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal. Madrid. 1991. 205 pp.
- SABJA, A.M.; MOK, D.W.S.; MOCK, M.C. 1990. Seed and embryo growth in pod cultures of *Phaseolus vulgaris* x *P. acitifolius*. *HortScience*, 25, 10, 1288-1291.

Referencias bibliográficas

- SALESSES, G. 1968. Note sur un Pecher x Amandier tetraploide obtenu par traitement à la colchicine. *Ann. Amélior. Plant.* 18, 3, 303-306.
- SALESSES, G. 1973. Etudes cytologiques chez les *Prunus*. Hybrides interspécifiques *P. cerasifera*, *P. spinosa*, *P. domestica*, *P. insititia*. *Ann. Amélior. Plant.* 23, 2, 145-161.
- SALESSES, G. 1977a. Recherche sur l'origine de deux pruniers porte-greffes, hybrides interspécifiques naturels. *Ann. Amélior. Plant.* 27, 2, 235-243.
- SALESSES, G. 1977b. Interspecific breeding and cytology in *Prunus* species, What can be expected?. Interspecific hybridization in plant Breeding 8th Eucarpia Congress, Madrid. 389-395.
- SALESSES, G. 1981. Hybridation interspécifique et cytologie chez les pruniers. 1^o colloque sur les Recherches fruitières. Bourdeaux, INRA. 120-128.
- SALESSES, G.; RENAUD, R. ; BONNET, A. 1988. Creation of plum rootstocks for Peach and Plum by interspecific hybridization. *Acta Hort.* 224, 339-343.
- SAMIMY, C. 1991. Barrier to interspecific crossing of *Fagopyrum esculentum* with *Fagopyrum tataricum*: I. Site of pollen-tube arrest. II. Organogenesis from immature embryos of *F. tataricum*. *Euphytica*, 54, 215-219.
- SAS Institute. Inc. 1988. SAS/STAT User's guide, Release 6.03 Ed., Cary, N.C. 1028pp.
- SCRIBAILO, R.W.; BARRETT, S.C.H. 1991. Pollen-pistil interactions in tristylous *Pontederia sagittata* Pontederiaceae. II. Patterns of pollen tube growth. *Amer. J. B.*, 78, 12, 1662-1682.
- SCHMIDT, H. 1972. Problems in interspecific hybridization and selection of dwarf rootstocks in cherries. *Atti cd Convegno del Ciliegio*, Verona, Italy, 65-74.

Referencias bibliográficas

- SCHMIDT, H.; GRUPPE, W. 1988. Breeding dwarfing rootstocks for sweet cherries. *HortScience*, 23, 1, 112-114.
- SMITH, C.A.A.; HERR, J.R., Jr. 1984. Development of the ovule and female gametophyte in *Eustachys petraea* and *E. glauca* poaceae. *Amer. J. Bot.*, 71, 3, 427-438.
- SEDGLEY, M.; BUTTROSE, M.S. 1978. Structure of the stigma and style of the avocado. *Aust. J. Bot.* 26, 663-682.
- SEDGLEY, M.; GRIFFIN, A.R. 1989. Sexual Reproduction of tree crops. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. Academic Press. 378 pp.
- SHARMA, H.C.; OHM, H.W. 1990. Crossability and embryo rescue enhancement in wide crosses between wheat and three *Agropyrum* species. *Euphytica*, 49, 209-214.
- SHEHATA, A.; ZENKTELER, M. 1991. In vitro placental self and cross pollination in some species. *Acta Soc. Bot. Pol.*, 60, 1-2, 93-99.
- SHII, C.T.; RABAKOARIHANTA, A.; MOK, M.C.; MOK, D.W.S. 1982. Embryo development in reciprocal crosses of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* Lam. *Theor. Appl. Genet.*, 62, 59-64.
- SHIVANNA, K.R. 1965. In vitro fertilization and seed formation in *Petunia violacea* Lindl. *Phytomorphology*, 15, 183.
- SOCIAS I COMPANY, R. 1983. A genetic approach to the transmission of self compatibility in almond (*Prunus amygdalus* Bastsch). IV Colloque GREMPA.
- SOCIAS I COMPANY, R. 1988. Le role du pistil dans la croissance des tubes polliniques chez l'amandier. VII Colloque GREMPA. *Rap EUR.* 11557.

Referencias bibliográficas

- SOCIAS I COMPANY, R.; FELIPE, A. J. 1987. Pollen tube growth and fruit set in a self-compatible almond selection. *HortScience*, 22, 1, 113-116.
- SOCIAS I COMPANY, R.; FELIPE, A. J. 1992. Self-compatibility and autogamy in 'Guara' almond. *J. Hort. Sci.* 67, 3, 313-317.
- SOCIAS I COMPANY, R.; FELIPE, A. 1993. Momento de la floración. *Actas Hort.*, 9, 1, 131-136.
- SOCIAS I COMPANY, R.; KESTER, D. E.; BRADLEY, M. V. 1976. Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101, 5, 490-493.
- STANLEY, R.G.; LINSKENS, H.F. 1974. Pollen, biology biochemistry management, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. 307 pp.
- STELLY, D.M.; PELOQUIN, S.J.; PALMER, R.G.; CHANE, C.F. 1984. Mayers haemalum-methyl salicylate: A stain clearing technique for observations within whole ovules. *Stain Technol.*, 59, 155-161.
- STEPHENSON, A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Systems*, 12, 253-279.
- STEPHENSON, A.G.; BERTIN, R.I. 1983. Male competition, female choice and sexual selection in plants. En: *Pollination Biology*. Real Academic Press, Toronto. pp. 109-149.
- STEPHENSON, A.G.; WINSOR, J.A. 1986. Lotus corniculatus regulates offspring quality through selective fruit abortion. *Evolution*, 40, 3, 453-458.
- STERLING, C. 1953. Development anatomy of the fruit of *Prunus domestica* L. *Bull. Torrey Bot. Club*. 80, 457-477.

Referencias bibliográficas

- STETTLER, R.F.; AGER, A.A. 1984. Mentor effects in pollen interactions. En: H.F. Linskens y J. Heslop-Harrison, eds. *Cellular Interactions Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series*. Vol. 17. Springer-Verlag, Berlin. pp. 609-623.
- STEWART, J. M.; HSU, C.L. 1977. In ovule embryo culture and seedling development of cotton *Gossypium hirsutum* L. *Planta*. 137, 2, 113-117.
- STEWART, J. M.; HSU, C.L. 1978. Hybridization of diploid and tetraploid cottons through in ovule embryo culture. *J. Hered.* 69, 6, 404-408.
- STÖSSER, R.; ANVARI, S.F. 1982. The senescence of ovules in cherries. *Scientia Hort.* 16, 29-38.
- STÖSSER, R.; ANVARI, S.F. 1983. Pollen tube growth and fruit set as influenced by senescence of stigma, style and ovules. *Acta Hort.*, 139, 13-22.
- STOUT, A.B. 1917. Fertility in *Cichorium intybus*. The sporadic appearance of self-fertile plants among the progeny of self-sterile plants. *Amer. J. Bot.*, 4, 375-395.
- SURIKOV, I.M. 1987. Morphological, genetic and evolutionary aspects of the theory of intraspecific and interspecific sexual incompatibility in flowering plants. *Plant Breed. Abstracts*, 1989, 59, 1761.
- SUTTON, I. 1918. Report on test of self-sterility in plums, cherries and apples at the John Innes Horticultural Institution. *J. Genet.*, 7, 4, 281-300.
- TAKAHATA, Y.; TAKEDA, T. 1990. Intergeneric intersubtribe hybridization between *Moricandia arvensis* and *Brassica* and genome species by ovary culture. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 38-42.



- THOMPSON, M. M. 1979. Genetics of incompatibility in *Corylus avellana* L. Theor. Appl. Genet., 54, 113-116.
- THOMPSON, M. M.; LIU, L.J. 1973. Temperature, fruit set and embryo sac development in 'Italiam' prune. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 98, 2, 193-197.
- THOMPSON, R.D.; KIRCH, H.H. 1992. The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. T.I.G., 8, 11, 381-387.
- TILTON, V. R.; HORNER, M.T. Jr. 1980. Stigma, style and obturator of *Ornithogalum caudatum* Liliaceae and their function in the reproductive process. Amer. J. Bot., 67, 7, 1113-1131.
- TILTON, V.R.; LERSTEN, N.R. 1981. Ovule development in *Ornithogalum caudatum* Liliaceae with a review of selected papers on angiosperm reproduction. III. Nucellus and megagametophyte. New Phytol., 88, 477-504.
- TILTON, V.R.; RUSSEL, S.H. 1983. In vitro pollination and fertilization of soybean (*Glycine max* (L.) Merti. Leguminosae). En: Pollen: Biology and Applications for Plant Breeding. Mulcahy, D. L. y Ottaviano, E. Eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 281.
- TILTON, V.R.; WILCOX, L.W.; PALMER, R.G.; ALBERTSEN, M.C. 1984. Stigma, style, and obturator of soybean, (*Glycine max* (L.) Merr. Leguminosae) and their function in the reproductive process. Amer. J. Bot., 71, 676-686.
- TISNE-AGOSTINE, D.; ORSINI, A. 1990. L'incompatibilité pollinique chez le clémentinier: observation in vivo de la croissance des tubes polliniques. Agronomie, 10, 525-532.
- TOYAMA, T.K. 1980. The pollen receptivity period and its relation to fruit setting in the stone fruits. Fruit Var. J., 34, 1, 2-4.

- TUKEY, H.B. 1933. Embryo abortion in early ripening varieties of *Prunus avium*. Bot. Gaz., 94, 433-468.
- TUKEY, H.B. 1936. Development of cherry and peach fruits as affected by destruction of the embryo. Bot. Gaz., 98, 1-24.
- TUKEY, H.B.; YOUNG, J.O. 1939. Histological study of the developing fruit of the sweet cherry. Bot. Gaz., 100, 723-749.
- UDOVIC, D. 1981. Determinants of fruit set in *Yuca whipplei*: reproductive expenditure vs. pollinator availability. Oecologie, 48, 389-399.
- VAN DER VALK, P.; DE VRIES, S.E.; EVERINK, J.T.; VERSTAPPEN, F.; DE VRIES, J.N. 1991. Pre and post-fertilization barriers to backcrossing the interspecific hybrid between *Allium fistulosum* L. and *A. cepa* L. with *A. cepa*. Euphytica, 53, 201-209.
- VAN TUYL, J.M.; VAN DIEN, M.P.; VAN CREIJ, M.G.M.; VAN KLEINWEE, T.C.M.; FRANKEN, J.; BINO, R.J. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Sci., 74, 119-126.
- VAN WENT, J.L.; WILLENSE, M.T.M. 1984. Fertilization. En: Embryology of Angiosperms. B.M. Johri. ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 273-317.
- VLASIC, A. 1977. L'*amygdalus webbii* spach ed I suoi ibridi col pesco come portainnesti del mandorlo. III Riunione del GREMPA. 3-7 Ottobre BARI.
- VIJAYARAGHAVAN, M.R.; PRABHAKBAR, K. 1984. The endosperm. En: Embryology of Angiosperm. B. M. Johri ed. Springer-Verlag, Berlin, pp. 273-317.
- WATKINS, A.E. 1932. Hybrid sterility and incompatibility. J. Genet., 25, 125-162.



Referencias bibliográficas

- WATKINS, R. 1979. Cherry, plum, peach, apricot and almond. En: Evolution of crop plants, Ed. N. W. Simmonds. 242-247.
- WEINBAUM, S. A.; POLITO, V.S.; KESTER, D.E. 1986. Pollen retention following natural self pollination in peach, almond, and peach x almond hybrids. Euphytica, 35, 193-200.
- WEIMBAUM, S.A.; SHAW, D.V.; MURAOKA, T.T. 1989. Independence of self-compatibility and potentiality for self-pollination in peach x almond hybrids. Euphytica, 41, 1-2, 53-58.
- WEINBAUM, S.A.; SIMONS, R.K. 1974. An ultrastructural evaluation of the relationship of embryo/endosperm abortion to apple fruit abscission during the post-bloom period. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99, 311-314.
- WEINBERGER, J. H. 1975. Plums En: Advances in Fruit Breeding. J. Janick and J.N.Moore eds. pp. 336-347.
- WEINS, D.; CALVIN, C.L.; WILSON, C.A.; DAVERN, C.I.; FRANK, D.; SEAVEY, S.R. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. Oecologie, 71, 501-509.
- WENT, F.A.F.C. 1887. Étude sur la forme du sac embryonnaire des Rosacées. Ann. Sci. Nat. Bot., 7, 6, 331-341.
- WHITE, D.W.R.; WILLIAMS, E. 1976. Early seed development after crossing of Trifolium samipilosum and T. repens. N.Z.J. Bot., 14, 161-168.
- WILLEMSE, M.T.M.; KEIJZER, C.J. 1990. Tracing pollen nuclei in the ovary and ovule of Sasteria verucosa Mill. H. Duval after pollination with DAPI-stained pollen. Sex. Plant. Reprod., 3, 219-224.

Referencias bibliográficas

- WILLIAMS, E.G.; MAHESWARA, G.; HUTCHINSON, J.F. 1987. Embryo and ovule culture in crop improvement. Plant Breeding Reviews, 5, 181-236.
- WILLIAMS, E.G.; DE LATOUR, G. 1980. The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. Bot. Gaz., 141, 252-257.
- WILLIAMS, E.G.; KAUL, V.; ROUSE, J.L.; PALSER, B.F. 1986. Overgrowth of pollen tubes in embryo sacs of Rhododendrom following interspecific pollinations. Aust. J. Bot., 34, 413-423.
- WILLIAMS, E.G.; KNOX, R.B.; ROUSE, T. 1982. Pollination subsystems distinguished by pollen tube arrest after interspecific crosses in Rhododendron (Ericaceae). J. Cell. Sci., 53, 255-277.
- WILLIAMS, E. G.; ROUSE, R. L.; PALSER, B. F.; KNOX, R. B. 1990. Reproductive biology of Rhododendron, Hort. Rev., 12, 1-67.
- WILLIAMS, E.; WHITE, D.W.R. 1976. Early seed development after croosing of Trifolium ambigun and T. repens. N. Z. J. Bot., 14, 307-314.
- WILLIAMS, R.R. 1965. The effect of summer nitrogen applications of the quality of apple blossoms. J. Hort. Sci., 40, 31-41.
- WILLIAMS, R.R. 1966. Pollinations studies in fruit trees: III: The effective pollination period for some apple and pear varieties. Annu Rep. Long Asthon Res. Sta. 1965, pp. 136-138.
- WILLIAMS, R.R. 1970. Factors affecting pollination in fruit trees. En: Physiology of tree crops. Luckwill, L.C.; Cutting, C.V. eds. Academic Press, London, N.Y. pp. 193-207.

- WILLIAMS, R.R.; WILSON, D. 1970. Towards regulated crooping. A report of recent fruit-set experiments in British Orchards. Groweer Books London, pp. 61.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuclei Acid Res. 18, 6531-6535.
- WILLSON, M.F.; BURLEY, N. 1983. Mate choice in plants: tactics, mechanisms, and consequences. Princeton University Press, Princeton. 251 pp.
- WILLSON, D.; WILLIAMS, R.R. 1970. Fruit set past-pasive and imperfect. En: Towards regulated crooping. A report of recent fruit-set experiments in British orchards. R.R. Williams y D. Wilson eds. Groweer Books, London, pp. 1-6.
- YOUNG, B.A.; SHERWOOD, R.T.; BASHAW, E.C. 1979. Cleared pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses. Can. J. Bot. 57., 1668-1672.
- ZENKTELER, M. 1990. In vitro fertilization and wide hybridization in higher plants. Plant Sciences, 9,3, 267-279.
- ZHANG, Y.X.; BOCCON-GIBOD, J.; LESPINASSE, Y. 1987. Obtention d'embryons de pommier (*Malus domestica* Borkh) après culture d'antheres. C.R. Acad. Sci. Series III., 3005, 443-448.
- ZHANG, Y.X.; LESPINASSE, Y. 1988. Culture in vitro d'ovules non fécondes et d'embryos prelevés 8 jours après pollinisation chez le pommier cultivé *Malus domestica* Borkh, Agronomie, 8, 10, 837-842.
- ZHOU, W. M.; YOSHIDA, K.; SHINTAKU, Y.; TAKEDA, G. 1991. The use of IAA to overcome interspecific hybrid inviability in reciprocal crosses between *Nicotiana tabacum* L. and *N. repanda* Willd. Theor. Appl. Genet., 82, 657-661.

- ZIJLSTRA, S.; PURIMAHUA, C.; LINDHOUT, P. 1991. Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. HortScience, 26, 5, 585-586.
- ZOHARY, D. 1992. Is the European plum, *Prunus domestica* L. a *P. cerasifera* EHRH x *P. spinosa* L. allo polyploid?, Euphytica, 60, 75-77.

APENDICE

IX. APÉNDICE.

Temperaturas AÑO 1990

Fecha	Tmax	Tmin	Tmed
1-02	12.8	1.5	7.2
2-02	16.5	2.0	9.3
3-02	17.0	1.0	9.0
4-02	16.2	0.0	8.1
5-02	14.2	0.0	7.1
6-02	16.5	6.5	11.5
7-02	17.2	3.5	10.4
8-02	19.5	2.5	11.0
9-02	19.0	9.5	14.3
10-02	17.5	9.0	13.3
11-02	14.5	8.5	11.5
12-02	17.5	9.5	13.5
13-02	18.7	14.0	16.4
14-02	19.2	6.5	12.9
15-02	18.6	7.0	12.8
16-02	20.0	7.0	13.5
17-02	18.5	2.0	10.3
18-02	15.2	3.0	9.1
19-02	20.0	4.5	12.3
20-02	16.7	4.0	10.4
21-02	15.0	8.5	11.8
22-02	19.0	4.0	11.5
23-02	21.0	3.0	12.0
24-02	23.0	3.0	13.0
25-02	21.0	4.0	12.5
26-02	18.2	2.0	10.1
27-02	21.5	5.0	13.3
28-02	20.7	5.0	12.9

Fecha	Tmax	Tmin	Tmed
1-03	8.0	8.0	13.0
2-03	13.0	7.0	10.0
3-03	11.5	-5.0	3.3
4-03	13.0	-4.0	4.5
5-03	13.5	-3.5	5.0
6-03	17.0	-2.5	7.3
7-03	18.4	-3.0	7.7
8-03	13.0	5.5	9.3
9-03	19.0	3.0	11.0
10-03	22.0	-0.5	10.8
11-03	21.5	2.5	12.0
12-03	21.0	9.5	15.3
13-03	22.7	5.5	14.1
14-03	21.0	8.0	14.5
15-03	20.0	1.5	10.8
16-03	22.0	3.5	12.8
17-03	22.5	3.0	12.8
18-03	19.5	4.0	11.8
19-03	20.0	3.0	11.5
20-03	22.4	4.0	13.2
21-03	27.0	5.0	16.0
22-03	28.0	6.5	7.31
23-03	19.0	13.0	16.0
24-03	15.0	11.0	13.0
25-03	16.5	9.0	12.8
26-03	13.2	5.0	9.1
27-03	13.5	3.5	8.5
28-03	15.0	5.5	10.3
29-03	15.5	5.0	10.3
30-03	17.0	-1.5	7.8
31-03	16.0	2.0	9.0

Fecha	Tmax	Tmin	Tmed
1-04	14.6	11.0	12.8
2-04	18.2	10.0	14.1
3-04	15.7	9.5	12.6
4-04	15.5	1.0	8.3
5-04	18.0	9.0	13.5
6-04	18.0	10.0	14.0
7-04	17.5	9.0	13.3
8-04	15.5	2.0	8.8
9-04	13.2	6.5	9.9
10-04	13.5	6.5	10.0
11-04	19.2	8.5	13.9
12-04	20.5	12.0	16.3
13-04	18.5	6.0	12.3
14-04	16.0	7.5	11.8
15-04	18.0	8.0	13.0
16-04	16.2	8.5	12.4
17-04	17.0	7.0	12.0
18-04	16.5	6.0	11.3
19-04	18.5	12.2	15.4
20-04	14.0	5.5	9.8
21-04	14.5	2.0	8.3
22-04	17.0	2.0	9.5
23-04	16.5	5.0	10.8
24-04	18.0	7.0	12.5
25-04	18.6	4.5	11.6
26-04	20.5	3.0	11.8
27-04	24.0	4.5	14.3
28-04	26.0	5.0	15.5
29-04	25.0	7.0	16.0
30-04	22.0	10.5	16.3

Temperaturas AÑO1991

Fecha	Tmax	Tmin	Tmed	Fecha	Tmax	Tmin	Tmed	Fecha	Tmax	Tmin	Tmed
1-02	6.0	-3.5	1.3	1-03	12.0	3.8	7.9	1-04	18.5	1.5	10.0
2-02	7.0	4.0	5.5	2-03	16.0	6.0	11.0	2-04	21.0	0.5	10.8
3-02	11.5	3.0	7.3	3-03	16.4	6.0	11.2	3-04	14.0	1.5	7.8
4-02	12.2	1.4	6.8	4-03	12.5	5.0	8.8	4-04	15.5	2.0	8.8
5-02	10.5	3.5	7.0	5-03	14.5	11.0	12.8	5-04	13.0	2.5	7.8
6-02	12.5	0.7	6.6	6-03	15.0	11.5	13.3	6-04	16.0	6.0	11.0
7-02	12.5	4.5	8.5	7-03	15.5	10.5	13.0	7-04	19.5	6.0	12.8
8-02	11.5	4.5	8.0	8-03	15.0	4.0	9.5	8-04	19.3	8.0	13.7
9-02	14.5	1.0	7.8	9-03	17.0	8.0	12.5	9-04	23.0	4.0	13.5
10-02	9.3	5.0	7.2	10-03	19.7	6.0	12.9	10-04	23.0	5.0	14.0
11-02	9.0	-1.0	4.0	11-03	21.0	5.5	13.3	11-04	24.5	5.0	14.8
12-02	9.2	2.0	5.6	12-03	20.5	5.3	12.9	12-04	23.0	6.5	14.8
13-02	9.0	-3.9	2.6	13-03	15.5	8.5	12.0	13-04	15.0	7.0	11.0
14-02	6.7	3.7	5.2	14-03	19.5	7.0	13.3	14-04	13.0	7.0	10.0
15-02	10.5	-4.0	3.3	15-03	20.0	9.5	14.8	15-04	13.5	7.0	10.3
16-02	12.5	2.0	7.3	16-03	22.0	7.0	14.5	16-04	13.0	10.0	11.5
17-02	9.5	6.0	7.8	17-03	17.0	8.0	12.5	17-04	18.0	11.5	14.8
18-02	9.0	1.0	5.0	18-03	18.0	6.0	12.0	18-04	13.0	5.5	9.3
19-02	14.5	6.0	10.3	19-03	22.5	11.0	16.8	19-04	14.0	4.5	9.3
20-02	15.5	1.8	8.7	20-03	24.0	10.5	17.3	20-04	14.0	5.0	9.5
21-02	16.0	-1.5	7.3	21-03	23.0	10.5	16.8	21-04	13.5	0.0	6.8
22-02	15.0	6.0	10.5	22-03	16.0	6.0	11.0	22-04	14.0	-0.5	8.3
23-02	18.0	2.0	10.0	23-03	12.5	7.5	10.0	23-04	17.0	3.0	10.0
24-02	19.0	2.0	10.5	24-03	11.5	6.0	8.8	24-04	20.0	1.0	10.5
25-02	15.0	2.0	8.5	25-03	13.5	7.5	10.5	25-04	15.0	8.0	11.5
26-02	16.2	2.3	9.3	26-03	13.0	8.5	10.8	26-04	13.0	6.0	9.5
27-02	15.2	4.0	9.6	27-03	16.5	7.0	11.8	27-04	18.0	4.0	11.0
28-02	8.0	2.0	5.0	28-03	19.0	6.0	12.5	28-04	18.0	7.0	12.5
				29-03	20.0	1.0	16.0	29-04	21.5	5.5	13.5
				30-03	15.0	10.0	12.5	30-04	25.5	11.0	18.3
				31-03	16.5	4.0	10.3				

Temperaturas AÑO1992

Fecha	Tmax	Tmin	Tmed	Fecha	Tmax	Tmin	Tmed	Fecha	Tmax	Tmin	Tmed
1-02	12.0	-4.0	4.0	1-03	15.0	3.0	9.0	1-04	14.5	2.0	8.3
2-02	12.0	-4.0	4.0	2-03	14.0	6.5	10.3	2-04	19.0	7.0	13.0
3-02	10.0	-6.0	2.0	3-03	15.8	4.0	9.9	3-04	19.5	7.5	13.5
4-02	17.0	-3.5	6.8	4-03	14.0	5.0	9.5	4-04	14.0	5.0	9.5
5-02	15.0	5.0	10.0	5-03	16.0	8.0	12.0	5-04	13.5	9.0	11.3
6-02	15.0	-2.5	6.3	6-03	17.5	10.0	13.8	6-04	16.5	5.0	10.8
7-02	14.0	-2.0	6.0	7-03	22.0	11.0	16.5	7-04	16.5	9.0	12.8
8-02	13.5	3.0	8.3	8-03	18.5	2.0	10.3	8-04	13.3	7.0	10.2
9-02	13.0	4.0	8.5	9-03	16.0	5.5	10.8	9-04	19.5	7.0	13.3
10-02	15.5	1.5	8.5	10-03	17.5	0.5	9.0	10-04	18.5	8.5	13.5
11-02	16.5	1.0	8.8	11-03	16.0	7.0	11.5	11-04	22.0	2.0	12.0
12-02	20.5	1.0	10.8	12-03	15.7	2.0	8.9	12-04	20.5	4.0	12.3
13-02	13.7	6.0	9.9	13-03	16.0	5.0	10.5	13-04	20.5	9.5	15.0
14-02	15.5	3.0	9.3	14-03	17.5	5.0	11.3	14-04	24.5	2.0	13.3
15-02	17.0	4.0	10.5	15-03	18.7	11.0	14.9	15-04	17.5	12.5	15.0
16-02	16.5	2.5	9.5	16-03	22.0	9.5	15.8	16-04	13.0	6.0	9.5
17-02	14.0	4.5	9.3	17-03	22.0	2.0	12.0	17-04	15.0	5.0	10.0
18-02	12.2	-1.5	5.4	18-03	18.5	3.7	11.1	18-04	18.5	9.0	13.8
19-02	11.0	-2.0	4.5	19-03	21.0	5.0	13.0	19-04	24.0	10.0	17.0
20-02	10.5	2.0	6.3	20-03	24.0	3.5	13.8	20-04	27.0	3.0	15.0
21-02	11.5	-2.0	4.8	21-03	20.0	5.0	12.5	21-04	27.0	6.0	16.5
22-02	11.5	-5.0	3.3	22-03	22.5	9.0	15.8	22-04	29.0	8.0	18.5
23-02	14.0	-3.0	5.5	23-03	20.0	10.5	15.3	23-04	29.0	15.0	22.0
24-02	9.7	-3.0	3.4	24-03	11.0	4.5	7.8	24-04	30.0	9.0	19.5
25-02	13.0	4.5	8.8	25-03	12.5	3.5	8.0	25-04	30.0	10.0	20.0
26-02	15.0	5.0	10.0	26-03	11.5	3.0	7.3	26-04	30.5	12.0	21.3
27-02	16.0	-0.5	7.8	27-03	10.0	3.0	6.5	27-04	29.0	11.0	20.0
28-02	17.0	0.0	8.5	28-03	13.0	5.0	9.0	28-04	29.5	12.5	21.0
29-02	17.0	0.0	8.5	29-03	16.0	2.0	9.0	29-04	16.0	9.0	12.5
				30-03	16.0	3.0	9.5	30-04	18.0	9.5	13.8
				31-03	12.5	1.5	7.0				

INDICE DE FOTOS FIGURAS Y CUADROS

X. INDICE DE FOTOS, FIGURAS Y CUADROS.

INDICE DE FOTOS.

FOTO 1.1. Germinación de polen y crecimiento de los tubos polínicos	67
FOTO 1.2. Parada de los tubos polínicos y llegada a la base del estilo	68
FOTO 2.1. Estado de los óvulos en antesis y degeneración posterior	109
FOTO 2.2. Cambios en el óvulo después de la antesis	110
FOTO 2.3. Fecundación en los cruzamientos intraespecíficos	111
FOTO 2.4. Fecundación y parada de los tubos polínicos en los cruzamientos interespecíficos.	112
FOTO 3.1. Estado de los óvulos el día de cultivo "in vitro". Tinción de calcofluor	139
FOTO 3.2. Estado de los óvulos el día de cultivo "in vitro". Técnica de aclareo de ovulos.	140
FOTO 3.3. Estado de los óvulos el día de cultivo "in vitro". Técnica de aclareo de ovulos.	141
FOTO 3.4. Degeneración de óvulos el día de cultivo "in vitro"	142
FOTO 3.5. Crecimiento del embrión y endospermo en cultivo "in vitro"	144
FOTO 3.6. Formación de callo en los diferentes cruzamientos	145
FOTO 4.0. Metodología de la hibridación	165
FOTO 4.1. Cuajado inicial	169
FOTO 4.2. Cuajado final en campo	175

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1.3.1.1.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'	64
FIGURA 1.3.1.1.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'	64
FIGURA 1.3.1.2.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en el subgenero <i>Prunophora</i> : albaricoquero y mirobolanes.	65
FIGURA 1.3.1.2.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en el subgenero <i>Prunophora</i> : albaricoquero y mirobolanes.	65
FIGURA 1.3.1.3.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en los ciruelos hexaploides.	66
FIGURA 1.3.1.3.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en los ciruelos hexaploides.	66
FIGURA 1.3.1.4.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C de <i>P.tomentosa</i> en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31.	67
FIGURA 1.3.1.4.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C de <i>P.tomentosa</i> en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31.	67
FIGURA 1.3.2.1.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B.	71
FIGURA 1.3.2.1.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolan B x Moniquí.	71
FIGURA 1.3.2.2.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino	72
FIGURA 1.3.2.2.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico II Cachirulo x Balones	72
FIGURA 1.3.2.3.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605	73
FIGURA 1.3.2.3.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617.	73

FIGURA 1.3.2.4.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo.	74
FIGURA 1.3.2.4.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo	74
FIGURA 1.3.2.5.a Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x <i>P. tomentosa</i>	75
FIGURA 1.3.2.5.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x <i>P. tomentosa</i>	75
FIGURA 3.3.1. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino.	146
FIGURA 3.3.2.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B.	147
FIGURA 3.3.2.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.	147
FIGURA 3.3.3.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.	148
FIGURA 3.3.3.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x <i>P. tomentosa</i>	148
FIGURA 3.3.4.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605.	149
FIGURA 3.3.4.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617.	149
FIGURA 3.3.5.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo	150
FIGURA 3.3.5.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo.	150

Indice de fotos, figuras y cuadros

FIGURA 4.3.1.1.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino	170
FIGURA 4.3.1.1.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B	170
FIGURA 4.3.1.2.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico VIII: 'GF-31' x P.tomentosa	171
FIGURA 4.3.1.2.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.	171
FIGURA 4.3.1.3.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.	172
FIGURA 4.3.1.3.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x P.tomentosa	172
FIGURA 4.3.1.4.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605.	173
FIGURA 4.3.1.4.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617	173
FIGURA 4.3.1.5.a: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo	174
FIGURA 4.3.1.5.b: Cuajado inicial y caída hasta la 5ª semana en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo	174
FIGURA 4.3.2.1.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino	177
FIGURA 4.3.2.1.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B	177
FIGURA 4.3.2.2.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.	178
FIGURA 4.3.2.2.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x P.tomentosa	178
FIGURA 4.3.2.3.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.	179

Indice de fotos, figuras y cuadros

FIGURA 4.3.2.3.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico III: Cachirulo x P.tomentosa . . .	179
FIGURA 4.3.2.4.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirobolán 605 . .	180
FIGURA 4.3.2.4.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617 . .	180
FIGURA 4.3.2.5.a. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento intraespecífico IX : Puebla de Soto x Montizo . .	181
FIGURA 4.3.2.5.b. Caída de flores polinizadas y no polinizadas desde antesis a maduración en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo . . .	181

INDICE DE CUADROS

CUADRO V. Especies utilizadas y nivel de ploidía:	33
CUADRO 1.3.1.1. Análisis de la varianza de la germinación "in vitro" del polen de 8 clones de <i>Prunus</i>	60
CUADRO 1.3.1.2. Separación según el test de Duncan de la germinación del polen (%) de 8 clones de <i>Prunus</i>	61
CUADRO 1.3.2.1.1. Longitud media recorrida por los tubos polínicos más largos a intervalos de 24 h y a una temperatura de 12°C	63
CUADRO 1.3.2.1.2. Longitud media recorrida por los tubos polínicos más largos a intervalos de 8 h y a una temperatura de 22°C	63
CUADRO 1.3.2.1.3.: Tasa de crecimiento del tubo polínico "in vitro" mm/día a 12°C y 22°C respectivamente.	68
CUADRO 1.3.2.2.1. Velocidad media (μ /h) en los 10 cruzamientos a dos temperaturas T ₁ (12°C) y T ₂ (22°C).	70
CUADRO 1.3.2.3.1. Resultado del análisis de varianza para cada uno de los 10 cruzamientos para los factores temperatura y tiempo.	77

CUADRO 1.3.2.3.2. Análisis de la tendencia de crecimiento para cada uno de los 10 cruzamientos; hasta el 6º día a una temperatura de 12°C y hasta 48 h a una temperatura de 22°C.	80
CUADRO 1.3.2.3.3. Análisis de varianza del crecimiento de los tubos polínicos de los 10 cruzamientos y los factores temperatura y tiempo.	83
CUADRO 1.3.2.3.4. Separación de la velocidad media relativa según el test de Duncan del crecimiento de los tubos polínicos en los 10 cruzamientos.	84
CUADRO 2.2.1. Fechas de antesis y plena floración de las especies polinizadas	105
CUADRO 3.2.2. Días después de la antesis (DCO) en los 10 cruzamientos cuando se realizó el cultivo "in vitro":	129
CUADRO 3.3.1.1. Tipo de endospermo, forma del suspensor y tamaño del embrión el día del cultivo "in vitro" (DCO) en los distintos cruzamientos.	140
CUADRO 3.3.1.2. Porcentaje de fecundación, sacos embrionarios mal formados, óvulos con endospermo y óvulos con embrión el día de la puesta en cultivo "in vitro" de los óvulos en los diferentes cruzamientos.	142
CUADRO 3.3.1.3. Porcentaje de degeneración de óvulos el día de la puesta en cultivo de los óvulos en cada cruzamiento.	143
CUADRO 4.2.1. Día de la antesis en los diferentes años en que se han realizado los cruzamientos.	166
CUADRO 4.3.1. Cuajado inicial a la 5ª semana en los dos años consecutivos.	168
CUADRO 4.3.2. Cuajado final de flores vírgenes (V) y polinizadas (X) a las 13 semanas de la polinización en el año 1992.	175