

## Tesis Doctoral

# Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* A.I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo

Facciuto, Gabriela R.

2007

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Facciuto, Gabriela R.. (2007). Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* A.I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Facciuto, Gabriela R.. "Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* A.I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación  
interespecífica en el género *Tabebuia* A. I. Gomes ex DC  
(Bignoniaceae):  
estudios relacionados con el desarrollo reproductivo.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

**Gabriela R. Facciuto**

Directora: **Dra. Sara B. Maldonado**

Consejera de estudio: **Dra. Sara B. Maldonado**

Instituto de Floricultura

INTA Castelar

2007

## Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Publicaciones asociadas a esta tesis	iii
Agradecimientos	vi
Abreviaturas	viii
<b>Introducción general</b>	1
El género <i>Tabebuia</i> en la Argentina	2
Mejoramiento de las características ornamentales en el género <i>Tabebuia</i>	3
Objetivo general, objetivos parciales e hipótesis	11
<b>Capítulo I: La auto-incompatibilidad en tres especies de <i>Tabebuia</i></b>	13
Introducción	14
Materiales y métodos	20
Resultados	
Receptividad estigmática	24
Cruzamientos	33
Crecimiento del tubo polínico	34
Fecundación y endospermogénesis	40
Discusión	54
<b>Capítulo II: Inducción de poliploidía en dos especies de <i>Tabebuia</i></b>	63
Introducción	64
Materiales y métodos	66
Resultados	

Inducción y análisis de poliploidía	70
Cruzamientos entre individuos con distinto nivel de ploidía	74
Caracterización de los poliploides	77
Discusión	83
<b>Capítulo III:</b> Hibridación interespecífica en el género <i>Tabebuia</i> .	87
Introducción	88
Materiales y métodos	91
Resultados	
Cruzamientos	95
Crecimiento del tubo polínico	99
Caracterización de los híbridos	113
Discusión	128
<b>Capítulo IV:</b> Propagación de clones selectos de <i>T. heptaphylla</i> : influencia del pie de injerto.	133
Introducción	134
Materiales y métodos	135
Resultados	137
Discusión y conclusiones	141
Conclusiones generales y perspectivas	143
<b>Anexo I</b>	148
<b>Anexo II</b>	153
<b>Bibliografía</b>	161

**Auto-incompatibilidad de acción tardía e hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* A. I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): estudios relacionados con el desarrollo reproductivo.**

**Resumen**

**Objetivo:** El objetivo general de esta tesis fue el estudio de los mecanismos de auto-incompatibilidad y compatibilidad interespecífica en el género *Tabebuia*.

**Principales resultados y conclusiones:** Se comprobó la existencia de un sistema de auto-incompatibilidad, que opera en las tres especies estudiadas: *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*. El sistema de auto-compatibilidad pudo ser categorizado como de acción tardía al comprobarse que en los pistilos auto-polinizados, los tubos polínicos crecen hasta el ovario. En la auto-polinización de las tres especies, se comprobó que, aunque la doble fecundación es eficiente, la abscisión de los pistilos, que se produce entre los 4 y 6 DPP, pone en evidencia que los cruzamientos son auto-incompatibles. Durante este período, el endosperma alcanza el estado de 8-células y el cigoto permanece indiviso. La abscisión de los pistilos en un mismo estado de desarrollo del endosperma permitió confirmar que se trata de un sistema de auto-incompatibilidad y no de depresión por endogamia. Se detectó que la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos fue mayor en la polinización cruzada con respecto a la auto-polinización. Por inducción de poliploidía se obtuvieron individuos tetraploides auto-compatibles y luego triploides estériles. Se obtuvieron híbridos a partir de los siguientes cruzamientos: *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla*, *T. heptaphylla* x *T. alba* y *T. pulcherrima* x *T. crysotricha*. Se comprobó la existencia de incompatibilidad unilateral en el cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba*. Se determinó que los mecanismos de incompatibilidad operan previo a la fecundación. En las diferentes combinaciones, se identificaron patrones diferentes de deposición de calosa en los tubos polínicos, lo que indica mecanismos diferentes de incompatibilidad. La propagación de clones selectos de *T. heptaphylla* por el método de injerto, mantuvo las características de los mismos.

**Palabras clave:** *Tabebuia*, auto-incompatibilidad, hibridación interespecífica, endospermogénesis, crecimiento del tubo polínico, poliploidía, mejoramiento.

**Late-acting self-incompatibility and interspecific hybridization in the genus *Tabebuia* A. I. Gomes ex DC (Bignoniaceae): reproductive developmental studies.**

**Abstract**

**Objective:** the main objective of this thesis was the study of self-incompatibility and interspecific compatibility mechanisms in the genus *Tabebuia*.

**Main Results and Conclusions:** The existence of self-incompatibility was proved in *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*. The incompatibility system was categorized as late-acting self-incompatibility because the pollen tubes reach the ovary in self-pollinated pistils. While double fertilization was verified in self-pollinated pistils from the three species, pistils abscission, produced between 4 and 6 days post pollination, demonstrated incompatibility. During this period, the endosperm reached 8-cellular stage and the zygote remain undivided. Pistils abscission, always in the same endosperm developmental stage confirmed the existence of a self-incompatibility system, rather than inbreeding depression. Pollen tube growth was faster in cross pollination than in self pollination. Polyploidy induction permitted the acquisition of self-compatible tetraploids, and later sterile triploids. Interspecific hybrids were obtained from the following crossings: *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla*, *T. heptaphylla* x *T. alba* and *T. pulcherrima* x *T. crysotrycha*. The occurrence of unilateral incompatibility was confirmed in *T. alba* x *T. heptaphylla*. Incompatibility mechanisms were proved to operate prior to fecundation. Different callose deposition patterns were identified in pollen tubes in the different cross combinations, indicating different incompatibility systems. Propagation of *T. heptaphylla* by grafting maintained selected clones' characteristics.

**Key words:** *Tabebuia*, self-incompatibility, interspecific hybridization, endosperm development, pollen tube growth, polyploidy, breeding.

### Publicaciones asociadas a esta tesis

- En revistas:

**Facciuto G, S Soto, D Mata, J C Hagiwara, I Miyajima, N Kobayashi. 2005.**

Propagation of new *Tabebuia heptaphylla* (lapacho) clones through grafting method: rootstock influence. *Acta Horticulturae* 683: 129-132.

**Facciuto G, A Coviella, P Bologna, M J Pannunzio, S Soto. 2007.** Hibridization

between pink and yellow *Tabebuia* species native to Argentina (Bignoniaceae). *Acta Horticulturae* (en prensa).

- En libros:

**Facciuto G. 2006.** Domesticación y mejoramiento de especies ornamentales a partir de

recursos genéticos nativos de Argentina. Os Avancos da Botanica no inicio do século XXI: Morfología, Fisiología, Taxonomía, Ecología y Genética. Org J. E. de Araujo Mariath y R. P. Dos santos. ISBN 85-60428-00-3.

**Facciuto G, S Soto, S Maldonado.** Domestication and breeding of ornamental plants

native to Argentina: the cases of *Tabebuia* and *Nierembergia* genera. *Global Science Books* (en prensa).

- En Congresos Nacionales e Internacionales:

**Facciuto G, A Coviella, P Bologna, M J Pannunzio, S Soto. 2007.** Hibridization

between pink and yellow *Tabebuia* species native to Argentina (Bignoniaceae). VI International Symposium on New Floricultural Crops. Portugal. 11-15 junio 2007.

**Facciuto G, M J Pannunzio, P Bologna, A Coviella, S Soto, S Maldonado. 2006.**

Nuevas formas de *Tabebuia* A.I. Gomes ex DC. (Bignoniaceas) obtenidas por hibridación interespecífica. III Congreso Nacional de Floricultura, la Plata. 7 al 10 de noviembre 2006.

**Facciuto G, A Coviella, S Soto. 2005.** Interespecific hybridization of *Tabebuia spp*

native to Argentina 15 Congreso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. Ceara. 8 al 12 Agosto 2005.

**Facciuto G, J C Hagiwara, S Soto, N Kobayashi, I Miyajima. 2004.** Obtención y

caracterización de individuos triploides de *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo. II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas ornamentales. VI Jornadas Nacionales de Floricultura, I Encuentro Latinoamericano de Floricultura. 2004

**Facciuto G, S Soto, J C Hagiwara, D Mata, A Escandón, I Miyajima. 2003.**

Desarrollo de germoplasma ornamental a partir de Bignoniaceas nativas. IV Simposio de Recursos Genéticos para América latina y el Caribe. Mar del Plata. 10 al 14 de noviembre de 2003.

**Mata D, G Facciuto, J C Hagiwara, S Soto, I Miyajima, N Kobayashi. 2003.**

Morphological characterization of induced tetraploids from three native Bignoniaceae in Argentina. V International Symposium on New Floricultural Crops Iguazu Falls. Brasil 2003.

**Bualó R, G Facciuto, D Morisigue, L Bullrich, M Morita, N Kobayashi, I Miyajima.**

**2002.** Efecto del fotoperíodo y la temperatura en el crecimiento vegetativo de jacarandá (*Jacaranda mimosifolia*) y lapacho (*Tabebuia heptaphylla*). 1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales.

**Kato A, A Escandón, A Coviella, M Alderete, Facciuto G, I Miyajima. 2002.**

Ensayos para la puesta a punto de la rizogénesis *in vitro* en lapacho rosado (*Tabebuia heptaphylla*). 1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 2002.

**Facciuto G, G Grigioni, M Irurueta, N Kobayashi. 2002.** Caracterización objetiva

del aroma de distintos genotipos de *Tabebuia heptaphylla* (lapacho rosado): primeros resultados. 1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 2002.

**Facciuto G, J C Hagiwara, J C Serpa, S Soto, N. Kobayashi, K Arisumi. 2002.**

Mejoramiento de las características ornamentales de *Tabebuia heptaphylla* (lapacho rosado) a través de la poliploidía. 1<sup>er</sup> Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales.

## Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Sara B. Maldonado por haberme aceptado como tesista de doctorado, por su apoyo desinteresado, sus valiosos consejos, sugerencias, críticas (siempre constructivas) y su compañía y aliento constantes en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por la financiación de parte de esta tesis y a la Ing. Agr. Laura Bullrich, directora del Instituto de Floricultura por haberme permitido y alentado a realizarla.

Agradezco a la Agencia de Cooperación Japonesa (JICA) por el aporte económico y científico para el desarrollo de la Floricultura en la Argentina y especialmente por promover las actividades de mejoramiento en plantas ornamentales a partir de recursos genéticos nativos.

Agradezco al Prof. Ken -ichi Arisumi por transmitirme sus observaciones en la fenología de *Tabebuia* y al Dr Nobuo Kokayashi y al Dr Ikuo Miyajima por sus consejos para la concreción de algunos aspectos de esta tesis.

Agradezco al Dr. Alberto Prina por la lectura crítica del proyecto de tesis.

A la Ing. Agr. Marta Bianchi por sus consejos para la ejecución de algunas metodologías y por transmitirme desinteresadamente su experiencia en la biología floral de *Tabebuia*.

A la Dra. María Mercedes Arbo por su ayuda para solucionar mis dudas taxonómicas.

Agradezco a los integrantes del Departamento de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, especialmente a la Lic. Verónica Lainez y al Bqco. Gonzalo Roqueiro.

Agradezco a mis compañeras de trabajo por su aliento permanente y colaboración entusiasta en la realización de tareas de apoyo: Téc. Flor. María Andrea Coviella, Téc. Flor. María Julia Pannunzio y Lic. Paula Bologna.

Agradezco a Sara Ostertag y Zulma Roas por su valioso aporte en tareas de invernáculo.

Agradezco a Juan Cruz Serpa que siempre me impulsó a seguir pensando que los lapachos florecidos en maceta podrían ser realidad y algún día embellecerían los hogares.

Agradezco especialmente a la Ing. Agr. Silvina Soto, mi compañera incansable de ruta en el mejoramiento de plantas ornamentales, porque juntas cometimos los primeros errores, vimos concretar algunos aciertos y crecer nuestro querido Instituto de Floricultura. Juntas pensamos por mucho tiempo como articular nuestras obligaciones laborales y la concreción de una tesis de doctorado sin dejar de considerar su vinculación con las necesidades del sector florícola.

Agradezco enormemente a mis padres Noemí y Osvaldo, por su amor incondicional y por cuidar de mi hijo todas las veces que necesité cursar materias y/o trabajar en esta tesis y a mis hermanos Bárbara y Javier.

Agradezco a Cristina y a Eduardo por su aliento e impulso permanente.

Finalmente, un especial y enorme agradecimiento a mi hijo Ramiro que con sus pocos años comparte conmigo la alegría que me brinda trabajar con las plantas y la realización de esta tesis.

**Abreviaturas utilizadas en esta tesis**

DPP: días post polinización.

DPAP: días post auto-polinización.

DPPC: días post polinización cruzada.

ME: microscopio estereoscópico.

MCC: microscopio de campo claro.

MF: microscopio de epi-fluorescencia. Filtro de excitación: 330-385 nm. Filtro de emisión: 420 nm.

MET: microscopio electrónico de transmisión.

MEB: microscopio electrónico de barrido.

## **Introducción general**



## El género *Tabebuia* en la Argentina

El género *Tabebuia* A. I. Gomes ex DC. (Flia: Bignoniaceae, Tribu: Tecomeae) comprende 100 especies distribuidas desde el norte de México y las Antillas hasta el norte de Argentina (Gentry, 1992).

Son arbustos o árboles, de hojas simples, 1-folioladas o 3-7 (9) folioladas de borde entero o aserrado. La inflorescencia es una panícula terminal o está reducida a una única flor, como es el caso de *T. nodosa* (Griseb.) Griseb. Las flores presentan corola tubular infundibuliforme o tubular-campanulada de color blanco, amarillo, lavanda, magenta o rojo (Gentry, 1992).

De acuerdo a Arbo (1999) en la Argentina habitan 8 especies: *T. heptaphylla* (Vell.) Toledo, *T. impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl., *T. alba* (Cham.) Sandwith, *T. aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook.f. ex S. Moor., *T. lapacho* (K. Schum.) Sandwith, *T. nodosa*, *T. ochracea* (Cham.) Standl. y *T. pulcherrima* Sandwith. Las dos primeras especies presentan corola rosada aunque se han hallado ejemplares con flores blancas en ambos casos (Fabris, 1965). Ejemplares de *T. impetiginosa* con flores blancas, también son reportados por Gentry (1992). Se trata de ejemplares que aparecen esporádicamente en el noroeste argentino y que son cultivados por su valor ornamental. Al respecto, Gentry destaca que todas las especies de Bignoniaceae de flores rosadas tienen, ocasionalmente variantes de flores blancas.

Observaciones personales y obtenidas de cultivadores de *Tabebuia* demostraron que las plantas derivadas de las semillas de estos árboles presentan flores rosadas por lo que la única manera de mantener estos genotipos es por medio de la propagación agámica. Hasta el momento no hay estudios genéticos que expliquen la herencia del color de las flores en estas especies. Varias hipótesis podrían proponerse al respecto,

todas las cuales incluyen la mutación, el silenciamiento de genes relacionados con la determinación del color de la flor o genes de herencia cuantitativa. Este tema merece posteriores estudios. Las restantes especies nativas presentan flores amarillas.

Las especies que habitan en Argentina se distribuyen en el nordeste y noroeste siendo *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* nativas de la provincia fitogeográfica Paranense, *T. lapacho*, *T. impetiginosa* y *T. ochracea* de las Yungas, y *T. aurea* y *T. nodosa*, de la región Chaqueña siendo la última especie la de más amplia distribución en la Argentina llegando hasta la provincia de Córdoba (Cabrera, 1971). *T. crysotricha* (Martius ex A. de Candolle Standley) es citada para Misiones por Gentry (1992) aunque Arbo (com. pers.) sostiene que se trata de ejemplares cultivados.

Es importante considerar que Lorenzi (2002) no concuerda con la sinonimia entre *T. impetiginosa* y *T. avellanadae* propuesta por Gentry (1992) y aceptada por Arbo (1999), tema que amerita futuras investigaciones.

Muchas especies tienen valor forestal debido a que su madera es dura, y prácticamente imputrescible (Fabris, 1965). También se ha detectado que la corteza y la madera de gran parte de las especies tienen propiedades antitumorales, anti-inflamatorias, bacteriostáticas y fungistáticas atribuidas a la presencia de lapachol (Ferraz *et al.* 2001). Algunas de estas especies son utilizadas como ornamentales no sólo en la Argentina sino en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo debido a sus vistosas flores, aún cuando, hasta el momento, ninguna de ellas ha sido mejorada genéticamente.

El mejoramiento de especies leñosas ha sido muy poco abordado debido principalmente a la prolongada fase juvenil que en general presentan. Se pueden citar sólo algunos géneros tales como *Rosa* L., *Rhododendron* L., *Hibiscus* L., *Kalmia* L.,

*Camellia* L. en los cuales se han encarado planes de mejoramiento (Callaway y Callaway, 2000; Anderson, 2006).

### **Mejoramiento de las características ornamentales en el género *Tabebuia***

A partir de 1999, se ha comenzado un Plan de Mejoramiento en el género *Tabebuia* en el Instituto de Floricultura INTA-Castelar, a fin de obtener plantas que florezcan en estados tempranos del desarrollo y que posean forma compacta, es decir entrenudos cortos y ramificación desde su base que las hagan aptas para el cultivo en maceta (Facciuto *et al.* 2003). Este objetivo se planteó en base a una nueva demanda del mercado ornamental de “anualizar plantas perennes” (Wilkins y Anderson, 2006). Este interés de los propagadores y productores del sector florícola ha impulsado a los fitomejoradores a buscar en aquellas especies de prolongado período juvenil, nuevos genotipos con la característica de florecer en estados tempranos del desarrollo.

Para ello, primeramente se realizaron viajes de exploración y recolección a las zonas de distribución y también se recolectó material del arbolado público (Fig. 1). Se realizó una primera selección *in situ* detectando árboles de baja altura en floración o fructificación. En este trabajo se hallaron ejemplares que presentaban la particularidad de tener flores y frutos conjuntamente, lo que fue asociado a su potencial período de floración prolongado.

Se obtuvo una colección de 86 entradas. Algunas de dichas entradas se propagaron a partir de semillas aunque la mayoría fueron individuos seleccionados *in situ* y posteriormente clonados a partir de injertos. La colección se mantiene *in vivo* en invernáculos del mencionado Instituto (Fig. 2) y sus datos de pasaporte están disponibles en la base de datos *BG- Base*.

A partir de este material, se realizó la caracterización morfo-fenológica de la colección, lo que condujo a la selección de ejemplares con características ornamentales superiores tales como floración profusa, inflorescencias compactas y formadas por gran cantidad de flores, variabilidad en la tonalidad de las flores y ramificación desde la base, entre otras.



**Figura 1:** Ejemplares de *Tabebuia* seleccionados *in situ* **a-** *T. heptaphylla* (Misiones), **b-** *T. pulcherrima* (Misiones), **c-** *T. nodosa* (Córdoba).

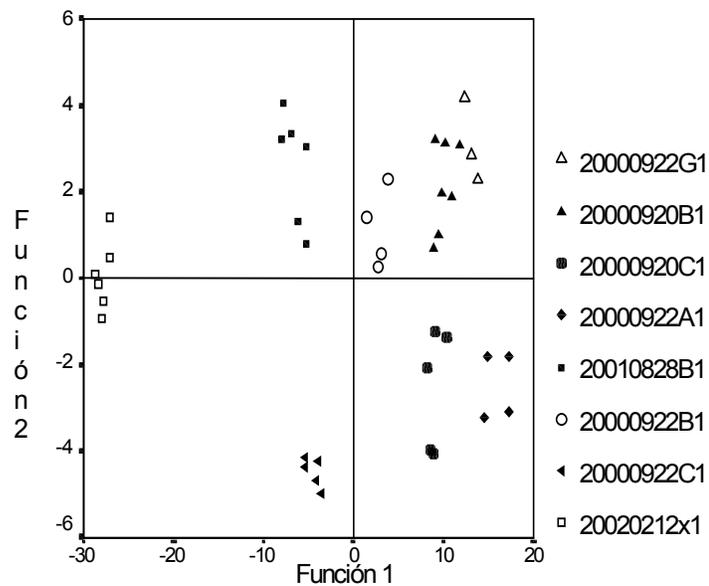
Es interesante mencionar que también se detectó la presencia de aroma en algunas entradas de *T. heptaphylla* y *T. crysotricha*, característica no mencionada hasta el momento en los estudios taxonómicos. Dicha característica fue evaluada con la aplicación de una nueva metodología de caracterización de aromas que emplea una Nariz Electrónica (AROMSCAN A32/50S, OSMETECH, PLC, Inglaterra), la cual

permitió discriminar los perfiles de aroma de las flores de los genotipos evaluados (Fig. 3).

Se seleccionaron individuos de *T. heptaphylla* con floración en el primer año de cultivo y con variabilidad en cuanto a la ramificación. Se consideraron principalmente los genotipos que poseían la característica de florecer, manteniendo las hojas.



**Figura 2:** Colección de *T. heptaphylla* conservada *in vivo* en los invernáculos del Instituto de Floricultura-INTA, Castelar.



Los materiales más promisorios fueron clonados a partir de injertos y evaluados en el primer ciclo de cultivo. En la Fig. 4 se presentan cuatro de los quince clones evaluados. Un clon (Fig. 4 b) fue seleccionado debido a las aptitudes ornamentales que presentó, tales como entrenudos cortos y floración manteniendo las hojas.



**Figura 4:** Evaluación de clones de *T. heptaphylla*. Aumentos: Barras = 5 cm.

Se cruzaron individuos con características ornamentales superiores y se seleccionó en la progenie (F1) un individuo que combinó la capacidad de florecer en el primer año de cultivo y el carácter de ramificarse desde la base, ambas características de relevancia para la obtención de variedades de uso en maceta. Es importante aclarar que,

según las observaciones realizadas en los lugares de origen y la información obtenida desde los productores, *T. heptaphylla* florece a la edad de 4 a 8 años, dependiendo de la zona; además se detectó un árbol que con 66.5 cm de diámetro a la altura de pecho permanecía en fase juvenil (Arizumi, com. pers.). En la Fig. 5 a y b se presenta el individuo seleccionado en su primera y segunda floración, correspondientes al primer y segundo año de cultivo.

El individuo seleccionado fue clonado exitosamente a partir de injerto y las plantas injertadas mantuvieron la capacidad de florecer en el primer ciclo de cultivo, esto fue a los 8 meses desde la realización del injerto (Fig. 5 c).

Dicho clon fue evaluado a fin de cumplimentar los requisitos de *distinguibilidad*, *homogeneidad* y *estabilidad*, para su inscripción en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares (INASE). Para ello fue necesaria la confección del descriptor ya que la UPOV (Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales) no dispone de ellos para muchos de los géneros nativos de Argentina. En el anexo II de esta tesis se presenta el descriptor preparado a fin de cumplimentar dicho trámite.

También se encontró en una entrada de *T. crysotricha* la capacidad de floración en estados tempranos del desarrollo. Se seleccionó *in situ* un ejemplar en fructificación de baja estatura (1.50 m), las semillas provenientes de los frutos del mencionado ejemplar se sembraron y en la descendencia se seleccionaron individuos que florecieron a los 9 meses de cultivo (Fig. 6 a).

En esta especie no se hallaron individuos en floración con la presencia de hojas, característica deseada para la producción de variedades para uso en maceta. Dichos individuos, al igual que en *T. heptaphylla*, fueron clonados exitosamente a partir de injertos y las plantas obtenidas florecieron en el primer ciclo de cultivo (Fig. 6 b).



**Figura 5:** *T. heptaphylla*: clon seleccionado por floración en estados tempranos del desarrollo. Nombre propuesto para su inscripción “*Sorpresa Rosa INTA*”. **a-** planta a los 8 meses de cultivo (primera floración) **b-** planta a los 20 meses de cultivo (segunda floración) **c-** clonación por injertos, **d-** detalle de inflorescencia, **e-** detalle de flor. **Aumentos:** a, b, c, d, barras = 5 cm; e, barra = 0.5 cm.

El resto de las especies presentaron fases juveniles variables: *T. pulcherrima* y *T. ochracea* florecieron a partir del segundo año de cultivo desde su siembra. Los ejemplares de *T. impetiginosa* y *T. nodosa* a los 5 años de cultivo continuaron en fase juvenil. No se dispone de información acerca del período de la fase juvenil del resto de las especies de *Tabebuia* que forman parte de esta tesis (*T. lapacho*, *T. alba* y *T. aurea*).



**Figura 6:** *T. crysotricha*: clon seleccionado por floración en estados tempranos del desarrollo. **a-** planta a los 9 meses de cultivo, **b-** clonación por injertos, **c-** detalle de flor. **Aumentos:** a, b, barras = 5 cm; c, barra = 0.5 cm.

La caracterización de la colección de *Tabebuia* y, especialmente, la floración en estados tempranos del desarrollo encontrada en *T. heptaphylla* y *T. crysotricha* ha permitido el planteo de los aspectos a abordar en la presente tesis tales como la hibridación interespecífica y la inducción de la poliploidía. Ambas técnicas son muy utilizadas en el mejoramiento de plantas ornamentales y muchas variedades comerciales derivan de su aplicación (Van Tuyl y Lim, 2003). Asimismo, el material seleccionado para la realización de esta tesis facilita los estudios de auto-incompatibilidad planteados, debido a la posibilidad de mantener las plantas en

condiciones controladas. Es importante aclarar que los trabajos hasta el momento reportados se han hecho en ejemplares a campo.

Esta tesis investiga los mecanismos y problemas que subyacen los resultados de los trabajos arriba mencionado. Los mismos se presentan en cuatro capítulos:

**Capítulo I:** La auto-incompatibilidad en tres especies de *Tabebuia*.

**Capítulo II:** Inducción de poliploidía en dos especies de *Tabebuia*.

**Capítulo III:** Hibridación interespecífica en el género *Tabebuia*.

**Capítulo IV:** Propagación de clones selectos de *T. heptaphylla* por injertos: influencia del pie de injerto.

### **Objetivo general**

Avanzar en el conocimiento de los mecanismos de auto-incompatibilidad y compatibilidad interespecífica en el género *Tabebuia*.

### **Objetivos parciales**

- 1- Verificar el mecanismo de auto-incompatibilidad en especies argentinas del género *Tabebuia*.
- 2- Establecer la aptitud combinatoria y las barreras a la hibridación interespecífica.
- 3- Determinar los eventos post-polinización en cruzamientos compatibles e incompatibles.
- 4- Producir individuos tetraploides en *Tabebuia* y establecer su relación con la auto-incompatibilidad.
- 5- Establecer la posibilidad de propagar masivamente los clones selectos obtenidos a partir de la técnica de injerto.

## **Hipótesis**

*Hipótesis 1:* Las especies de *Tabebuia* nativas de Argentina presentan auto-incompatibilidad de acción tardía (late acting self- incompatibility).

*Hipótesis 2* Es posible la obtención de híbridos interespecíficos en el género *Tabebuia* a través de la realización de cruzamientos controlados.

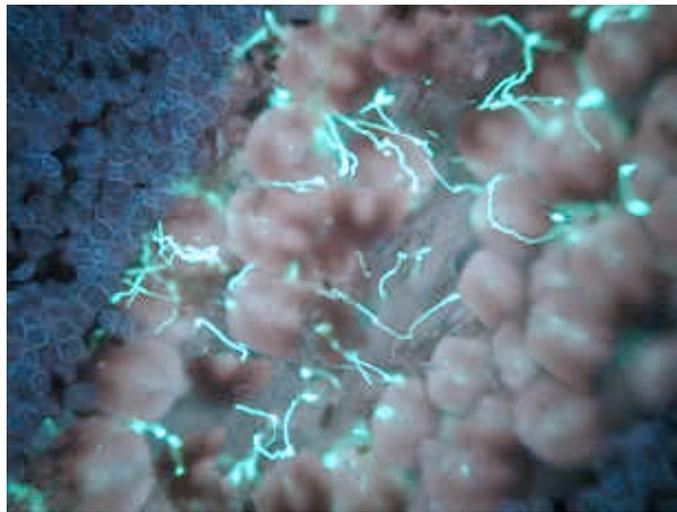
*Hipótesis 3:* Es posible la obtención de individuos tetraploides en *Tabebuia* y dicha característica produce ruptura de la auto-incompatibilidad.

*Hipótesis 4:* Los factores que se postulan como componentes de la auto-incompatibilidad y compatibilidad interespecífica:

- (i) son detectados en el material de estudio propuesto;
- (ii) resultan operativos para mantener las barreras intra e interespecíficas.

*Hipótesis 5:* El método de injerto para la propagación masiva de clones selectos permite mantener las características de los mismos.

**La auto-incompatibilidad  
en tres especies de *Tabebuia***



**Capítulo I**

## Introducción

La auto-incompatibilidad es definida como la inhabilidad de una planta hermafrodita para producir un cigoto luego de la auto-polinización, por lo tanto constituye un mecanismo genético que evita la auto-fertilización en las plantas (Nettancourt, 2005). Dicho mecanismo asegura la variabilidad genética evitando la depresión por endogamia y promoviendo la polinización cruzada, por lo que su efectividad asegura el éxito en la evolución de las especies. Según Nettancourt (2005), la auto-incompatibilidad está presente en más de la mitad de las especies de Angiospermas.

La auto-incompatibilidad puede ser clasificada como homomórfica o heteromórfica: en el primer caso las flores presentan un único tipo morfológico; en el segundo puede haber dos o tres tipos morfológicos y la fecundación se produce solamente entre tipos diferentes.

Los sistemas de auto-incompatibilidad han sido clasificados en función del genotipo que la determina: si está determinado por el genotipo del polen (genotipo haploide) la auto-incompatibilidad se denomina gametofítica, si está determinada por el genotipo de la planta que da origen al polen (genotipo diploide) se denomina esporofítica. La auto-incompatibilidad gametofítica es más común y se ha encontrado en más de 60 familias a diferencia de la esporofítica que sólo ha sido encontrada en siete familias: Brassicaceae, Asteraceae, Convolvulaceae, Betulaceae, Caryophyllaceae, Polemoniaceae y Malvaceae (Kao y Mc Cubbin, 1996; Hiscock y Mc Innis, 2003).

Stone y Goring (2001) afirman que, en el nivel molecular, los sistemas de auto-incompatibilidad se han estudiado en muy pocas familias. Las familias más estudiadas han sido Solanaceae y Papaveraceae (auto-incompatibilidad gametofítica homomórfica) y

Brassicaceae (auto-incompatibilidad esporofítica). En todos los casos se trata de mecanismos pre-cigóticos.

Los sitios de expresión de la auto-incompatibilidad pueden ser el estigma, el estilo y/o el ovario. En alguno de estos sitios se produce la inhibición del crecimiento del tubo polínico, que se caracteriza por una acumulación de calosa ( $\beta$ -1,3 glucano) en la punta de los mismos. Esta acumulación permite distinguir entre tubos polínicos compatibles e incompatibles (Herrero y Dickinson, 1981; Lush y Clarke, 1997).

En la auto-incompatibilidad esporofítica, la interrupción del crecimiento del tubo polínico se produce en el estigma y en la gametofítica generalmente en el estilo.

La auto-incompatibilidad que se presenta en el ovario constituye un tercer sistema, diferente de los anteriores. Este sistema en la actualidad está casi totalmente subestimado por los estudiosos del tema, pero reportes de los años 1980 y 1990 dan a conocer que la auto-incompatibilidad ovárica se presenta en muchas especies, tanto leñosas como herbáceas. Relacionado a la auto-incompatibilidad ovárica, Seavey y Bawa (1986) introducen la expresión auto-incompatibilidad de acción tardía (late acting self-incompatibility) y la aplican para referirse a especies que no tienen un sistema convencional de auto-incompatibilidad, es decir, en todos los casos en que las flores son polinizadas con polen propio y luego fracasan en la formación de sus frutos a pesar del crecimiento aparentemente exitoso de los tubos polínicos hasta los óvulos. Estos mismos autores también señalan que la auto-incompatibilidad de acción tardía es común en las plantas leñosas y la clasifican en cuatro categorías (1) inhibición en el ovario de los tubos polínicos incompatibles antes que alcancen los óvulos, (2) inhibición de la fecundación, (3) rechazo post-cigótico y (4) inhibición en el óvulo. De las cuatro categorías, la cuarta no ha sido claramente establecida y las tres primeras no son mutuamente excluyentes.

Nettancourt (2005) en su libro *Incompatibility and Incongruity in wild and cultivated plants* dedica muy poca atención a este tipo de incompatibilidad y menciona una lista de géneros en los cuales se combinan estilos huecos y auto-incompatibilidad ovárica tales como: *Narcissus* L., *Hemerocallis* L., *Lilium* L., *Gasteria* Duval, *Ribes* L., *Anona* L. y *Freesia* Klatt. Dicho autor también menciona que la auto-incompatibilidad ovárica es común en las especies que tienen estilos huecos, porque no hay suficiente contacto entre el tejido estilar y los tubos polínicos para que se produzca la inhibición del crecimiento de estos últimos. Otros casos que podrían incluirse dentro de la auto-incompatibilidad ovárica son los reportados en: (i) *Borago officinalis* L.: la inhibición es post-cigótica y se produce luego de la primera división del endosperma (Crowe, 1971); (ii) *Acacia retinoides* Schldl.: se produce la interrupción del crecimiento del tubo polínico en la primera o segunda capa de células de la nucela (Kenrick *et al.*, 1986); (iii) *Sterculia chicha* St. Hil.: se produce un crecimiento similar de tubos polínicos tanto en la auto-polinización como en la polinización cruzada, aunque no se hicieron estudios histológicos que prueben la ocurrencia o no de la doble fecundación (Taroda y Gibbs, 1882); (iv) *Capparis retusa* Griseb. (Bianchi y Gibbs, 2000) y (v) *Apocynum cannabinum* L. (Lipow y Wyatt, 1999): estas dos últimas similares a *Sterculia chicha*; (vi) *Theobroma grandiflorum* Schum.: tanto en la auto-polinización como en la polinización cruzada, aunque en diferentes porcentajes se produce descarga de gametas, fusión de los núcleos polares y formación del núcleo de la célula endospermogénica (Ramos *et al.*, 2005) y (vii) *T. cacao* L.: en algunos óvulos se produce la descarga de gametas pero no se produce la singamia (Cope, 1962). Finalmente, en un primer estudio de carácter morfogénético llevado a cabo en *Asclepias exaltata* L. pudo determinarse que la auto-incompatibilidad de acción tardía está controlada por un gen: S-locus (Lipow y Wyatt, 2000).

En la familia Bignoniaceae se han estudiado los sistemas reproductivos de 28 especies y se ha determinado, que a excepción de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Gobato- Rodrigues y Stort, 1992), *Astianthus viminalis* Baill (Bullock, 1985), *Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth (Singh y Chauhan, 1996) y *Tabebuia crysotricha* (Bittencourt *et al.* 2005), las restantes especies son auto-incompatibles. Dieciocho de ellas presentan auto-incompatibilidad ovárica o “late-acting self-incompatibility” (Bianchi *et al.*, 2005). En el resto de las especies no se ha estudiado el tipo de auto-incompatibilidad que presentan.

Seavey y Carter (1994) diferencian la auto-incompatibilidad de acción tardía de la depresión por endogamia temprana porque esta última se desencadena por genes letales recesivos que se expresan en el embrión y/o endosperma. Sin embargo, Nettancourt (2005) considera a ambos como un mismo fenómeno; Bittencourt y Semir (2005) señalan que la discriminación entre estos dos fenómenos es dificultosa y afirman que la auto-incompatibilidad de acción tardía ha sido atribuida frecuentemente a especies en las cuales no se ha realizado tal discriminación. En la mayoría de los estudios relativos a este tipo de auto-incompatibilidad, el sitio y naturaleza de la interrupción en el crecimiento del tubo polínico no han sido definidos.

Hasta el momento, en el género *Tabebuia*, los eventos post-polinización fueron estudiados en sólo 3 especies: *T. impetiginosa* (Bittencourt y Semir, 2005), *T. ochracea* y *T. caraiba* Bureau (Gibbs y Bianchi, 1993) en las que se observa la abscisión de la mayoría de los pistilos durante las primeras divisiones del endosperma. Bittencourt *et al.* (2003), también hallaron una respuesta semejante al analizar los eventos post-polinización en pistilos auto-polinizados de *Spathodea campanulata* Beauv.

En *T. heptaphylla* la existencia de auto-incompatibilidad fue inferida solamente a partir del análisis de la formación de frutos (Torreta *et al.*, 2002; Bittencourt y Semir, 2005). En *T. nodosa* (Gibbs y Bianchi, 1999) se infiere la existencia de auto-

incompatibilidad por el resultado de la formación o no de semillas y por estudios de crecimiento del tubo polínico, pero no se confirma si se produce la doble fecundación.

Con respecto a las causas que provocan este tipo de auto-incompatibilidad, la información es escasa o nula. Gibbs *et al.* (2004) postulan que el rechazo de los tubos polínicos podría estar señalado por un cierto número de óvulos fertilizados que desarrollan normalmente pero envían un tipo de *feedback* hormonal equivocado a la planta madre, lo que causa la rápida abscisión de los pistilos.

En cuanto a la existencia de antecedentes en la familia Bignoniaceae referidos a otros aspectos relacionados con los temas tratados en este capítulo, cabe aquí mencionar por una parte, la ausencia de estudios referidos al estigma y estilo y por otra, a las características embriológicas establecidas para la familia por Johri *et al.* (1992). Con respecto a las características embriológicas se puede mencionar: (i) óvulos anátropos a hemianátropos, unitegmentados y tenuinucelares; (ii) tétradas tetraédricas (iii) saco embrionario tipo *Polygonum* con antípodas persistentes hasta estadios tempranos del desarrollo endospermico o de vida efímera y (iv) endosperma de tipo celular.

La endospermogénesis que caracteriza a la familia, puede resumirse como sigue (Govindu, 1950; Johri *et al.*, 1992): el primer núcleo endospermico se divide transversalmente dando una célula calazal más pequeña y una célula micropilar más larga (estado de 2 células). Esta última se divide longitudinalmente para dar dos células (estado de 3 células). En la tercera división mitótica se produce una división longitudinal de la célula calazal la cual puede o no estar seguida de una formación de pared celular (estado 4-celular o 3 celular, 4-nucleado). Luego, en muchas especies, las células micropilares se dividen transversalmente para dar dos células centrales (6 células o 5 células con 6 núcleos). El desarrollo posterior del endosperma propiamente dicho sigue su desarrollo a partir de la zona central por divisiones sincronizadas de las células que la forman.

En el género *Tabebuia*, el desarrollo embriogénico y endospermogénico ha sido estudiado en *T. impetiginosa* (Bittencourt y Semir, 2005) y en *T. caraiba* y *T. ochracea* (Gibbs y Bianchi, 1993). En los tres casos corresponde al descrito por Johri *et al.* (1992), que arriba se detalló como característico de Bignoniaceae.

En el presente trabajo se abordaron aquellos aspectos referidos a la biología reproductiva de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* que están relacionados a los procesos de la auto-incompatibilidad como (i) polinizaciones controladas; (ii) crecimiento del tubo polínico (velocidad de crecimiento y patrón de distribución de calosa) y (iii) fecundación y (iv) endospermogénesis. Estos aspectos se analizaron tanto en el caso de pistilos auto-polinizados como en aquellos sometidos a polinización cruzada. Estos estudios se complementaron con la investigación de los aspectos histológicos, subcelulares y químicos de los estigmas en diferentes momentos del desarrollo.

### **Objetivo general**

Avanzar en el conocimiento de los mecanismos de auto-incompatibilidad en el género *Tabebuia*.

### **Objetivos parciales**

(i) caracterizar los eventos post-polinización a través de la formación de frutos, estudios de crecimiento del tubo polínico (velocidad de crecimiento y morfología), fecundación y endospermogénesis.

(ii) estudiar los estigmas en los niveles subcelular y químico como componentes de la relación polen-pistilo.

## **Materiales y métodos**

### *1- Receptividad estigmática*

#### *1.1 Ensayo de receptividad*

Previo a la realización de los cruzamientos se evaluó la receptividad estigmática de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* usando la prueba de Osborn *et al.* (1988). Para ello se colocó peróxido de hidrógeno al 10% sobre los estigmas y se observó si se producían burbujas. Se consideraron 6 estigmas con las ramas estigmáticas abiertas (antesis) y 6 con ramas cerradas (1 día previo a la antesis) en las tres especies.

#### *1.2 Preparación de tejidos para microscopía de campo claro (MCC), microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB)*

Los estigmas con ramas cerradas y abiertas de las tres especies fueron separados de las flores e inmediatamente fijados en glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato pH 7.2 por 18 horas a 4° C, lavados con agua desionizada por 30 min, y post-fijados con tetróxido de osmio (Sigma O5500) al 1 % durante 30 min. Luego fueron lavados nuevamente con agua desionizada y deshidratados en una serie de etanol, seguidos de una serie etanol/ acetona hasta llegar a acetona pura con cambios cada 30 min. Finalmente fueron embebidos en resina Spurr (Spurr Kit Sigma-Aldrich® SPR-LV N76442, V36304, D8165 DER-736 y D42562) según Spurr (1969). Secciones semifinas (1 µm aproximadamente de espesor) y ultrafinas para MCC y MET respectivamente, fueron obtenidas usando un ultra-micrótopo (Reichert-Jung, Viena, Austria) y cuchilla de diamante. Las secciones semifinas fueron coloreadas con azul de toluidina 0.1% en buffer fosfato pH 5.5 (Sigma, T3260). Las

secciones ultra-finas fueron montadas sobre grillas de níquel y coloreadas con acetato de uranilo (Polyscience, Inc. 21447) y citrato de plomo (Polyscience, Inc. 0785).

Las muestras para ser observadas por microscopía de barrido se extrajeron e inmediatamente el material fresco fue estudiado en el modo ambiental (PHILIPS XL 30).

Los estudios se realizaron con microscopía de campo claro (OLYMPUS BX 5, Japón), microscopía electrónica de transmisión (ZEISS EM 109 Turbo, Wiesbaden, Alemania) y microscopía electrónica de barrido (PHILIPS XL 30 ESEM, Eindhoven, Holanda).

### 1.3 *Análisis de elementos químicos a través de sonda dispersiva en energía (EDAX)*

Para detectar los elementos minerales presentes en las papilas estigmáticas y granos de polen asociados a las mismas, se utilizó una microsonda dispersiva en energía (EDAX) acoplado a un microscopio PHILIPS XL30 ESEM (Eindhoven, Holanda). Se evaluaron por esta metodología papilas de estigmas con ramas estigmáticas cerradas y abiertas de *T. heptaphylla*. También, se evaluaron las papilas y el polen asociado a las mismas 1 y 2 días post auto-polinización y polinización cruzada. En todos los casos se utilizó material fresco, y los análisis se realizaron inmediatamente después de extraer las muestras.

## 2- *Cruzamientos*

Se realizaron cruzamientos controlados en genotipos selectos de *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* (ver **Anexo I**, Tabla 1). Se consideró la auto-polinización y polinización cruzada. Las flores fueron emasculadas 1 día previo a su antesis, cuando todavía las anteras no estaban dehiscentes. Se eliminó la corola para evitar la atracción de

polinizadores. Se decidió no cubrir las flores ya que previamente se comprobó que pequeños movimientos de bolsas cobertoras producían daños en los pistilos lo que traía aparejado errores interpretativos. Debido a ello, se consideraron muestras testigo, es decir, flores castradas y no polinizadas. En anthesis, se procedió a la polinización con polen fresco y/o conservado a 5° C en silica-gel. Se utilizó polen de al menos 80% de viabilidad analizado según la técnica de Greissl (1989). Se consideraron al menos 20 flores por especie y por tratamiento.

Se evaluó la producción de frutos por cruzamiento y se calculó el porcentaje de fructificación según la fórmula:  $\text{Fructificación (\%)} = \frac{\text{frutos producidos}}{\text{flores polinizadas}} \times 100$ .

### *3- Crecimiento del tubo polínico*

Se recolectaron pistilos en intervalos de 1 día desde el primer día al día 4 seguido, a la auto-polinización (DPAP) y polinización cruzada (DPPC) en las tres especies. Se fijaron en FAA (formol; ácido acético; etanol/1: 0,5: 8) por al menos 24 horas. Luego se enjuagaron con agua destilada y se trataron con NaOH 0.8 N a 60° C por dos horas (modificado de Gibbs y Bianchi, 1999). Los pistilos se enjuagaron nuevamente y se tiñeron con azul de anilina al 1% en agua durante una hora para la detección de calosa. Los pistilos se montaron sobre un portaobjetos con una gota de la mencionada solución, se cubrieron con un cubreobjetos y se presionó levemente. Se observaron con microscopio de epi-fluorescencia OLYMPUS BX 50 (Japón) con filtros de excitación y emisión de 330-385 nm y 420 nm respectivamente.

Se evaluó el crecimiento diario del tubo polínico en los pistilos considerando la distancia recorrida. Para ello se dividió el pistilo en cuatro partes: (i) estigma, (ii) primera

mitad del estilo, (iii) segunda mitad del estilo y (iv) ovario. Los datos se relevaron según la siguiente codificación: 1- germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta el ápice del ovario, 4- tubos polínicos penetrando la micrópila. Se evaluaron al menos 15 pistilos por tratamiento y por especie. Se consideraron también pistilos control, para ello se trataron de igual manera aunque sin la tinción con el fluorocromo y se observaron bajo filtro ultravioleta.

Se caracterizaron los tapones de calosa hallados en *T. heptaphylla*. Se consideró tapón largo cuando la longitud del mismo superaba al menos una vez el diámetro. Para ello se tomaron fotografías en las cuatro zonas del pistilo mencionadas anteriormente. Las fotografías se analizaron con el programa Image Tool. Se contaron los diferentes tipos de tapones hallados en cada sector. Se consideró en el análisis la cantidad de tapones largos y cortos en cada sector. Se analizaron 10 pistilos por tratamiento. Se consideraron también 10 pistilos provenientes de plantas castradas sin polinizar. Los materiales se fotografiaron con una cámara digital Olympus C-5060.

#### 4- Fecundación y endospermogénesis

Se recolectaron pistilos a los 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12 y 20 días post auto-polinización y/o polinización cruzada. Se consideraron 4 ovarios por tratamiento. El material fue fijado en glutaraldehído 2.5% en buffer fosfato 7.2 a 4° C, deshidratado en series alcohólicas y embebido en parafina (O' Brien y Mc Cully, 1981). Con el material fijado se hicieron cortes seriados de 8-10  $\mu\text{m}$  utilizando un micrótopo rotatorio. Las secciones fueron coloreadas con safranina-verde indeleble. Los preparados se observaron en microscopio óptico y se fotografiaron con una cámara digital Olympus C-5060.

5- Análisis Estadístico: los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Estatistica* versión 6.1 Stat Soft®.

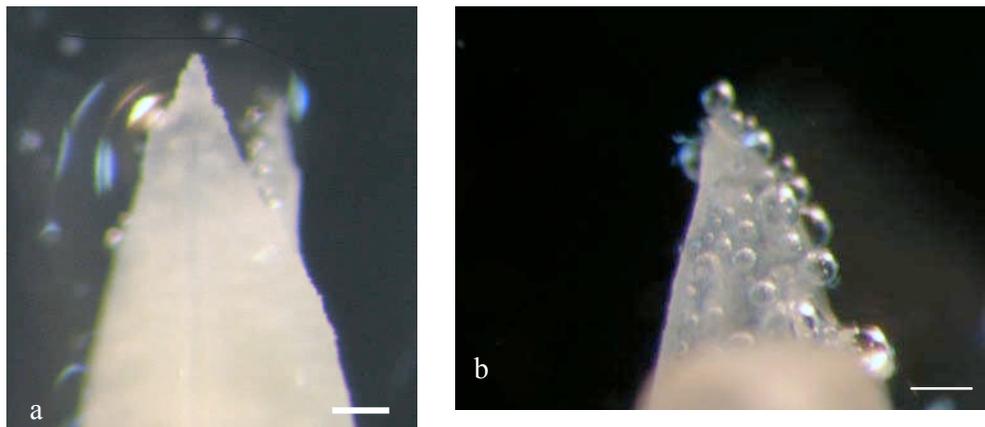
## Resultados

### 1-Receptividad estigmática

#### 1.1 Ensayo de receptividad

Los estigmas de *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* son bifidos y el contacto físico con los mismos provoca que éstos cierren muy rápidamente. La apreciación visual de los mismos en el momento de la antesis permite afirmar que carecen del brillo característico de los estigmas húmedos.

La aplicación de peróxido de hidrógeno en las dos fases de desarrollo estigmático analizadas: ramas estigmáticas cerradas (1 día previo a la antesis) y abiertas (antesis), provocó el burbujeo característico de los estigmas en estado receptivo (Fig. 1). Esta reacción positiva se verificó en las tres especies analizadas.

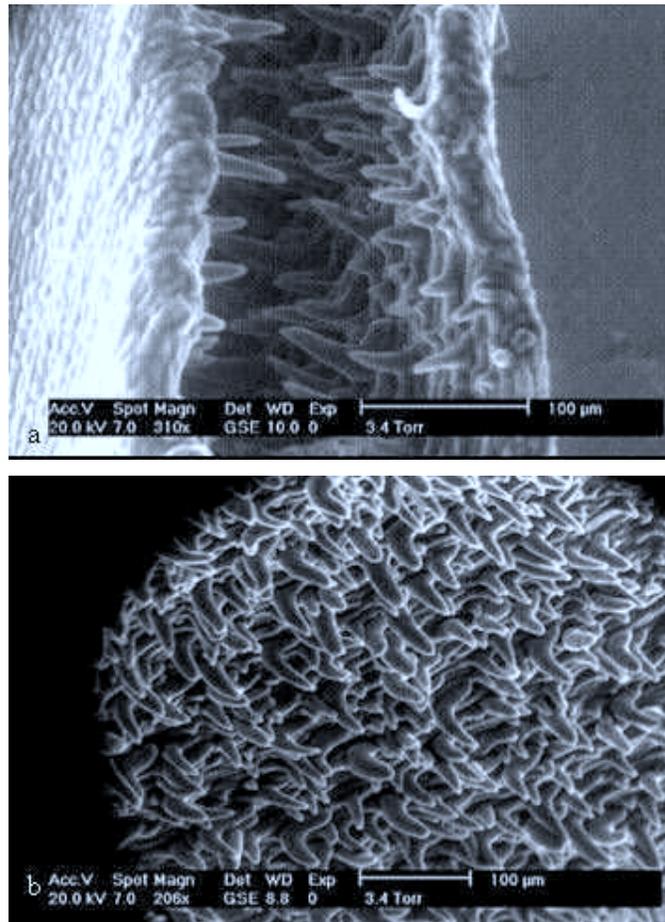


**Figura 1:** Ramas estigmáticas de *T. heptaphylla* (ME). **a-** antes que despliegan, **b-** en el momento que despliegan. Al aplicar peróxido de hidrógeno se observa el burbujeo característico del estado receptivo en ambos casos. **Aumentos:** a, b, barras = 50  $\mu$ m.

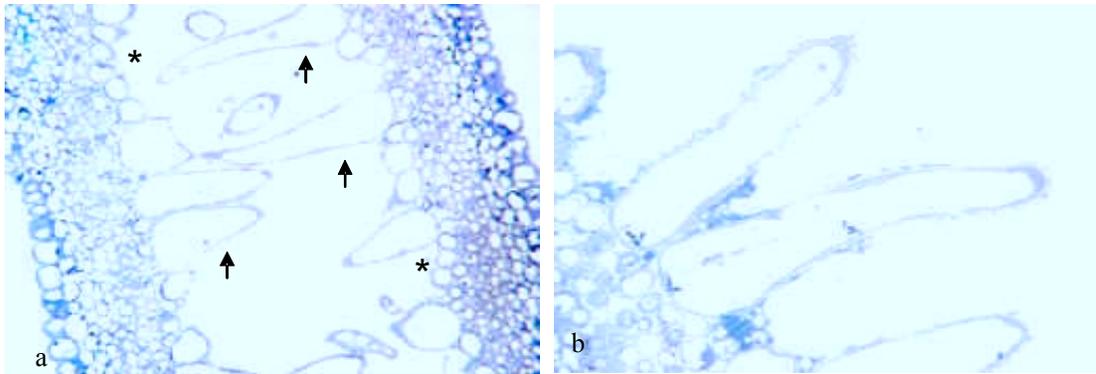
## 1.2 Análisis microscópico

El estudio de los estigmas de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* con microscopía de campo claro, electrónica de barrido y de transmisión demostró similitud en la morfología y componentes ultra-estructurales entre las especies y en los dos estados analizados.

La superficie receptiva está dispuesta en la cara interna de las ramas estigmáticas y está compuesta por papilas oblongas de extremo aguzado (Fig. 2).



**Figura 2:** Estigma receptivo de *T. heptaphylla*, (MEB). **a-** ramas estigmáticas, **b-** detalle de papilas. **Aumento:** a, b, barras = 100 µm.

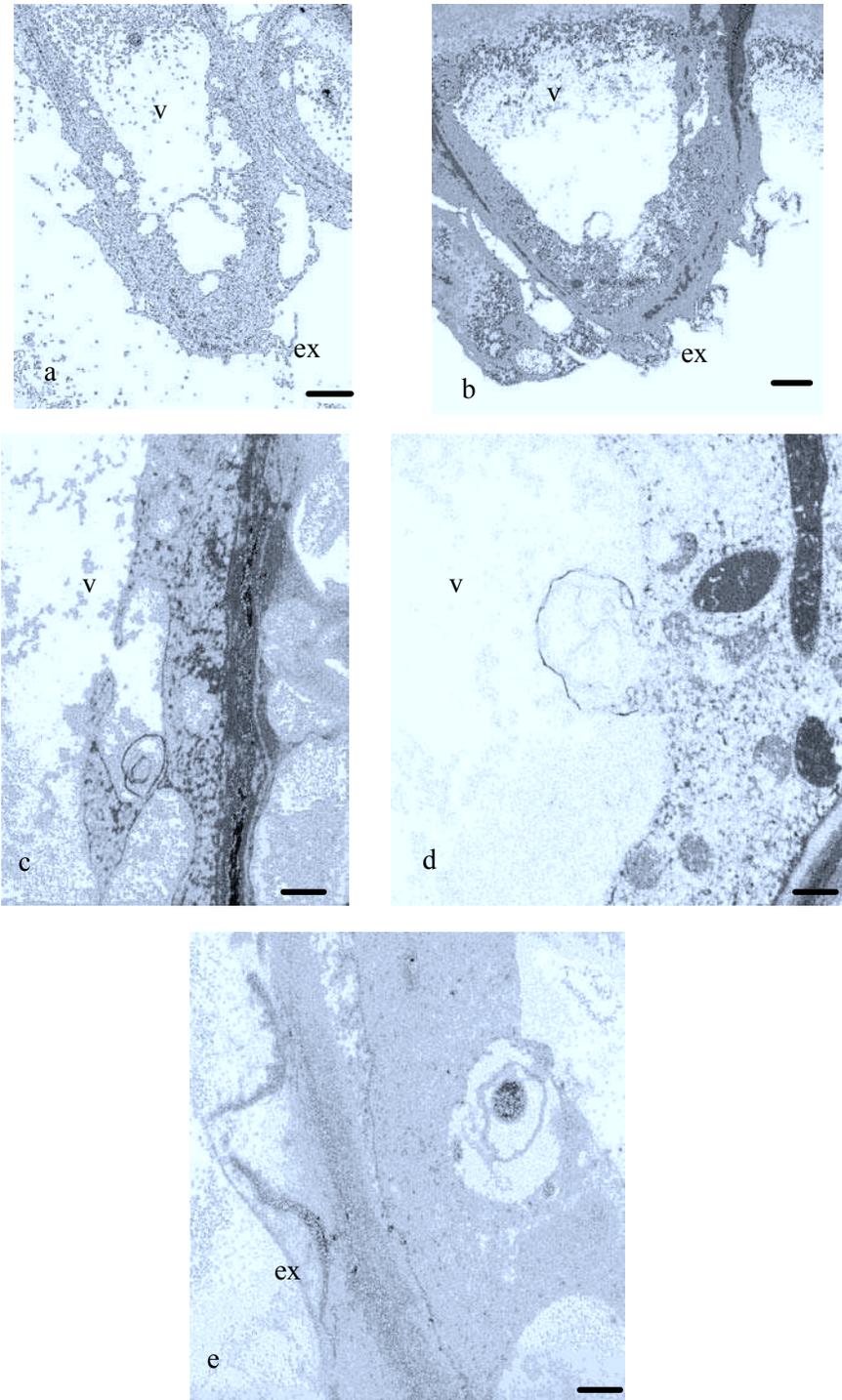


**Figura 3:** Corte transversal de estigma de *T. alba* (MCC). **a-** ramas estigmáticas, las flechas señalan las células papilosas propiamente dichas y los asteriscos indican las células no-papilosas, **b-** detalle de papilas. **Aumentos** a, barra = 50  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Se observó que dicha superficie receptiva está compuesta por una epidermis con células especializadas (Fig. 3). Se identificaron dos tipos de células: papilas propiamente dichas y células no-papilosas. Ambos tipos de células presentan una vacuola central y citoplasma periférico. Hacia el ápice de la papila, el citoplasma resulta más abundante y más rico en organelas. En esta zona se detectó retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y mitocondrias con crestas abiertas (Fig. 4 a y b). La mayor parte del volumen celular aparece ocupado por una o varias vacuolas grandes.

En la Fig. 4 c, d y e se muestra la pared de la papila y citoplasma de la misma cuando el estigma se halla en estado receptivo. En esta etapa se detectó el inicio de un proceso de autofagia, por el cual la vacuola incorpora porciones de citoplasma en su interior observándose material electrodensito en la vacuola autofágica.

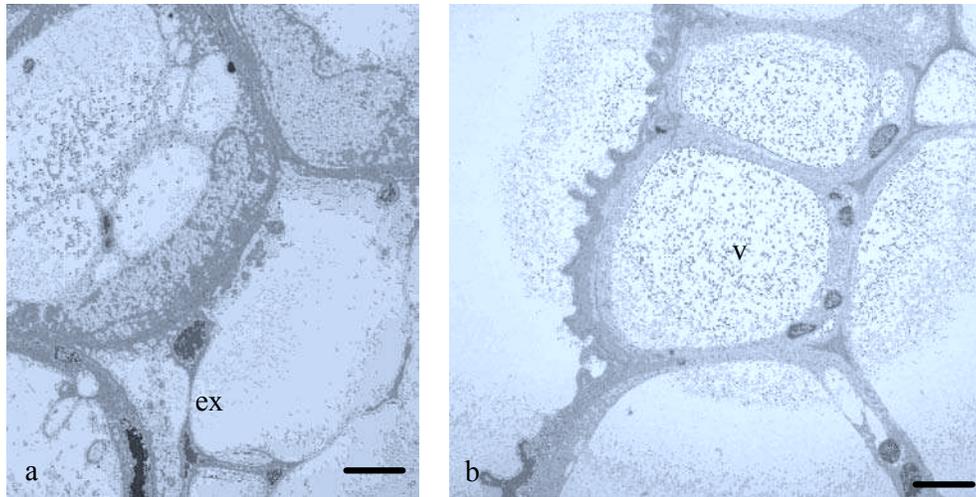
En el momento de la antesis, sobre la superficie estigmática receptiva (papilas y células no-papilosas) se detectó con MET, la presencia de un exudado amorfo, especialmente concentrado en el ápice de las papilas (Fig. 4).



**Figura 4:** Análisis de las papilas estigmáticas de *Tabebuia*, (MET). **a-** papila estigmática de *T. heptaphylla* **b-** detalle parte distal de papila de *T. alba*, **c-** detalle pared lateral de papila en *T. heptaphylla*, nótese el proceso de autofagia que se está llevando a cabo en la vacuola, **d-** detalle de citoplasma y vacuola en *T. alba*, nótese material electrodenso en la vacuola autofágica. **Abreviaturas:** ex: exudado, v: vacuola. **Aumentos:** a, b, barras = 5  $\mu\text{m}$ ; c, d, e, barras = 0.5  $\mu\text{m}$ .

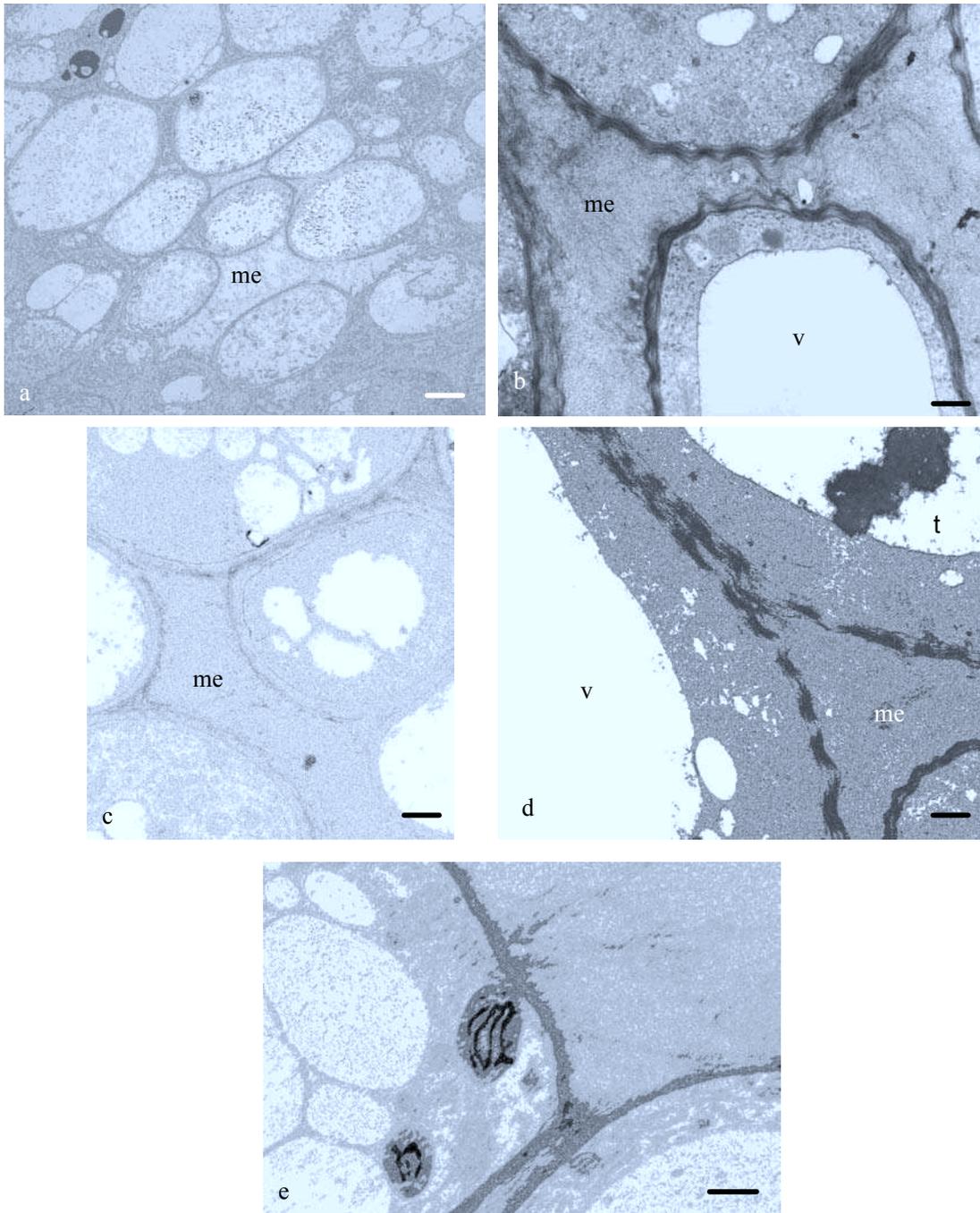
Las células no-papilosas son células redondeadas, con contenido citoplasmático denso, y numerosas vacuolas de diferente tamaño (Fig. 5 a).

La epidermis no receptiva de las ramas estigmáticas está compuesta por células con grandes vacuolas y su pared externa presenta proyecciones características. Depósitos electrodenso fueron observados en la base de las mismas (Fig. 5 b).



**Figura 5:** Análisis de la epidermis estigmática de *T. alba*, (MET). **a-** célula no papilosa de la epidermis receptiva, nótese el exudado y las numerosas vacuolas, **b-** células de la epidermis no receptiva, nótese las proyecciones de la pared externa y material electrodenso en la base. **Abreviaturas:** ex: exudado; v: vacuola. **Aumentos:** a, b, barras = 1 µm.

El parénquima subyacente a la epidermis receptiva de los estigmas está formado por células redondeadas con vacuolas de distinto tamaño, y separadas por una abundante matriz extracelular, por donde crecen los tubos polínicos hasta alcanzar el canal estilar (Fig. 6). Se trata de células con activo metabolismo y cloroplastos con almidón (Fig. 6 c). Entre las células se observa intercambio de material lo cual se evidencia por la forma característica que adquieren las paredes celulares (Fig. 6 b). También se observaron células con deposición de taninos en las vacuolas (Fig. 6 d).



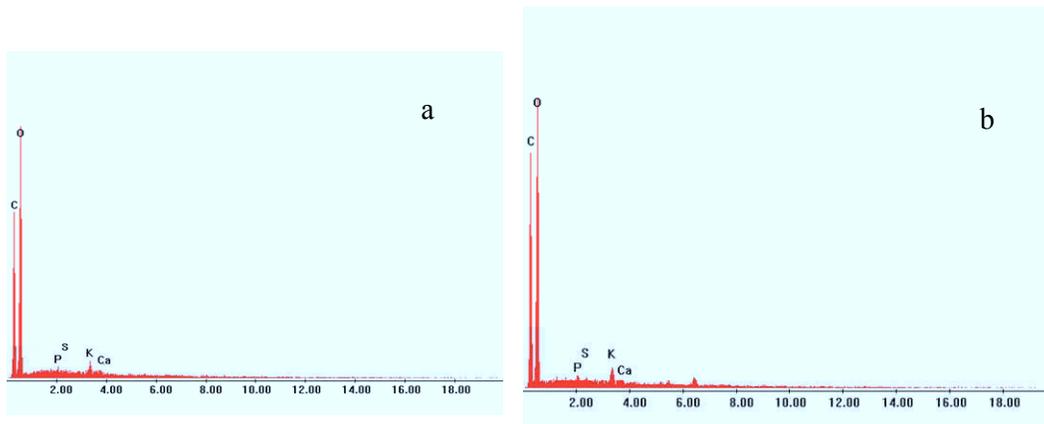
**Figura 6:** Análisis del parénquima subyacente a la epidermis receptiva de un estigma de *T. alba* (MET). **a-** parénquima subepidérmico **b-** detalle de paredes celulares en parénquima subepidérmico, **c-** detalle de matriz extracelular **d-** deposición de taninos en vacuola, **e-** cloroplastos en parénquima subepidérmico. **Abreviaturas:** me: matriz extracelular; t: tanino; v: vacuola. **Aumentos:** a, barra = 2  $\mu\text{m}$ ; b, c, barras = 1  $\mu\text{m}$ ; d, e, barras = 0.5  $\mu\text{m}$ .

### 1.3 Análisis de elementos químicos usando una sonda dispersiva en energía (EDAX)

Estigmas no-polinizados, estigmas auto-polinizados y estigmas provenientes de polinización cruzada de *T. heptaphylla* fueron sometidos a los análisis mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) a fin de obtener espectros de elementos químicos presentes en las papilas.

Es importante aclarar que en las Figs. 7, 8, 9 y 10 los picos correspondientes al C y O son característicos de todos los materiales biológicos y los picos que aparecen a la derecha del Ca representan el Cr y Fe y son artefactos que corresponden a elementos constitutivos de la platina del microscopio.

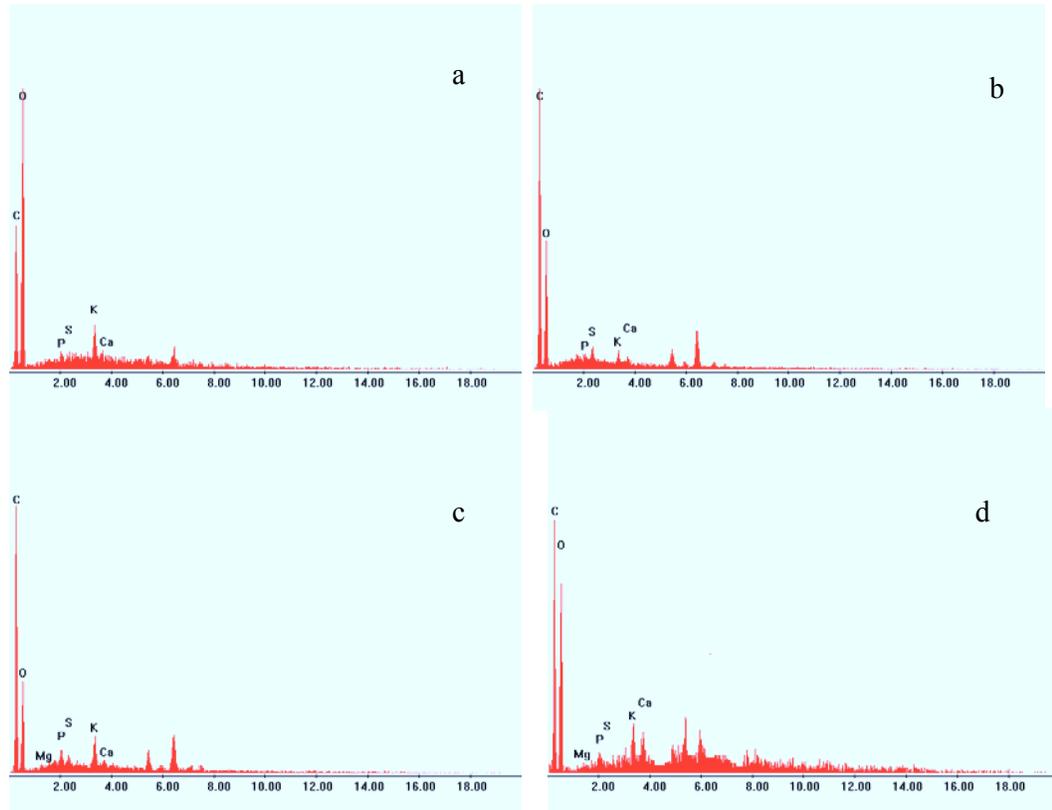
En los estigmas no-polinizados, se detectó emisión de P, S, K y Ca tanto en las papilas de estigmas cerrados como en las de estigmas con ramas estigmáticas expandidas (Fig. 7). En ambos momentos fue mayor la emisión del K con respecto a los otros elementos.



**Figura 7:** Espectros de emisión de elementos químicos mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) de papilas de *T. heptaphylla*. **a-** estigma con ramas cerradas **b-** estigma con ramas abiertas.

Luego de la auto-polinización y polinización cruzada los patrones de emisión cambiaron. En ambos casos se observó un aumento más pronunciado del K aunque

también las intensidades de P y S aumentaron levemente (Fig. 8). En la polinización cruzada la intensidad del Ca aumentó a los 2 DPP. También se identificó Mg que previamente (antes de la polinización) y en la auto-polinización estaban bajo el límite de detección.

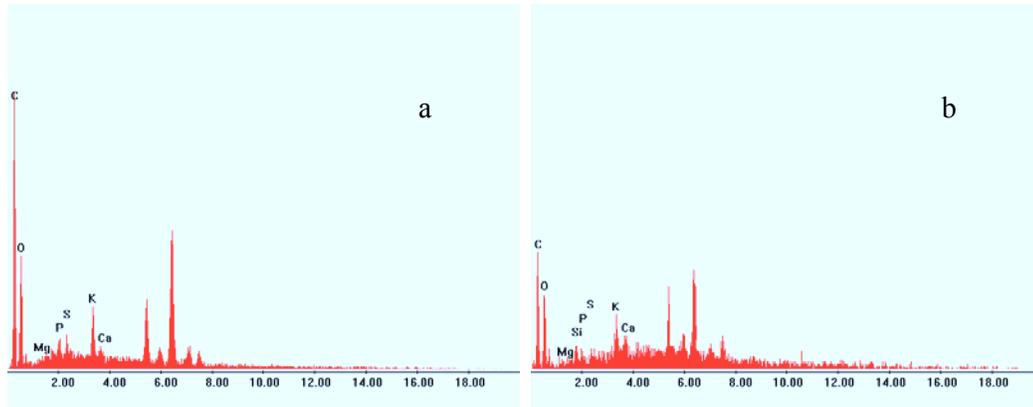


**Figura 8:** Espectros de emisión de elementos químicos mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) de papilas de estigmas auto-polinizados y luego de la polinización cruzada de *T. heptaphylla*. **a-** 1 DPAP, **b-** 2 DPAP, **c-** 1 DPPC, **d-** 2 DPPC.

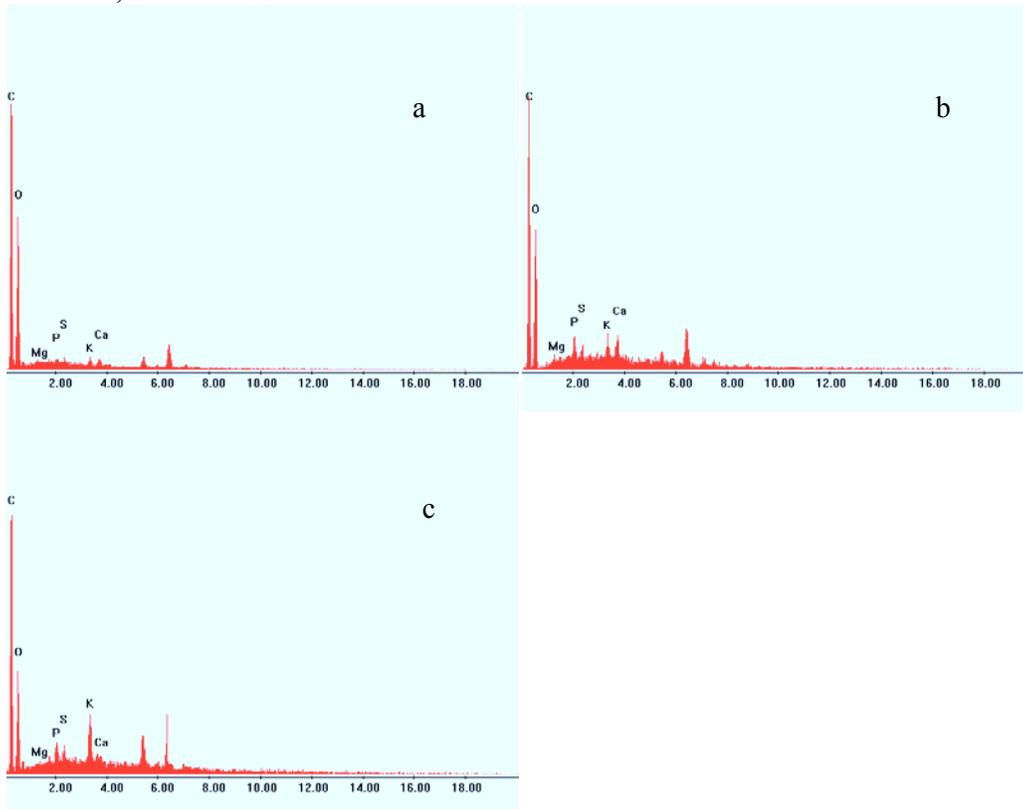
El análisis de los espectros de emisión de elementos químicos del polen asociado a las papilas se presenta en la Fig. 9. Se detectaron los mismos elementos que los hallados en las papilas estigmáticas, aunque en la polinización cruzada se detectó un aumento de la emisión de Ca.

En las papilas auto-polinizadas de un genotipo tetraploide (genotipo auto-compatible obtenido por tratamiento con colchicina, ver **Capítulo II**) se detectó un

aumento de K y Ca, semejante al encontrado en las papilas sometidas a polinización cruzada arriba mencionadas (genotipos diploides) (Fig. 10).



**Figura 9:** Espectros de emisión de elementos químicos mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) de polen en la auto-polinización y polinización cruzada de *T. heptaphylla*. **a-** 1 DPAP, **b-** 1 DPPC.



**Figura 10:** Espectros de emisión de elementos químicos mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) de papilas de estigmas y polen en la auto-polinización de *T. heptaphylla* (tetraploide). **a-** papilas 1 DPP, **b-** papilas 2 DPP, **c-** polen 1 DPP.

## 2- Cruzamientos

Los resultados correspondientes a las auto-polinizaciones y polinizaciones cruzadas en *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* se presentan en la Tabla 1. No fue posible la obtención de frutos en la auto-polinización de las tres especies aunque en un genotipo de *T. heptaphylla* se logró la formación de un único fruto.

**Tabla 1:** Flores polinizadas (N°), frutos cosechados (N°) y fructificación (%) en la auto-polinización y la polinización cruzada en *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*.

Especies	Polinización	Flores polinizadas/ frutos cosechados (N°)	Fructificación (%)
<i>T. heptaphylla</i>	Auto-polinización		
	Genotipo 1	50/0	0
	Genotipo 2	30/1	13.3
	Genotipo 3	30/0	0
	Polinización cruzada	50/36	72
	Sin polinizar (control)	20/0	0
<i>T. alba</i>	Auto-polinización	40/0	0
	Polinización cruzada	28/10	35.7
	Sin polinizar (control)	20/0	0
<i>T. pulcherrima</i>	Auto-polinización	50/0	0
	Polinización cruzada	50/40	80
	Sin polinizar (control)	20/0	0

En la polinización cruzada la eficiencia reproductiva medida como porcentaje de fructificación fue de 72, 35.7 y 80% y para *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* respectivamente (Tabla 1).

En las flores auto-polinizadas de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima*, la abscisión de las mismas ocurrió entre los 4-6 DPP, sólo el 10 % de las flores en el primer caso y el 8.3 % en el segundo, persistieron hasta los 10 DPP.

En *T. alba* la abscisión de las flores auto-polinizadas fue homogénea y ocurrió a los 4 DPP en el 100% de las flores.

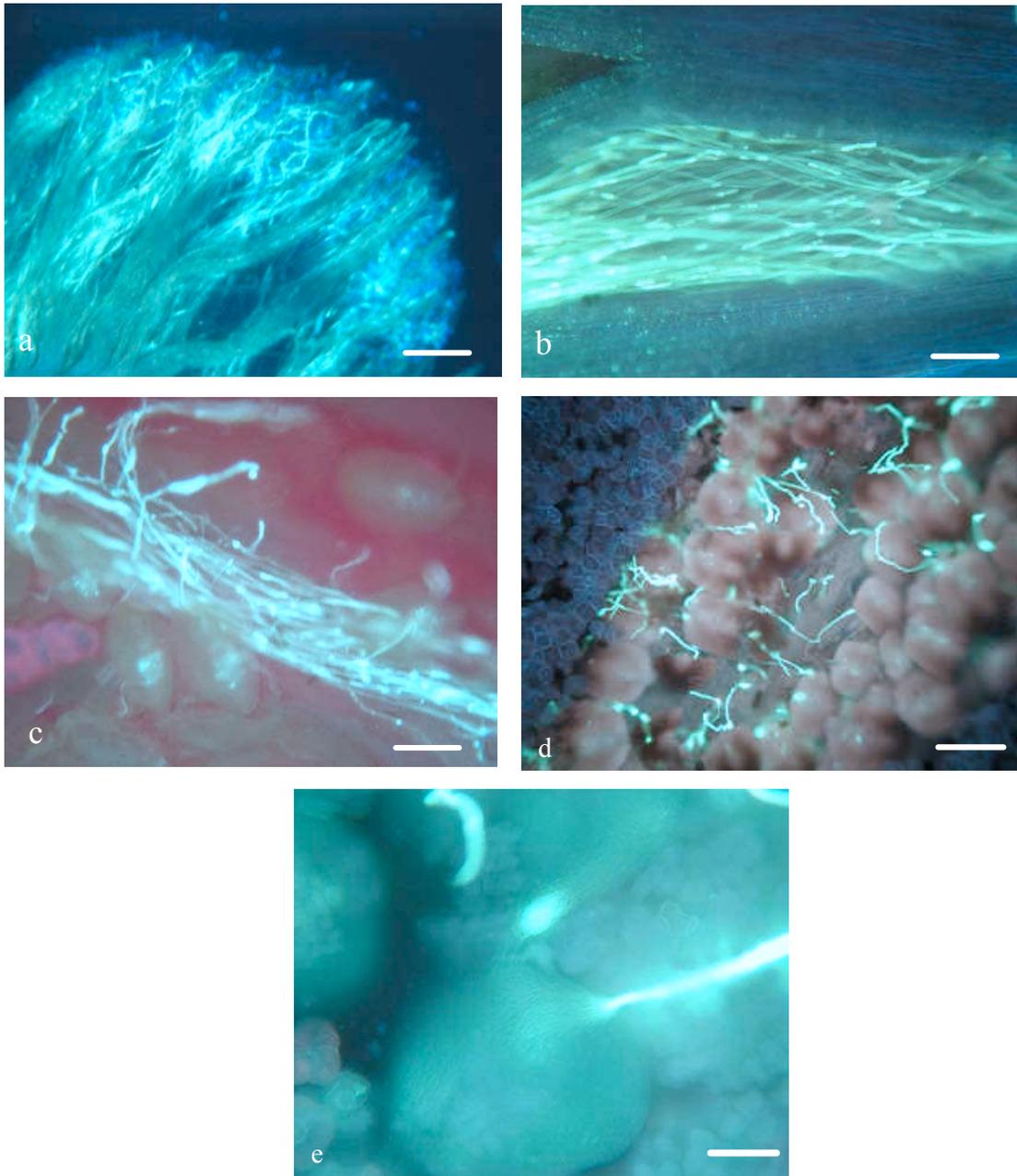
Las flores castradas no polinizadas utilizadas como testigo no formaron frutos en ningún caso lo que indica que, con el método de polinización utilizado, no se produjo contaminación con polen extraño.

### 3- Crecimiento del tubo polínico

Cuando los individuos de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* fueron auto-polinizados se observó que, en su mayoría, los granos de polen se hidrataban, y luego germinaban. Los numerosos tubos polínicos crecían a través del estilo formando un haz compacto, llegaban al ovario y penetraban en los óvulos por la micrópila.

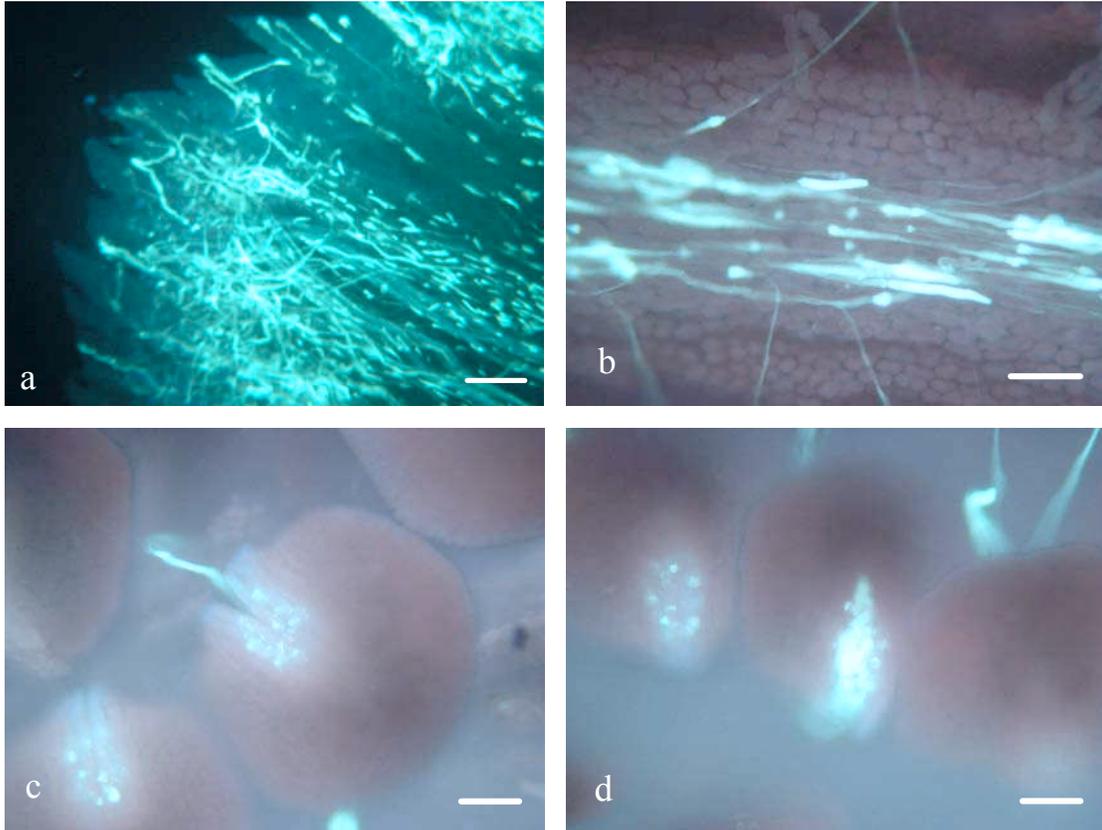
En las Figs. 11, 12 y 13 se presenta la secuencia del crecimiento de los tubos polínicos en pistilos auto-polinizados (4 DPAP) de *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* respectivamente.

En todos los casos se detectó que la calosa estaba presente en la pared celular y en los tapones de los tubos polínicos con el uso del fluorocromo azul de anilina y microscopía de epi-fluorescencia.

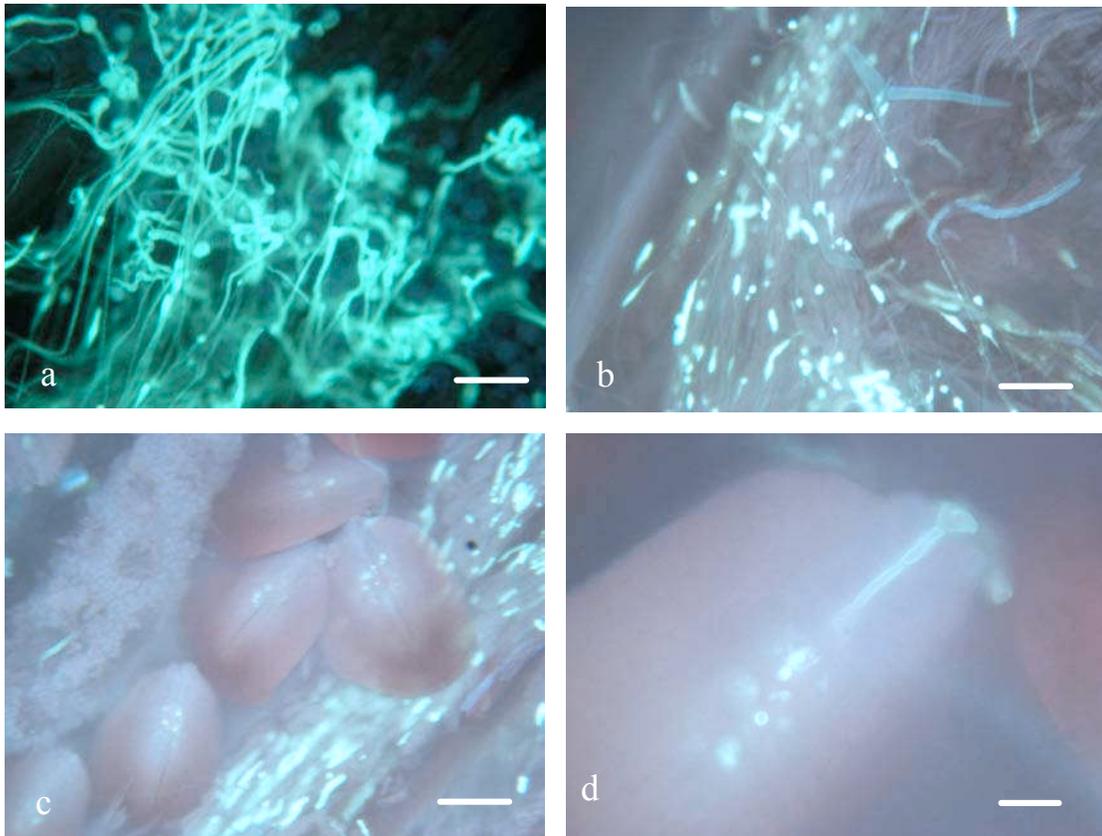


**Figura 11:** Tubos polínicos en pistilos de *T. heptaphylla*, 4 DPAP (MF). **a-** germinación de polen en el estigma, **b-** tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo, **c-** tubos polínicos en el ovario a lo largo del tabique, **d-** tubos polínicos en el ovario en dirección a los óvulos, **e-** tubo polínico penetrando por la micrópila. **Aumentos:** a, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; b, c, d, barras = 100  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 50  $\mu\text{m}$ .

En algunos óvulos de un ovario de *T. pulcherrima* (3/ 357 promedio de 10 ovarios) se detectó que el tubo polínico, en lugar de descargar en una de las sinérgidas, su recorrido se volvió errático alrededor del saco embrionario (Fig. 12 d).



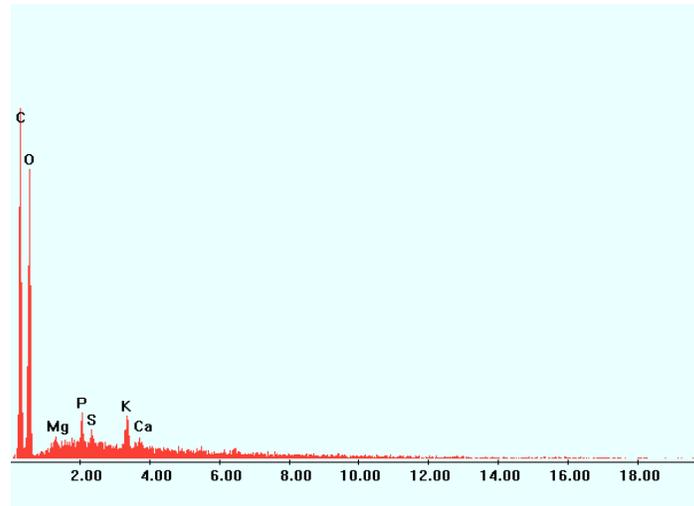
**Figura 12:** Tubos polínicos en pistilos de *T. pulcherrima*, 4 DPAP (MF). **a-** germinación de polen en el estigma, **b-** tubos polínicos a lo largo del estilo, **c-** tubo polínico penetrando por la micrópila, **d-** tubo enrollado alrededor de un saco embrionario. **Aumentos:** a, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 20  $\mu\text{m}$ ; c, d, barras = 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura 13:** Tubos polínicos en pistilos de *T. alba*, 4 DPAP (MF). **a-** germinación de polen en el estigma, **b-** tubos polínicos a lo largo del estilo, **c-** tubos polínicos en el ovario, **d-** tubo polínico penetrando por la micrópila. **Aumentos:** a, b, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; c, barra = 50  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 10  $\mu\text{m}$ .

En ninguna de las tres especies se observó reacción de la calosa cuando se aplicó el fluorocromo azul de anilina sobre las papilas estigmáticas.

En las tres especies estudiadas los controles fueron muestras en las que no se aplicó el fluorocromo azul de anilina. Las mismas, observadas con microscopio de epifluorescencia, y ultra violeta, revelaron material auto-fluorescente en el saco embrionario. Por lo tanto, esta sustancia es de naturaleza diferente a la calosa. En esta zona, el análisis EDAX permitió detectar emisión de Mg, P, S, K y Ca (Fig. 14). La posible relación de esta sustancia auto-fluorescente con la orientación del crecimiento del tubo polínico, merece ser analizada en futuros estudios



**Figura 14:** Espectro de emisión de elementos químicos mediante microsonda dispersiva en energía (EDAX) de la zona correspondiente al saco embrionario de *T. heptaphylla*.

En las tres especies a pesar del crecimiento similar de los tubos polínicos en los pistilos auto-polinizados y en los pistilos con polinización cruzada se hallaron diferencias en lo que respecta a la velocidad (Tabla 2). En los pistilos auto-polinizados de *T. heptaphylla* los tubos polínicos llegaron a los óvulos a los 4 DPP, en la polinización cruzada la llegada se produjo a los 2 DPP.

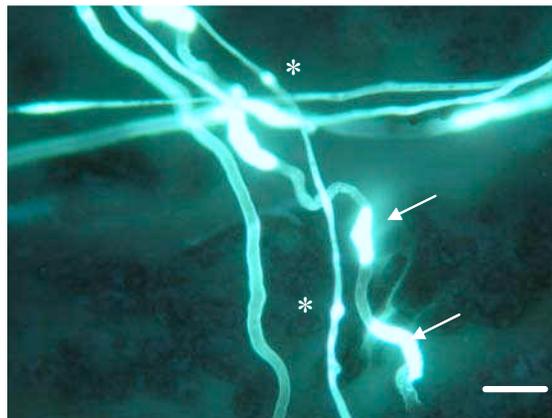
En *T. alba* y *T. pulcherrima* se observó la misma tendencia en lo que respecta a la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos, con tiempos algo diferentes, ya que en la auto-polinización éstos llegaron a los óvulos a los 3 DPP (Tabla 2).

Tanto en la auto-polinización como en la polinización cruzada, los tubos polínicos de *T. heptaphylla* presentaron tapones de calosa de distinto tamaño y con distancias variables entre ellos. Los tapones considerados largos se presentaron como una deposición continua de calosa o como deposiciones menores muy próximas entre sí (Fig.15).

**Tabla 2:** Crecimiento diario del tubo polínico a lo largo del pistilo en la auto-polinización y polinización cruzada de *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* (moda).

Especies	Polinización	1 DPP	2 DPP	3 DPP	4 DPP
<i>T. heptaphylla</i>	Auto-polinización	1	2	3	4
	Polinización cruzada	2	4		
<i>T. pulcherrima</i>	Auto-polinización	2	3	4	
	Polinización cruzada	2	4		
<i>T. alba</i>	Auto-polinización	1	2	4	
	Polinización cruzada	2	4		

1- Germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta el ápice del ovario, 4- tubos polínicos penetrando por la micrópila. n=10.



**Figura 15:** Tapones de calosa en tubos polínicos de pistilos auto-polinizados de *T. heptaphylla* (MF). Los asteriscos indican los tapones cortos, las flechas señalan tapones largos. **Aumento:** barra = 20  $\mu$ m.

En la Tabla 3 se presenta el porcentaje de tapones largos encontrados en función del número de los tapones totales en distintos sectores de los pistilos de *T. heptaphylla* auto-polinizados y sometidos a polinización cruzada. El porcentaje de tapones largos encontrados en el estigma fue de 99.20 y 52.59 % en pistilos auto-polinizados y sometidos

a polinización cruzada respectivamente. En la primera mitad del estilo los porcentajes hallados fueron de 53.05 y 18.8 % respectivamente. En el caso de la segunda mitad del estilo no se halló diferencia significativa entre la auto-polinización y la polinización cruzada. El porcentaje de tapones largos hallados en el ovario fue 70.76 y 42.7% en la auto-polinización y polinización cruzada respectivamente.

**Tabla 3:** Cantidad relativa de tapones de calosa largos en tubos polínicos en pistilos de *T. heptaphylla* sometidos a auto-polinización y polinización cruzada (4 DPP).

	Auto-polinización*	Polinización cruzada*
Estigma	99,20 a	52,59 b
Estilo- mitad superior	53,05 a	18,80 b
Estilo- mitad inferior	35,10 a	27,28 a
Ovario	70,76 a	42,70 b

\* Porcentaje de tapones largos en relación a los totales (tapones largos + tapones cortos)  
 Letras diferentes en filas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ )  
 previa transformación por arco seno.

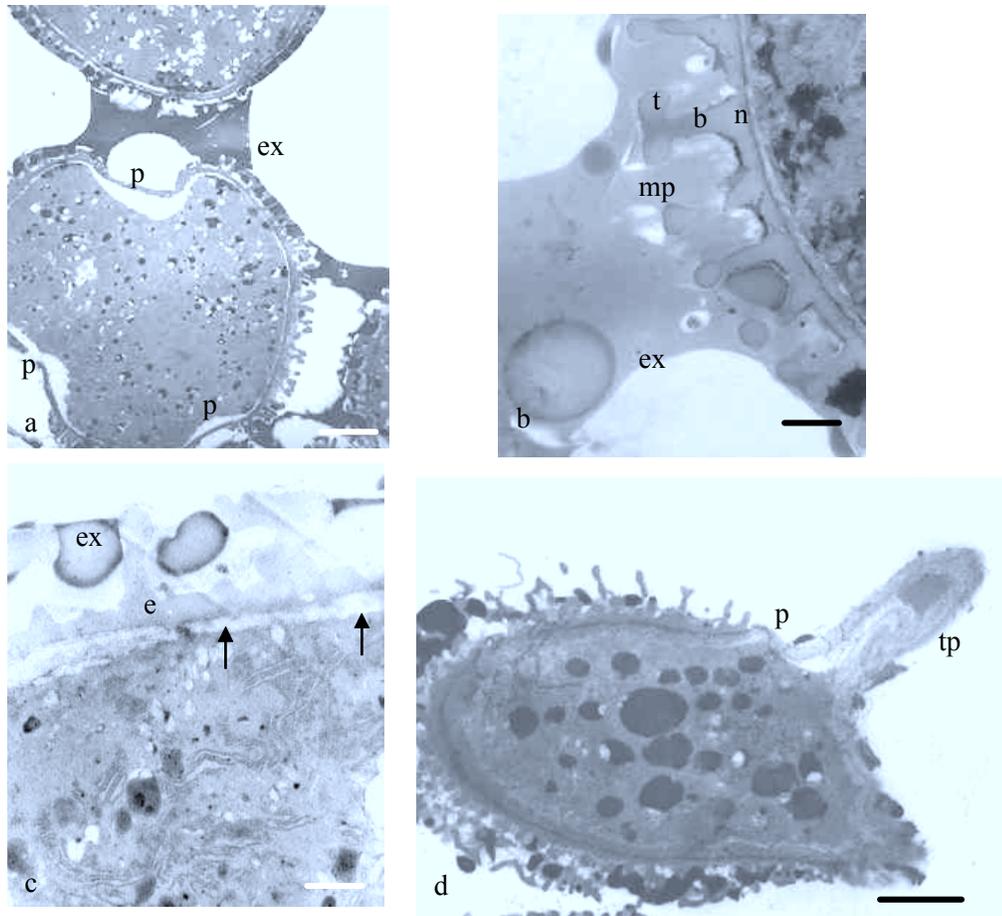
Es importante destacar que a pesar de encontrar mayor cantidad de tapones de calosa largos en los pistilos auto-polinizados de *T. heptaphylla*, no se observó interrupción del crecimiento de los tubos polínicos.

#### 4- Fecundación y endospermogénesis.

##### *T. heptaphylla*

En esta especie se encontró que la hidratación de los granos de polen se produce inmediatamente después de la auto-polinización. Las observaciones con MET (1 DPAP)

permitieron demostrar que los granos de polen estaban rodeados de exudado estigmático, típico de los estigmas húmedos (Fig. 16).

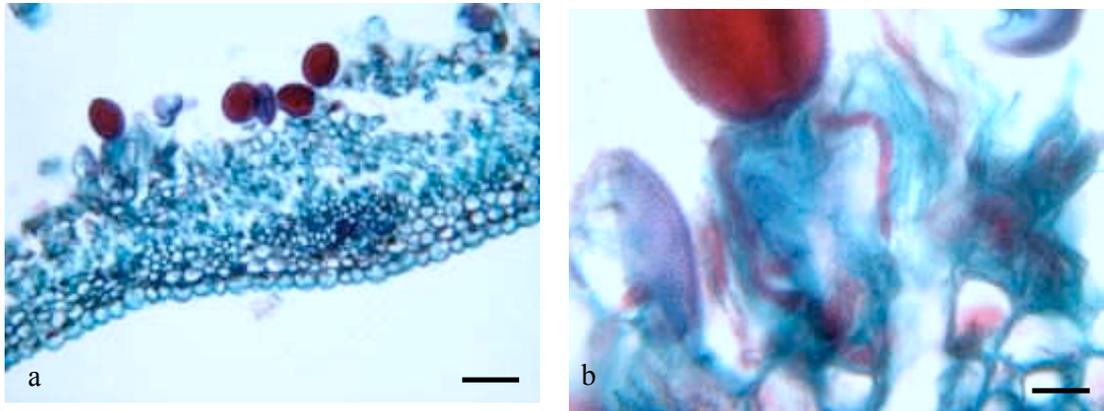


**Figura 16:** Polen de *T. heptaphylla*, 1 DPAP (MET). **a-** granos de polen cubiertos con exudado, **b-** detalle de exina, **c-** detalle de citoplasma, las flechas señalan capa electro-lúcida, **d-** grano de polen germinado. **Abreviaturas:** p: poro, ex: exudado estigmático, mp: microporo, t: tectum, b: basculum, n: nexina, e: exina, tp: tubo polínico. **Aumentos:** a, d, barras = 1  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 0.2  $\mu\text{m}$ ; c, barra = 0.1  $\mu\text{m}$ .

Los granos de polen son 3-porados y la exina es tectado-perforada. En la Fig. 16 b se observa claramente la morfología de la exina la cual presenta un tectum con microporos y básculas desarrolladas sobre una capa basal, la nexina, entre las cuales se deposita el exudado estigmático. También, se observa gran desarrollo de membranas y material

electrodensos en el citoplasma de la célula sifonogénica durante la hidratación. Una capa electro-lúcida se aprecia por debajo de la exina (Fig. 16 c, d).

Luego de la hidratación, los tubos polínicos crecen en el estigma por debajo de las paredes celulares de las papilas epidérmicas (Fig. 17 y 18).

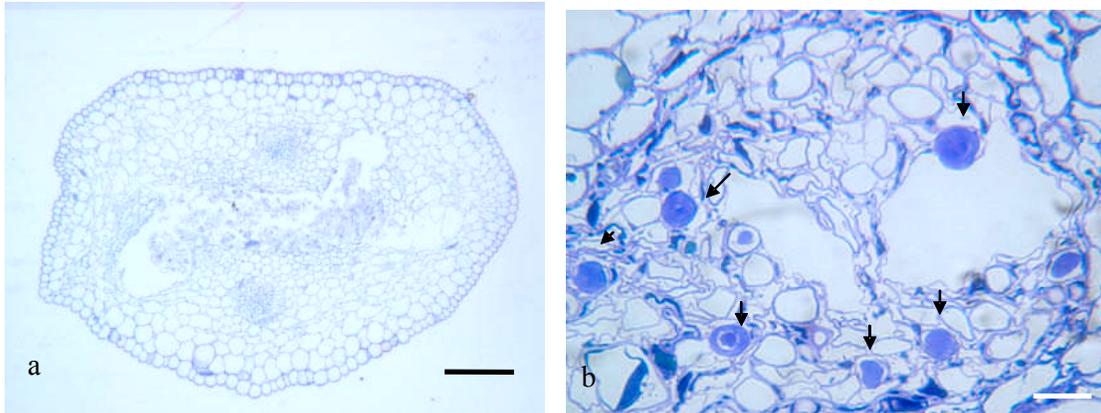


**Figura 17:** Corte transversal de estigma de *T. heptaphylla*, 1 DPAP (MCC) **a-** rama estigmática con polen **b-** detalle de tubo polínico creciendo en la pared de una papila. **Aumentos:** a, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 2  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18:** Granos de polen sobre estigma de *T. heptaphylla*, 1 DPAP (MEB). La flecha señala el tubo polínico y el asterisco indica una papila estigmática. **Aumento:** Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Debido a que el estilo es del tipo hueco, los tubos polínicos crecen a lo largo del canal estilar en contacto con el tejido de transfusión (Fig. 19).



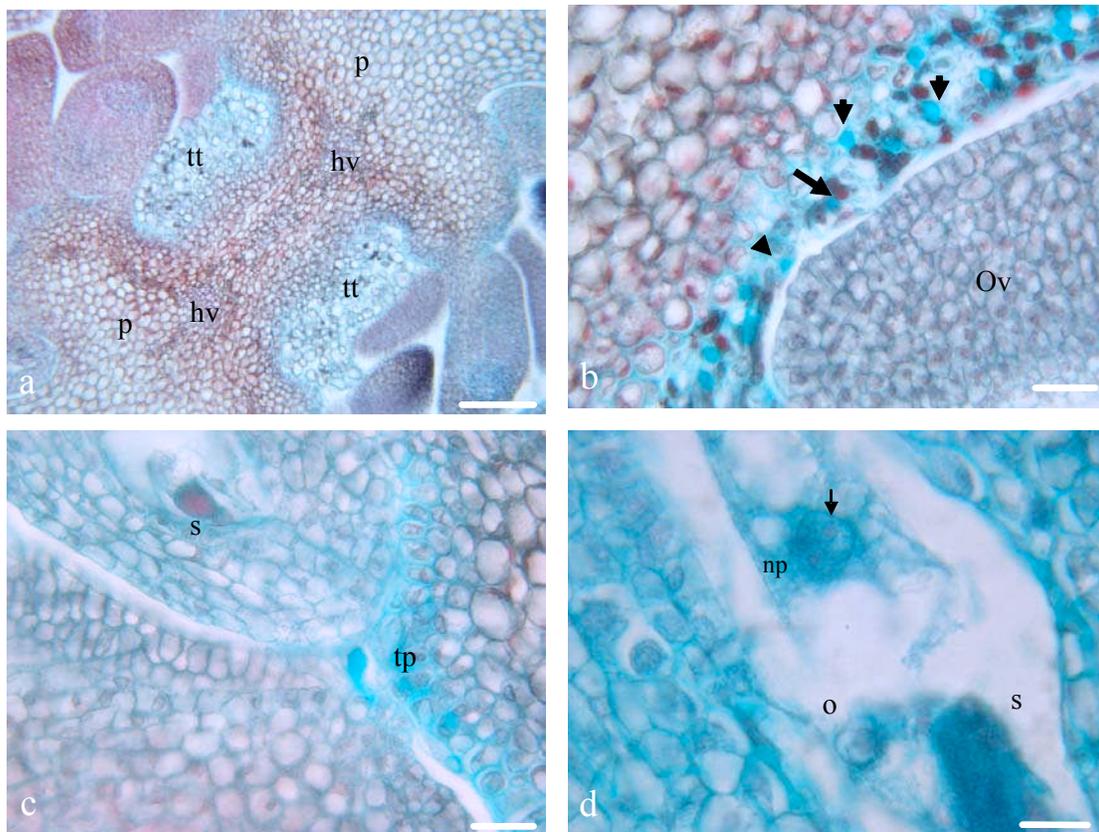
**Figura 19:** Corte transversal de estilo de *T. heptaphylla*, 2 DPAP (MCC). **a-** vista general, nótese el canal estilar **b-** detalle del canal estilar, las flechas señalan los tubos polínicos. **Aumentos** a, barra= 10 µm, b, barra= µm.

En el ovario se observó que los tubos polínicos se desplazaban por ambos lóculos creciendo a expensas de un tejido transmisor cuyo aspecto es claramente diferente del parénquima adyacente (Fig. 20 a). En efecto, este tejido presenta grandes espacios intercelulares y sus células reaccionan de manera diferente con los colorantes usados. En dicho tejido se observaron restos de tubos polínicos, (Fig. 20 b). Se observó y fotografió el tubo polínico ingresando por la micrópila (Fig. 20 c).

En el momento de llegada del tubo polínico a la micrópila el saco embrionario está totalmente desarrollado. El mismo corresponde al tipo normal o *Polygonum* y está formado por siete células: la ovocélula, dos sinérgidas, la célula central y tres antípodas. En ese tiempo la célula central fusiona sus núcleos y se observa almidón en el citoplasma (Fig. 20 d). El saco embrionario maduro es piriforme, es decir, dilatado hacia la zona micropilar y estrecho hacia la calaza.

La doble fertilización se produce entre los 4 y 6 DPAP. En este proceso, el tubo polínico descarga su contenido en una de las sinérgidas a través del aparato filar. A partir del momento de la descarga, la sinérgida receptora del tubo polínico se diferencia fácilmente de la otra sinérgida en varios aspectos: (i) contenido de núcleos y citoplasma

que descarga el tubo polínico; (ii) tinción diferencial con los reactivos empleados (Fig. 20 c, d); (iii) crecimiento polarizado en su extremo calazal entre la ovocélula y el núcleo de la célula media, formando una prolongación que sigue el contorno inferior de la ovocélula primero y del cigoto después. No se observa paredes celulares en el extremo calazal de la sinérgida. La sinérgida no penetrada permanece intacta, con su núcleo y vacuola.



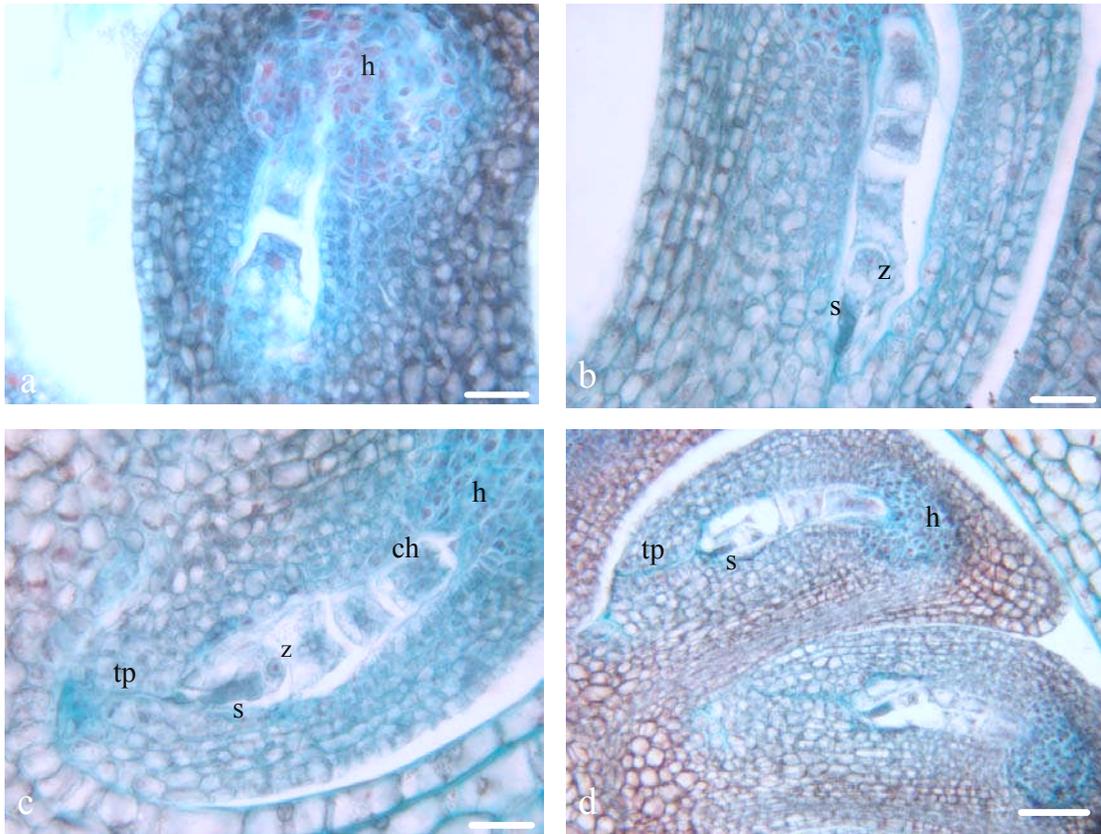
**Figura 20:** Corte transversal de ovario de *T. heptaphylla*, 4 DPAP (MCC). **a-** Tejido transmisor y parénquima adyacente, **b-** detalle de tejido transmisor y tubos polínicos, las flechas indican los tubos polínicos, **c-** tubo polínico penetrando por la micrópila, nótese la sinérgida penetrada altamente picnótica, **d-** saco embrionario con núcleos polares sin fusionar y nucleolos fusionados. **Abreviaturas:** tt: tejido transmisor, hv: haz vascular, p: parénquima, ov: óvulo, s: sinérgida, tp: tubo polínico, np: núcleos polares o: ovocélula. **Aumentos:** a, barra = 15  $\mu\text{m}$ ; b, c, barras = 2  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 1  $\mu\text{m}$ .

La doble fertilización da origen al cigoto, producto de la fusión de la célula espermática con la ovocélula, y a la célula endospermogénica, producto de la fusión de la otra célula espermática con la célula media (Fig. 21 b).

Se observó que la célula endospermogénica, inmediatamente luego de la fecundación, se agranda y extiende alrededor del cigoto, consumiendo el almidón almacenado previamente e inicia las divisiones celulares.

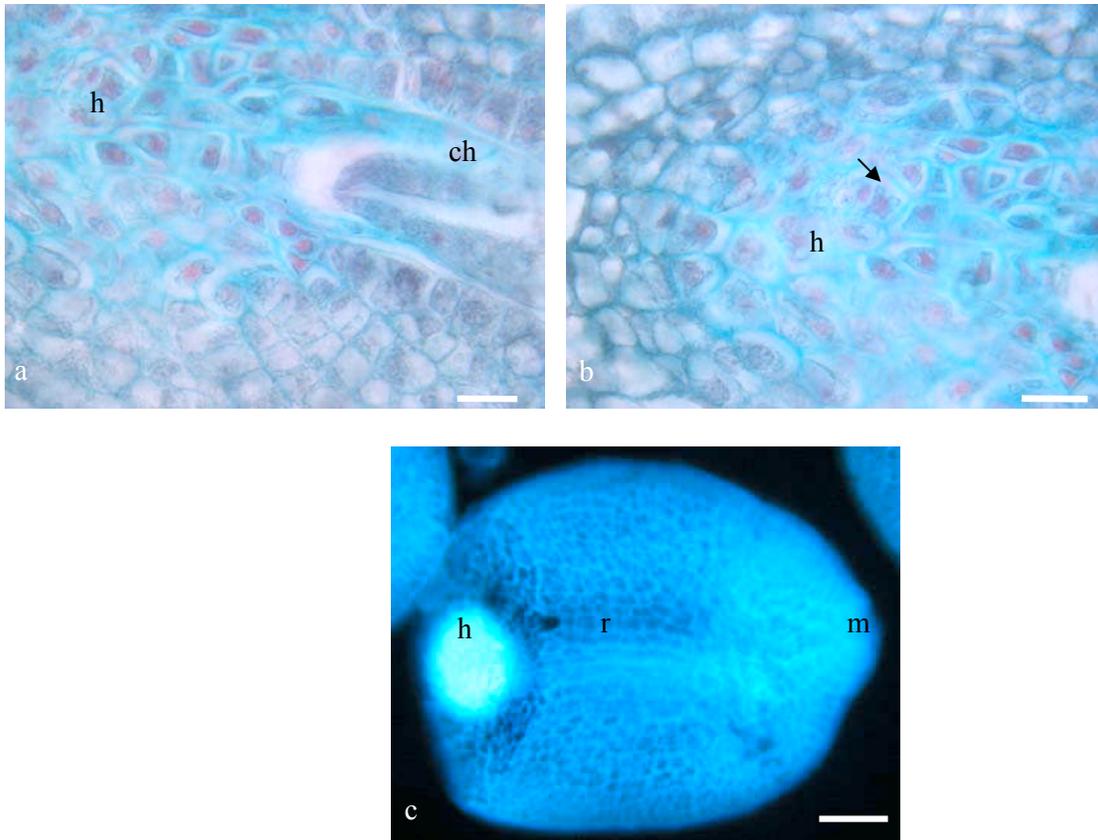
La orientación de las paredes celulares en las sucesivas citocinesis se produce siguiendo un programa de desarrollo genéticamente establecido. El primer ciclo mitótico origina una célula micropilar y otra calazal, es decir, la primera pared es horizontal (Fig. 21 a). La célula micropilar es más grande que la calazal y ambas están separadas por una pared horizontal nítida. El segundo ciclo mitótico afecta a ambas células y la pared en la célula micropilar es horizontal (Fig. 21 b). En el tercer ciclo mitótico la formación de pared es longitudinal (Fig. 21 c). En el estadio 8-celular las células endospermicas se disponen en dos hileras. En tanto las dos células calazales, características por su contenido denso se transforman en células haustoriales. Es posible observar que dichas células presentan características que son típicas de las células haustoriales como la presencia frecuente de vacuolas y el considerable aumento de tamaño del núcleo, el cual contiene 2-3 nucleolos. Es interesante destacar un intercambio activo entre el endosperma y la hipóstasis en este estado, confirmando el rol haustorial de estas células del endosperma desde el estadio 4-celular (Fig. 21).

A los 6 DPAP, se observaron sacos embrionarios en distintos estadios de desarrollo, con endosperma 2 a 8-celular. El estado 8-celular fue el más avanzado que se observó, no se pudieron tomar muestras posteriores debido a la abscisión total de los pistilos auto-polinizados.



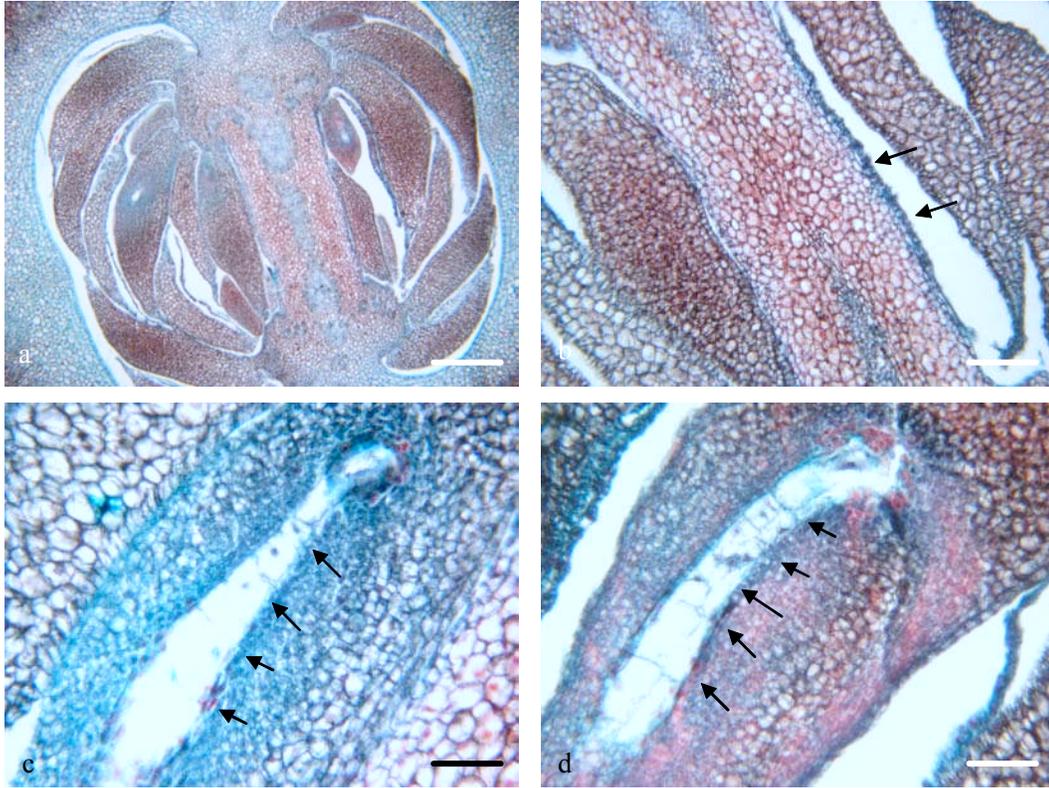
**Figura 21:** Secuencia del desarrollo del endosperma en óvulos de *T. heptaphylla*, 6 DPAP (MCC). **a-** endosperma 2-celular, **b-** endosperma 4-celular, **c-** endosperma 6-celular, **d-** endosperma 8-celular. **Abreviaturas:** s: sinérgida, h: hipóstasis, z: cigoto, ch: células haustoriales, tp: tubo polínico. **Aumentos:** a, b, c, barras = 2  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 5  $\mu\text{m}$ .

En la zona calazal se identifica la hipóstasis la cual está constituida por células pequeñas, de paredes gruesas y citoplasma activo (Fig. 22 a). La presencia de proyecciones en las paredes de algunas de dichas células permite inferir que se trata de células *transfer* (Fig. 22 b). Se determinó la presencia de calosa en dicha zona cuando los óvulos clarificados con ácido láctico, fueron tratados con azul de anilina y observados en microscopio de epi-fluorescencia (Fig. 22 c)



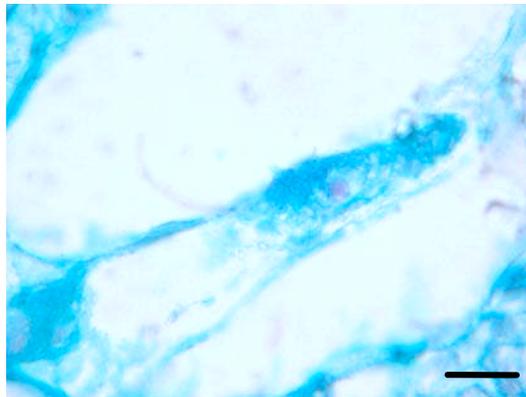
**Figura 22:** Hipóstasis en óvulos de *T. heptaphylla*. **a-** células haustoriales en contacto con la hipóstasis (MCC), **b-** detalle células de la hipóstasis (MCC), la flecha indica célula con proyecciones en sus paredes, **c-** óvulo clarificado y teñido con el fluorocromo azul de anilina, nótese la reacción positiva para calosa en la hipóstasis (MF). **Abreviaturas:** h: hipóstasis, ch: células haustoriales, r: rafe, m: micrópila. **Aumentos:** a, barra = 2  $\mu\text{m}$ , b, barra = 1  $\mu\text{m}$ , c, barra = 20  $\mu\text{m}$ .

Hasta los 6 DPP, el desarrollo del endosperma fue idéntico en los sacos formados por polinización cruzada y en la auto-polinización. Estas observaciones demuestran que hasta el momento de la abscisión no se detectan anomalías en el desarrollo del endosperma de *T. heptaphylla*. Hasta ese momento, el cigoto se mantiene en estado de reposo e indiviso. En la polinización cruzada, las observaciones a los 12 DPP demostraron que el desarrollo del endosperma alcanzaba el estado de 10 a 12 células (Fig. 23 c y d). El tejido de transmisión no se distingue observándose el desarrollo del tabique (Fig. 23 b). Hasta ese momento, el cigoto se mantiene en estado de reposo e indiviso.



**Figura 23:** Corte transversal de ovario de *T. heptaphylla*, 12 DPPC (MCC). **a-** vista general ovario, **b-** detalle del tabique, las flechan indican el lugar donde previamente estaba el tejido trasmisor, **c-** endosperma 10-celular, **d-** endosperma 12-celular, en c y d las flechas señalan los tabiques transversales. **Aumentos:** a, barra= 20  $\mu\text{m}$ ; b, c, d, barras = 10  $\mu\text{m}$ .

Hasta los 20 DPPC no se observó división mitótica del cigoto, sólo se detectó en algunos óvulos un alargamiento del mismo (Fig. 24).

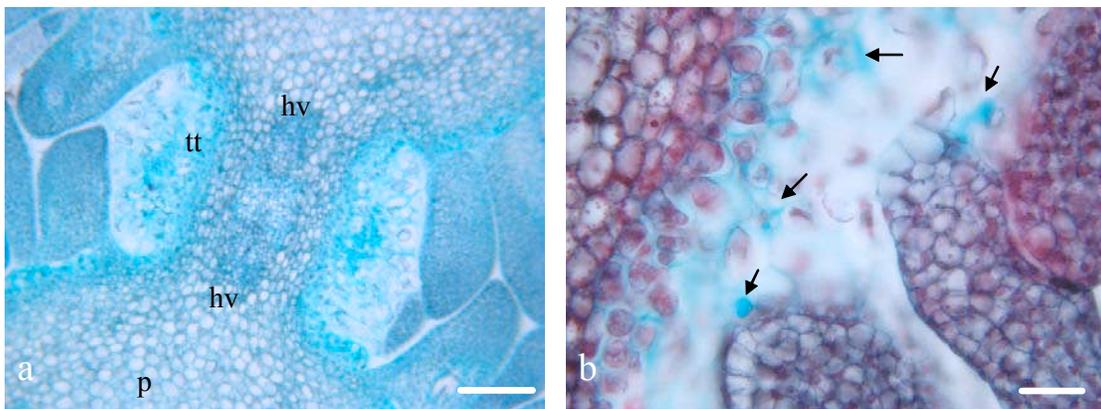


**Figura 24:** Corte transversal de cigoto indiviso de *T. heptaphylla*, 20 DPPC (MCC). **Aumento:** barra = 1  $\mu\text{m}$ .

*T. alba*

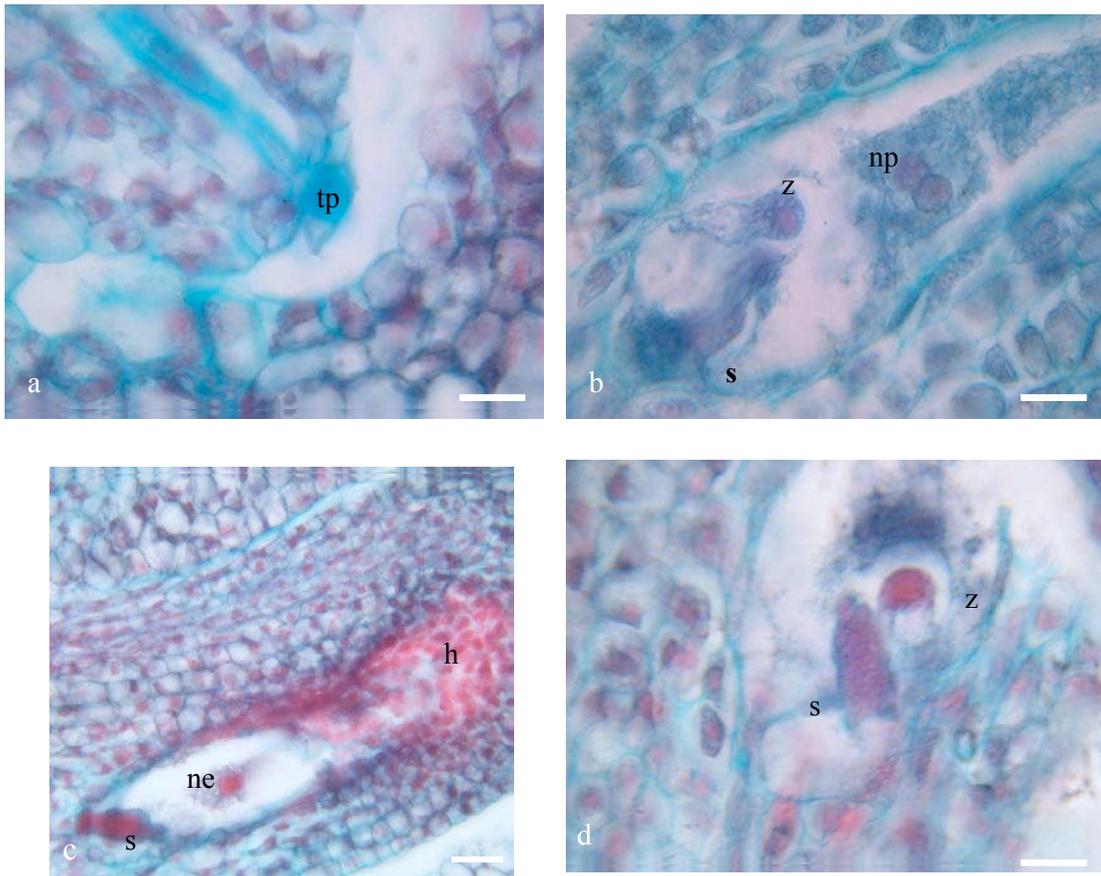
El desarrollo post-polinización en los ovarios auto-polinizados fue similar al descrito para *T. heptaphylla*.

A los 4 DPP se observaron tubos polínicos en el tejido de transmisión cuyo aspecto también resultó distinto al parénquima adyacente (Fig. 25).



**Figura 25:** Corte transversal de ovario de *T. alba*, 3 DPAP (MCC). **a-** Tejido transmisor y parénquima adyacente, **b-** detalle tejido transmisor y tubos polínicos, las flechas indican los tubos polínicos. **Abreviaturas:** tt: tejido transmisor, hv: haz vascular, p: parénquima. **Aumentos:** a, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 2  $\mu\text{m}$ .

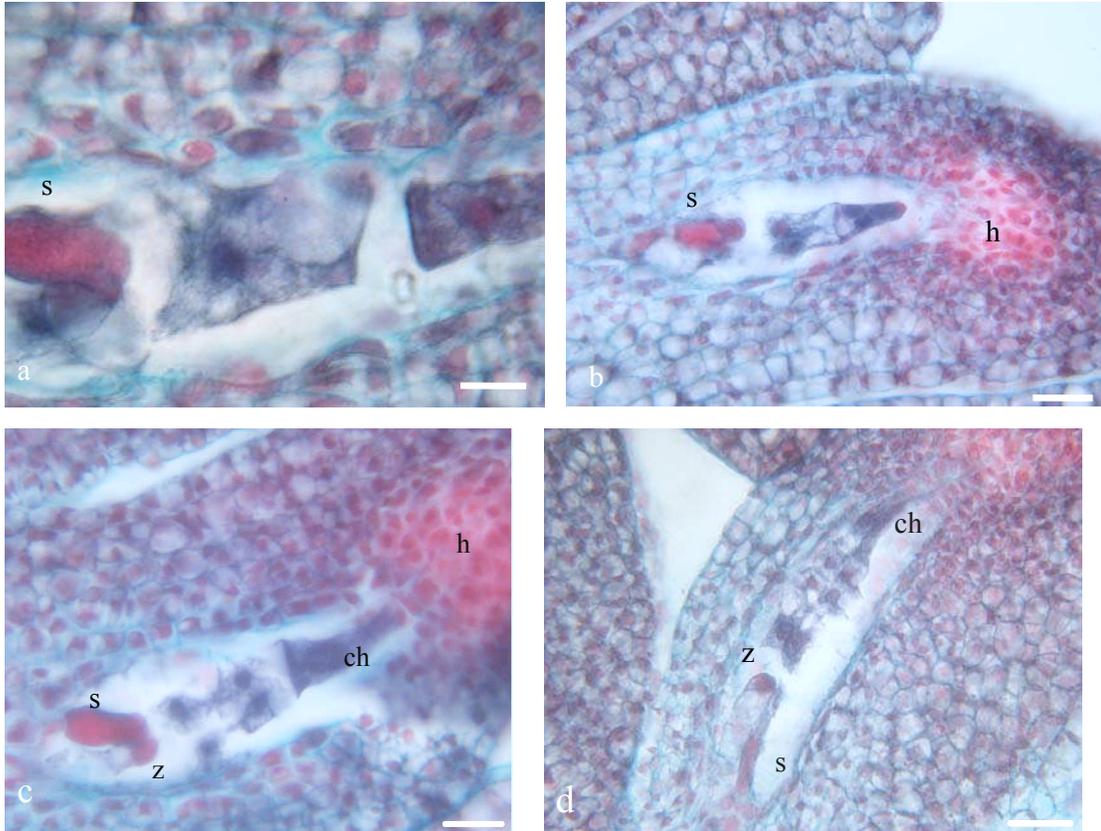
La penetración de los tubos por la micrópila fue normal (Fig. 26 a). En la Fig 26 b se presenta un detalle del cigoto y con la sinérgida degenerada que aún está presente. En este momento, la sinérgida también se observó altamente picnótica debido a la descarga del contenido del tubo polínico en su interior. Análogamente a la especie arriba descrita, los núcleos polares se observaron juntos aunque sin fusionar los nucleolos (Fig. 26 b). En la Fig. 26 c se observa el primer núcleo endospermico prominente y en la Fig. 26 d se observa un detalle del cigoto con su núcleo prominente y todavía se visualiza la sinérgida degenerada.



**Figura 26:** Corte transversal de óvulos de *T. alba*, 3 DPAP (MCC). **a-** Tubo polínico penetrando por la micrópila. **b-** saco embrionario con el núcleo de la célula central en el que se puede visualizar los dos nucleolos procedentes de sendos núcleos polares, **c-** núcleo de la célula endospermogénica, **d-** detalle del cigoto y de la sinérgida degenerada. **Abreviaturas:** tp: tubo polínico, s: sinérgida, z: cigoto, np: nucleos polares, ne: núcleo de la célula endospermogénica; h: hipóstasis. **Aumentos:** a, b, d, barras = 1  $\mu\text{m}$ ; c, barra = 2  $\mu\text{m}$ .

Se pudo determinar que el programa de desarrollo del endosperma hasta el estado 8-celular es similar en términos generales al de *T. heptaphylla*. En la Fig. 27 se presentan cortes de óvulos auto-polinizados en estados 2, 4, 6 y 8-celular del desarrollo endospermico. La diferencia que se detectó con *T. heptaphylla* radica en que, en el

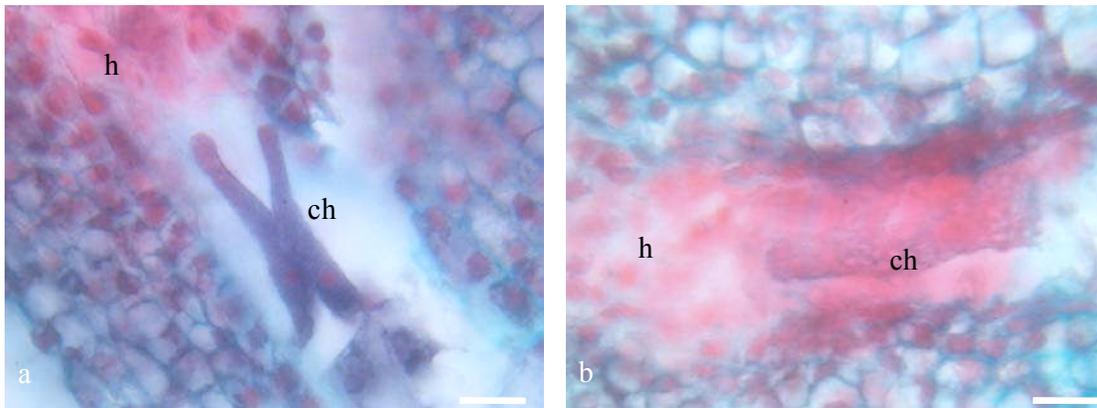
segundo ciclo mitótico la pared celular es longitudinal tanto en la célula calazal como en la micropilar.



**Figura 27:** Secuencia de desarrollo endospermico en óvulos auto-polinizados de *T. alba*, 4 DPP (MCC). **a-** endosperma 2-celular; **b-** endosperma 4-celular; **c-** endosperma 6-celular; **d-** endosperma 8-celular. **Abreviaturas:** s: sinérgida, h: hipóstasis, ch: células haustoriales, z: cigoto. **Aumentos:** a, barra = 1  $\mu\text{m}$ , b, c, d, barras = 2  $\mu\text{m}$ .

Las células haustoriales son aguzadas hacia la zona calazal e intensamente picnóticas (Fig. 27 a). En estados más avanzados se observa que crecen a expensas del tejido nucelar, el cual aparece desorganizado. Las paredes celulares adyacentes a las células haustoriales aparecen más altamente teñidas que en *T. heptaphylla* (Fig. 27 b). La hipóstasis aparece intensamente reactiva con los colorantes usados.

La abscisión de todos los pistilos auto-polinizados se produjo a los 4 DPAP. En este estado, previo a la abscisión, se halló que el desarrollo del endosperma 8-celular era el más avanzado.



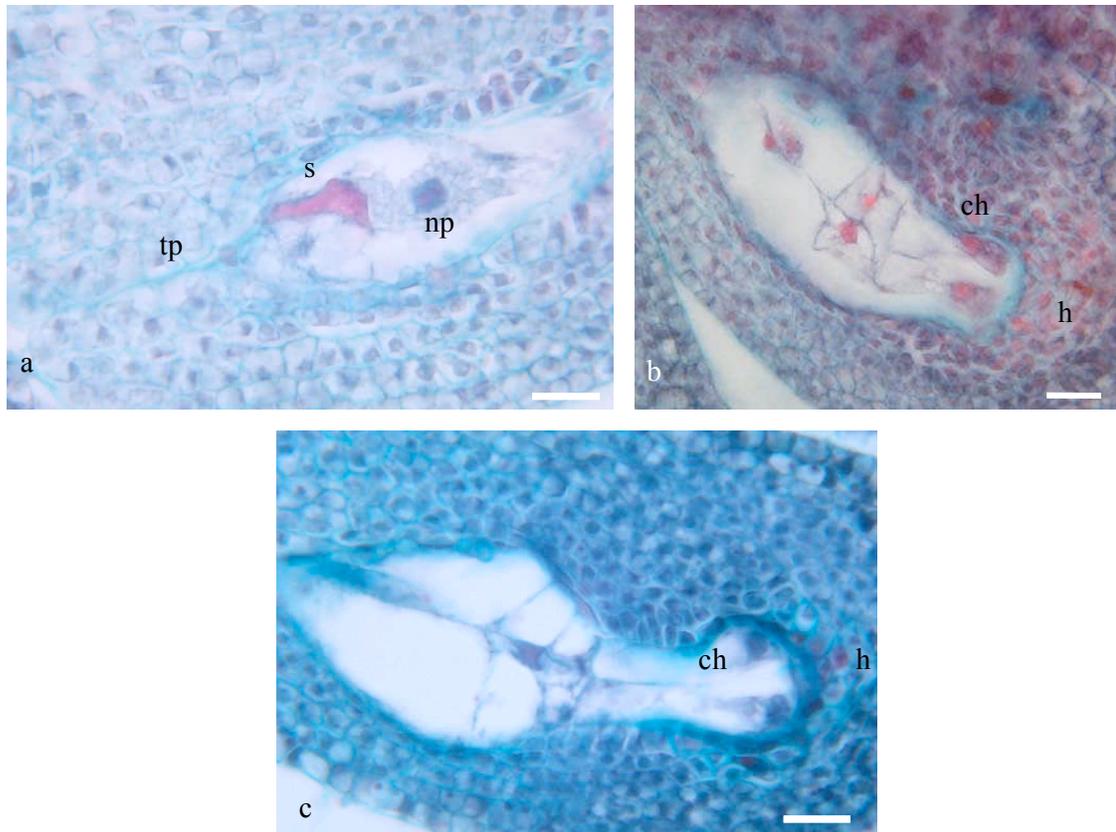
**Figura 28:** Células haustoriales (MCC). **a-** estado menos avanzado **b-** células haustoriales en contacto con la nucela. **Abreviaturas:** h: hipóstasis, ch: células haustoriales. **Aumentos:** a, b, barra = 1 µm.

### *T. pulcherrima*

La abscisión de los pistilos auto-polinizados se produjo entre los 4 y 6 DPP. A los 6 DPAP se observaron óvulos en distintos estados de desarrollo del endosperma. El estado hallado más avanzado fue el 8-celular (Fig. 29). En esta especie, se observó que la hipóstasis estaba compuesta por menor número de células que en *T. alba* y *T. heptaphylla*.

La secuencia de división mitótica endospermica siguió el mismo programa que en las especies arriba descritas. Se observó desarrollo de un endosperma haustorial calazal de células alargadas, un endosperma micropilar de células grandes y un endosperma propiamente dicho entre ambos de células más pequeñas y con núcleos prominentes (Fig. 29).

En la fecundación cruzada, a los 3 DPP, el endosperma había alcanzado un desarrollo igual (8-celular) o mayor (10-celular) y el cigoto se mantenía en reposo e indiviso; ambas características resultaron similares a las dos especies anteriormente descritas.



**Figura 29:** Corte transversal de óvulos de *T. pulcherrima*, 6 DPAP (MCC). **a-** tubo polínico penetra por la micrópila y descarga su contenido en la sinérgida, **b-** endosperma 6-celular, **c-** endosperma 8-celular. **Abreviaturas:** tp: tubo polínico, h: hipóstasis, s: sinérgida, np: núcleos polares, ch: células haustoriales. **Aumentos:** a, b, c, barras = 2 µm.

## Discusión

Este estudio permitió confirmar que en *T. heptaphylla*, *T. pulcherrima* y *T. alba* existe auto-incompatibilidad de acción tardía de acuerdo a la tipología de Seavey y Bawa (1986).

A fin de establecer el momento óptimo para la polinización se realizaron estudios de caracterización subcelular de los estigmas y de receptividad de los mismos.

La receptividad del estigma en el momento de la apertura de las ramas estigmáticas pudo ser corroborada en *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*. Para ello se utilizó la técnica del peróxido de hidrógeno que indica actividad enzimática y que también usan Dafni y Motte Maués (1998), en su estudio de metodologías para determinar la receptividad estigmática de 14 especies correspondientes a 7 familias. Entre estas especies incluyen *Tabebuia serratifolia* Rolfe. Poco antes de la apertura de las ramas estigmáticas, esta reacción también fue positiva lo que indica que en este tiempo las enzimas están activas y los estigmas eran receptivos.

Heslop Harrison y Shivana (1977) en sus estudios sobre la superficie receptiva de los estigmas de las Angiospermas, reconocen dos grandes categorías: estigmas secos y húmedos, en el primer caso presentan muy poca o nula secreción a la madurez y en el segundo un fluido conspicuo en la superficie. A pesar que en las especies aquí estudiadas no se observó el brillo que caracteriza los estigmas húmedos, con el MET se detectó la existencia de una secreción. Dicha observación permitió caracterizar a los estigmas de *Tabebuia* como húmedos, y de éste modo relacionarlos a lo conocido en otros géneros de Bignoniaceae como *Bignonia* L., *Catalpa* Scop., *Clytostoma* Miers ex Baill y *Tecomanthe* Baill. Chauhan *et al.* (1987) estudian 5 especies de la familia Bignoniaceae que presentan la particularidad de no formar frutos o lo hacen en poca cantidad. En *Crescentia cujete* L.

observan que las papilas estigmáticas de las plantas que luego producen frutos, la secreción está presente y las papilas se muestran dispuestas esparcidamente; por el contrario, en plantas que no producen frutos las papilas están secas y se disponen de forma compacta. En el presente estudio se observó que la superficie receptiva de los estigmas está constituida por dos tipos de células, papilosas y no papilosas que alternan entre sí. Asimismo se encontró que los granos de polen siempre se asocian a las células papilosas.

Las papilas son células vacuoladas con el citoplasma periférico. En sus características subcelulares son semejantes a las descritas en Commelinaceae (Owens *et al.* 1984) y en *Tibouchina semidecandra* Cogn. (Ciampolini *et al.* 1995). En los tres casos, el citoplasma está altamente polarizado, aunque se dan algunas diferencias: en las especies de *Tabebuia* aquí estudiadas la mayor cantidad de citoplasma se observó en el ápice de las papilas, por lo que resultan similares a *T. semidecandra*. En el caso de las Commelinaceae, la mayor cantidad de citoplasma se dispone en la base de las mismas. El significado de esta polarización del citoplasma encontrada en Commelinaceae, en *Tibouchina*, y ahora en *Tabebuia* merecería investigaciones posteriores a este estudio.

En el citoplasma de las papilas estigmáticas de las tres especies de *Tabebuia*, se observó retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y mitocondrias lo cual indica una intensa actividad metabólica y sugiere que el exudado presente sobre su superficie podría ser allí mismo generado. Estas características son coincidentes con los estudios llevados a cabo en estigmas de *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai por Sedgley (1981) ya que asocian la presencia de dictiosomas y retículo endoplásmico rugoso al exudado estigmático. Este ha sido el primer reporte sobre las características de las papilas estigmáticas en Bignoniaceae a nivel subcelular. Sólo se habían descrito las papilas de *Tecoma stans* L. usando microscopía electrónica de barrido (Singh y Chauhan, 1996).

Es interesante mencionar que la forma alargada de las papilas ha sido asociada a la receptividad estigmática. En el caso de mutantes de *Arabidopsis thaliana* Schur. (*adl1*), que presentan defectos en la pared celular y en la membrana plasmática de las papilas, éstas últimas son cortas y la mutante, infértil (Edlund *et al.* 2004). También, Singh y Chauhan (1996) mencionan que en *T. stans* las papilas estigmáticas son más cortas en períodos en los cuales las plantas no producen semillas. Se ha probado en experimentos de ablación de las papilas en *Brassica napus* L. que ellas son indispensables para que se produzca la polinización (Kang y Nasrallah, 2001).

La demostración del proceso de autofagia del citoplasma hallado en las papilas cuando el estigma está en estado receptivo revela un mecanismo por el cual la célula degrada o moviliza sus nutrientes. Según Van Doorn y Woltering (2005), la autofagia está relacionada a la muerte celular programada y tiene al menos dos funciones, salva a la célula de la muerte y provoca la degradación de los componentes celulares antes de su muerte. Sobre la base de estos conceptos, se puede inferir que las papilas estigmáticas en su desarrollo entran en un programa de muerte celular, programa que se inicia poco antes de la llegada del polen.

Se detectó la emisión de P, S, K y Ca en las papilas estigmáticas de *T. heptaphylla* previo a la polinización con el uso de una microsonda dispersiva en energía (EDAX). Iwano *et al.* (1999) encuentran estos mismos elementos en papilas de estigmas de *Brassica campestris* L. El estudio de la relación entre el patrón de emisión de elementos químicos y la auto-incompatibilidad en el género *Tabebuia* es todavía preliminar. Más aún, éste es el primer reporte en la familia Bignoniaceae. Luego de la polinización, se observó un aumento de la emisión de K, dicho aumento podría estar asociado al movimiento de agua desde la papila al grano de polen. Al respecto, Rehman y Yun (2006) afirman que el K regula la dehiscencia de las anteras, la imbibición del polen y la hidratación de las papilas

estigmáticas de *Hordeum vulgare* L. lo que permite la polinización y posterior fertilización. El rol del Ca en las rutas de señalización de procesos biológicos y su importancia en la fertilización está bien documentado en la revisión realizada por Rudd y Franklin-Tong (2001). Ellos señalan que la generación de señales de Ca está presente en la polinización ya sea exitosa o no. En este trabajo se detectó Ca en papilas estigmáticas y en el polen luego de la auto-polinización y de la polinización cruzada. Se observó también un aumento de este elemento en papilas a los 2 DPPC. Singh *et al.* (1989) también reportaron que en el polen de *B. oleracea* L. se produce un aumento de la señal del Ca luego de la auto-polinización.

El hecho de que los pistilos auto-polinizados de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* no desarrollen en frutos refleja que las tres especies son auto-incompatibles. En este trabajo, un único fruto se obtuvo en uno de los genotipos de *T. heptaphylla*. En la misma especie, Bittencourt y Semir (2005), en su estudio sobre biología floral en Bignoniaceae, habían encontrado un genotipo en el que 28.9 % de flores auto-polinizadas producían frutos. Aquí cabe destacar que algunos factores, tales como las altas temperaturas podrían contribuir para superar la auto-incompatibilidad, lo cual probablemente podría atribuirse al hecho de que algunos inhibidores del crecimiento del tubo polínico son inactivos cuando las plantas son expuestas a temperaturas altas (Van Tuyl, 2005). Por otra parte, Lipow y Wyatt (1999) afirman que los sistemas de auto-incompatibilidad raramente son absolutos ya que los estudios genéticos a menudo revelan plantas fértiles en algunas especies reconocidas como auto-incompatibles. Por tal motivo, no sería correcto afirmar que *T. heptaphylla* fuera auto-compatible como sugieren Bittencourt y Semir (2005), al encontrar cierto grado de formación de frutos en las auto-polinizaciones sin una investigación más profunda de este aspecto.

El porcentaje de frutos producidos cuando se llevó a cabo la polinización cruzada fue de 72, 35.7 y 80% en *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* respectivamente. A pesar que estos valores no llegaron al 100% resultaron más altos a los observados en *T. caraiba*, *T. ochracea* (Gibbs y Bianchi, 1993), *T. nodosa* (Gibbs y Bianchi, 1999), *T. aurea* (Barros, 2001) y *T. heptaphylla* (Torreta *et al.* 2002). Los valores más altos encontrados en este estudio pueden atribuirse a que las polinizaciones se realizaron en condiciones de invernáculo y con control de temperatura, diferente entonces a las condiciones de campo en que fueran realizados los trabajos antes mencionados.

Las observaciones del crecimiento del tubo polínico en pistilos auto-polinizados revelaron que la interrupción del crecimiento de los mismos en las tres especies aquí estudiadas tiene lugar luego de la penetración en los óvulos. A pesar de ello se detectó un retraso en la velocidad de crecimiento de los mismos con respecto a la polinización cruzada. Dicha diferencia también fue evidente en los estudios en *T. nodosa* realizados por Gibbs y Bianchi (1999) y en *Heuchera micrantha* var. *diversifolia* (Rydb.) Rosend., Butters & Lakela (Rabe y Soltis, 1999).

Por otra parte, se halló en *T. heptaphylla* un patrón de deposición de calosa diferencial en los tapones de los tubos polínicos en la auto-polinización con respecto a la polinización cruzada que hasta el momento no había sido reportado: fue mayor el número de tapones, como el tamaño de los mismos, es decir hubo mayor deposición de calosa. No se observó interrupción del crecimiento de los tubos polínicos por lo que se podría inferir que esta mayor deposición de calosa en los tapones de los tubos en la auto-polinización sería la posible causa del retraso de la velocidad de crecimiento de los mismos. La mayor cantidad de estos tapones largos en la auto-polinización evidencian las diferencias en la capacidad de crecimiento de los tubos en cada zona evaluada del pistilo. Las anomalías en la deposición de calosa en otras especies han sido asociadas a

cruzamientos incompatibles. En *Nicotiana alata* Link & Otto (Lush y Clarke, 1997) los tubos polínicos en cruzamientos incompatibles fueron caracterizados por deposición diferencial de calosa en las paredes y por la presencia de tapones más cercanos entre ellos e irregularmente esparcidos.

En todas las zonas del pistilo los tubos polínicos crecen formando un haz muy apretado, lo que hace imposible tanto el recuento de tubos como el encontrar las puntas de cada uno de los mismos. Dicha dificultad había sido señalada en *Dipterocarpus tempehes* Slooten (Kenta *et al.* 2002) y en *Heuchera micrantha* var. *diversifolia* (Rydb.) Rosend., Butters & Lakela (Rabe y Soltis 1999). En *D. tempehes* los autores señalan que en la polinización cruzada la proporción de tubos polínicos que entran al estilo es 1.7-2.3 mayor que en la auto-polinización, lo que indicaría una auto-incompatibilidad parcial en el nivel de estigma. La presencia casi exclusiva de tapones largos en tubos polínicos de *T. heptaphylla* en los estigmas de pistilos auto-polinizados podría estar indicando un mecanismo parcial de auto-incompatibilidad en el estigma tal como sucede en *D. tempehes*. En *H. micrantha* se estimó mayor cantidad (50 %) de tubos polínicos en el ovario en la polinización cruzada que en la auto-polinización. En las especies estudiadas, no fue evidente una diferencia conspicua en lo que respecta a la cantidad de tubos polínicos que llegan a los óvulos de los pistilos auto-polinizados con respecto a aquellos con polinización cruzada. Esta observación es consistente con los valores de *T. caraiba* reportados por Gibbs y Bianchi (1993).

Sage *et al.* (1999) observaron que en *Narcissus triandrus* L. la auto-incompatibilidad, primeramente descrita como ovárica, opera pre-cigóticamente presumiblemente por la ausencia de un estímulo adecuado de los tubos polínicos que resulta en la degeneración del saco embrionario. Nettancourt (2005) analiza estos resultados y sugiere que la auto-incompatibilidad ovárica en muchas especies podría actuar

bajo algún mecanismo de control gametofítico. La auto-incompatibilidad de acción tardía descrita para *Tabebuia* en este estudio, podría estar, al igual que en *Narcissus*, regida también por un tipo de control pre-cigótico.

Esta característica diferencial en la deposición de calosa y la diferencia en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos en la polinización cruzada con respecto a la auto-polinización pueden apoyar, al menos en parte, la hipótesis de que existe una interacción entre el tubo polínico y el pistilo en *Tabebuia*. Los estudios realizados en el género *Ceiba* Mill. por Gibbs *et al.* (2004) señalan la posible existencia de un mecanismo de interacción entre los tubos polínicos y el pistilo utilizando técnicas de polinizaciones *chase* (auto-polinización seguida de polinización cruzada a intervalos regulares) y *mixed* (auto-polinización y polinización cruzada conjuntamente). Estudios de este tipo serían interesantes para el género *Tabebuia* aunque son de difícil ejecución ya que, una vez realizada la primera polinización, el estigma al ser retráctil, cierra sus ramas e impiden la realización de una segunda.

Las características de los sacos embrionarios maduros y el desarrollo del endosperma resultaron similares en términos generales a los descritos en otras especies de la familia Bignoniaceae (Johri *et al.* 1992; Bittencourt y Semir, 2005). Del mismo modo, tanto en la auto-polinización como en la polinización cruzada, el tipo de desarrollo corresponde al tipo *Parmentiera* (género de Bignoniaceae) descrito por Govindu (1959).

Se observó en la zona calazal, una hipóstasis desarrollada y formada por células de paredes gruesas y se identificó a la calosa como componente de la misma. Según Bouman (1984) la estructura y función de la hipóstasis son poco conocidas, y la caracteriza como una zona compuesta por células de citoplasma denso que pueden acumular sustancias que producen engrosamiento de las paredes tales como: cutina, suberina, lignina y calosa.

En los sacos embrionarios de los óvulos contenidos en los pistilos auto-polinizados de *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima* se produjo la descarga de gametas en una de las sinérgidas y luego la doble fecundación. Posteriormente se produjo el desarrollo del endosperma siguiendo el mismo programa que aquel que se lleva a cabo en los pistilos con polinización cruzada. Este desarrollo se interrumpe en el momento de la abscisión de los pistilos auto-polinizados. En las tres especies estudiadas, en el momento de la abscisión el endosperma alcanza un desarrollo máximo de 8-células. En ningún caso se detectaron síntomas de malfuncionamiento por lo que la doble fecundación y el desarrollo del endosperma no parecen ser la causa del aborto que se produce en estos estados.

El estado uniforme de desarrollo embrionario y del endosperma en el momento de la abscisión floral y la caída de las flores en idéntico estado de desarrollo da indicios suficientes para distinguir que se trata de un sistema de auto-incompatibilidad que no se puede confundir con la depresión por endogamia. El aborto surgido por depresión por endogamia no se produce en un único estado crítico de desarrollo sino ocurre en una variedad de estados que siguen a la doble fecundación (Sage *et al.* 1999). Estos resultados concuerdan con los hallados por Bittencourt y Semir (2005) para *T. impetiginosa* y por Gibbs y Bianchi (1993) para *T. caraiba* y *T. ochracea*.

La velocidad de crecimiento y el patrón de deposición de calosa diferencial entre la auto-polinización y polinización cruzada hallados en este estudio demuestran que existen mecanismos asociados a la auto-incompatibilidad que operan también en el estigma y estilo. Sobre la base de estas observaciones ¿se puede afirmar que la auto-incompatibilidad de acción tardía según Seavey y Bawa (1986) es un caso especial de auto-incompatibilidad gametofítica? Franklin-Tong y Franklin (2003) afirman que a pesar que la auto-incompatibilidad gametofítica está presente en 60-90 familias, sólo dos sistemas están estudiados. El sistema S-RNAasa, primeramente encontrado en Solanaceae y luego en

Rosaceae, Scrophulariaceae y Campanulaceae, y el sistema presente en las Papaveraceae en el cual se produce un aumento del Ca citosólico libre en tubos polínicos incompatibles. Debido a ello, estos autores se preguntan cuántos otros mecanismos podrían existir, ya que en la mayoría de las familias no se ha estudiado el sistema de auto-incompatibilidad que presentan. Este estudio propone que en *Tabebuia* existe algún tipo de señalización entre el tubo polínico y el pistilo que hace que los tubos polínicos en la auto-polinización crezcan más lentamente y se produzca en ellos mayor deposición de calosa. Ambos procesos podrían estar relacionados estrechamente. Se puede afirmar que existen procesos que operan en el estilo, típicos de la auto-incompatibilidad gametofítica.

## **Inducción de poliploidía en dos especies de *Tabebuia***



## Introducción

La poliploidización es una herramienta muy utilizada en el mejoramiento de plantas ornamentales. Los efectos morfológicos y fisiológicos de la poliploidía varían en los distintos materiales. Uno de los efectos más comunes es el aumento del tamaño de los órganos, lo que permite que sean más frondosos y vigorosos que sus correspondientes diploides. En el mejoramiento de las plantas ornamentales, la poliploidía ha permitido la obtención de individuos de forma más compacta por reducción de la longitud de los entrenudos, con flores más grandes, de colores más intensos, y con un período de floración más prolongado. Entre otros ejemplos, cabe mencionar *Dianthus caryophyllus* L. (Yamaguchi, 1989) y *Cyclamen persicum* Mill. (Takamura y Miyajima, 1996) en los que la obtención de plantas tetraploides produce genotipos con flores más grandes y de colores más intensos. En *Eustoma gradiflora* (Raf.) Schindlers, las plantas tetraploides tienen tallos más gruesos lo que permite mejor soporte para las flores (Griesbach y Bhat, 1990). Tallos más gruesos y flores más grandes caracterizan también los genotipos tetraploides de *Lilium* (Van Tuyt, 1992).

Los cruzamientos a nivel tetraploide producen progenies muy variables debido a la ocurrencia de cuatro alelos para cada locus lo que da la posibilidad de interacciones alélicas y diversas combinaciones, siendo así una fuente de variación importante en planes de mejoramiento (Horn, 2002).

En el caso de las plantas leñosas, la inducción de la poliploidía ha sido poco abordada debido al largo período juvenil que en general las caracteriza (Väinölä, 2000).

La obtención de poliploides es encarada también como un paso intermedio para la obtención de plantas triploides. Los individuos triploides en muchos casos son estériles lo que produce un alargamiento en el período de floración tal como sucede en

*Begonia* L., *Ageratum* L. y *Tagetes* L. Sin embargo, esta técnica no ha sido muy difundida porque, en general, los cruzamientos entre especies diploides y tetraploides no han sido muy exitosos (Horn, 2002).

Un valor adicional de la obtención de poliploides es la pérdida de la auto-incompatibilidad a través de alteración de ciertos sistemas, aún no elucidados desde el punto de vista molecular (Comai, 2005). Este efecto, reportado para *Petunia hybrida* Vilm., se produce probablemente como resultado de interacciones alélicas en el polen diploide (Entani *et al.*, 1999). Es importante destacar que las plantas auto-incompatibles son típicamente diploides y por el contrario, los individuos tetraploides derivados de las mismas son comúnmente auto-compatibles (Goldz *et al.*, 2000).

La inducción de la poliploidía supone la interrupción de la secuencia normal de la división celular, y la misma puede ser provocada por diferentes agentes. Por ejemplo, los golpes de frío o calor conducen a veces a la duplicación cromosómica (Allard, 1980).

El agente poliploidizante más popular y más exitosamente utilizado es la colchicina. La colchicina es un alcaloide que se obtiene de los cormos de *Colchicum autumnale* L. Para que sea efectiva debe mantenerse en una concentración crítica. Si dicha concentración se mantiene, la duplicación cromosómica puede repetirse; por el contrario, si su aplicación se interrumpe vuelve a formarse el huso (Allard, 1980). La colchicina actúa inhibiendo la polimerización de la tubulina y de este modo impide la migración de los cromosomas en anafase. Según Hancock (1997) más de 150 especies han sido poliploidizadas utilizando la colchicina como mutágeno. También se han utilizado con éxito otros compuestos que inhiben la actividad mitótica tales como orizalina y surflan, estas sustancias resultan menos tóxicas para el ser humano; a pesar

de ello no se ha extendido mayormente su uso debido al considerable mayor costo de los mismos (Takamura *et al.* 2002).

### **Objetivo general**

Establecer la factibilidad del uso de la poliploidía como fuente de variación en *Tabebuia*.

### **Objetivos parciales**

- (i) Caracterizar los individuos poliploides
- (ii) Verificar la posibilidad de la obtención de individuos triploides estériles
- (iii) Establecer la relación entre poliploidía y auto-incompatibilidad

### **Materiales y métodos**

#### *1- Inducción de poliploidía*

Los experimentos se realizaron a partir de semillas provenientes de individuos seleccionados por florecer en estados tempranos del desarrollo de *T. heptaphylla* (20010813x25) y *T. pulcherrima* (20010927A1)- ver **Anexo I**, Tabla 2-.

En *T. heptaphylla*, las semillas recientemente se trataron con colchicina (Sigma C9754) en solución acuosa en concentración del 0, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 % durante 24 y 48 horas a 25° C. Se realizaron 4 repeticiones de 25 semillas por tratamiento. Luego de los tratamientos, las semillas se lavaron tres veces con abundante agua destilada y se

sembraron en cajas plásticas de 13 x 20.5 cm, sobre tres papeles de filtro humedecidos con agua destilada y un papel por encima de las mismas. A los 20 días se evaluó la cantidad de semillas germinadas y se repicaron a bandejas alveoladas (plugs) en sustrato compuesto por turba, perlita, vermiculita (1:1:1). A los 35 días se trasplantaron a macetas de 10 cm de diámetro.

En *T. pulcherrima*, sobre la base a los resultados del ensayo de poliploidización en *T. heptaphylla*, se evaluaron concentraciones mayores de colchicina. Se consideraron concentraciones de 0, 0.2, 0.4 y 0.6% de colchicina en solución acuosa durante 24 y 48 horas a 25° C. Luego de los tratamientos se procedió de igual manera que para el caso de *T. heptaphylla*.

## 2- Análisis del nivel de ploidía

En las dos especies, cuando las plantas tuvieron al menos 4 hojas verdaderas se tomaron muestras de hojas de 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente de todas las plántulas obtenidas. Los trozos de hojas fueron cortados con una hoja de afeitar sobre un buffer de extracción (Otto buffer 1) que consistió en 0.1 M de ácido cítrico monohidratado y 0.5 % de tween 20 (Otto, 1990). La suspensión que contenía los núcleos libres fue pasada por un filtro de 50 µm y luego teñida con una solución al 4 µg/l de bicloruro 4',6-diamidina 2-fenil-indol -DAPI-(Sigma, D9564) en una solución buffer (Otto buffer 2) compuesta por 0.4M Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>. Las muestras fueron analizadas por densitometría de flujo (PARTEC, PA, Alemania). El contenido relativo de ADN fue estimado a través de los picos de fluorescencia obtenidos.

Como resultado complementario, se midió el largo y ancho de estomas con opérculo abierto de plantas diploides (control) y plantas tetraploides evaluadas

previamente por densitometría de flujo. Para ello se extrajo la epidermis abaxial de las hojas maduras con una pinza de punta fina (previo corte superficial), y el tejido se montó sobre un portaobjetos con una gota de agua. Se midió el largo y ancho de 60 estomas usando un microscopio de campo claro.

### 3- Cruzamientos entre individuos con distinto nivel de ploidía

Se realizaron cruzamientos controlados entre plantas diploides y tetraploides de *T. heptaphylla*. Para ello se castraron las flores 1 día antes de su antesis y se eliminó la corola para evitar la atracción de polinizadores. En antesis, se procedió a la polinización con polen fresco. También se realizaron auto-polinizaciones en las plantas diploides y tetraploides.

En todos los casos se consideró el número de frutos por cruzamiento, el número de semillas por fruto y el poder germinativo de estas últimas, inmediatamente seguido de la cosecha. Para ello, las semillas se sembraron sobre vermiculita húmeda, se cubrieron con bolsas de nylon y se colocaron en cámara a  $25 \pm 2$  ° C.

Se caracterizó el crecimiento de los tubos polínicos en los cruzamientos entre individuos con diferente nivel de ploidía y en la auto-polinización con el uso del fluorocromo azul de anilina que reacciona con las paredes de calosa y los tapones depositados a lo largo del recorrido del tubo polínico descrito en el **Capítulo I**

### 4- Caracterización de los poliploides

Se cultivaron las plantas diploides y tetraploides en condiciones de invernáculo. Para el caso de *T. heptaphylla* también se cultivaron las plantas triploides obtenidas a

partir del cruzamiento entre individuos diploides y tetraploides. Se evaluaron las características morfométricas de las flores: diámetro mayor y menor de la corola, largo y ancho del tubo corolino y grosor de los pétalos. Para ello se utilizó un escalímetro digital (Mitutoyo, Japón). Se evaluaron 10 flores por planta.

Se midió la altura de las plantas con distinto nivel de ploidía en diferentes períodos de crecimiento.

Se evaluó el color de las hojas maduras con un colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-321, Japón) por lectura directa de los valores a y b.

La viabilidad del polen de las plantas triploides obtenidas se evaluó por el método de Greissl (1989). Para ello, se colocó polen fresco en un portaobjetos con una gota de una solución de sacarosa 0.5 M durante 15 min, luego se agregó una gota de diacetato de fluoresceína (Sigma, F7378) y una de ioduro de propidio (Sigma, P4170), se dejó actuar 10 min, luego se colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio de epi-fluorescencia con la combinación de filtros de excitación y emisión de 330-385 nm y 420 nm, respectivamente. Se analizaron aproximadamente 300 granos de polen por individuo híbrido. Se consideraron como viables los granos de polen de color verde intenso.

##### *5- Análisis estadístico:*

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Estatistica* versión 6.1 Stat Soft®.

## Resultados

### 1, 2- Inducción y análisis de la poliploidía

#### *T. heptaphylla*

En tabla 1 se presenta el resultado del análisis por densitometría de flujo de cada una de las plantas correspondientes a todos los tratamientos evaluados. Como puede leerse en la misma, se obtuvieron dos individuos tetraploides con la aplicación de 0.4 % de una solución de colchicina durante 48 horas a 25° C. Con la misma concentración también se obtuvo una planta octoploide, que no evolucionó, y dos plantas quiméricas debido al desarrollo simultáneo de tejido 2x y 4x.

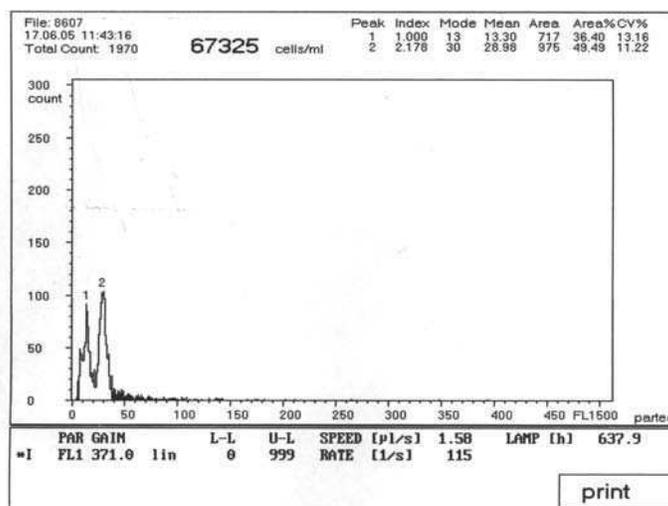
La Fig. 1 muestra el espectro obtenido por densitometría de flujo que representa la cantidad relativa de ADN en plantas diploides y tetraploides de *T. heptaphylla*. Los valores promedio de fluorescencia relativa fueron 13.3 y 28.9 para una planta diploide y tetraploide, respectivamente.

Los tratamientos con concentraciones más bajas de colchicina no fueron eficientes para la obtención de individuos poliploides y sólo se recuperaron individuos diploides (Tabla 1). No se detectó efecto tóxico de la colchicina en las concentraciones evaluadas ya que el poder germinativo no fue afectado por el tratamiento. A pesar de ello, en las concentraciones más altas (0.2 y 0.4%) se obtuvieron plantas quiméricas que no evolucionaron.

No se presentan los datos correspondientes a los tratamientos de colchicina durante 24 horas debido a que, en este período, sólo se obtuvieron plantas diploides y no hubo pérdida del poder germinativo de las semillas por toxicidad de la colchicina.

**Tabla 1:** Análisis por densitometría de flujo del efecto de la concentración de colchicina en la inducción de poliploidía en *T. heptaphylla*

Concentración de colchicina (%) /48 hs	Semillas Germinadas (N°)	2 x (N° plantas)	4 x (N° plantas)	8 x (N° plantas)	2 x + 4 x (N° plantas)
0.00	96	96	0	0	0
0.05	92	92	0	0	0
0.10	94	94	0	0	0
0.20	85	84	0	0	1
0.40	86	81	2	1	2



**Figura 1:** Cantidad relativa de ADN en una plantas diploide y una tetraploide de *T. heptaphylla* obtenida por densitometría de flujo. En la abscisa está representada la fluorescencia relativa (escala lineal, arbitraria) y en la ordenada el número de células contadas.

El tamaño de los estomas de plantas diploides y tetraploides de *T. heptaphylla* presentó diferencias significativas (Tabla 3). El largo y ancho promedio de los mismos para las plantas tetraploides fue de 3.02  $\mu\text{m}$  y 2.24  $\mu\text{m}$  respectivamente, mientras que para las diploides fue de 2.58  $\mu\text{m}$  y 1.77  $\mu\text{m}$ .

*T. pulcherrima*

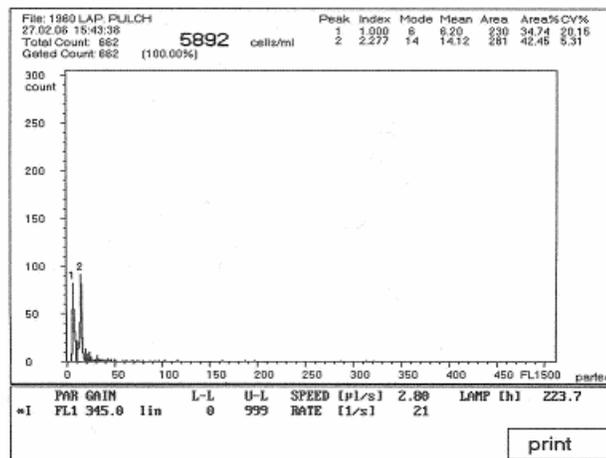
En la Tabla 2 se presentan los datos de los análisis por densitometría de flujo de las plántulas correspondientes a los distintos tratamientos de colchicina.

Los tratamientos con 0.4 y 0.6 % de colchicina durante 48 horas produjeron 11 y 17 plantas tetraploides respectivamente. En estos tratamientos también se obtuvieron plantas octoploides que no prosperaron. En todos los tratamientos se obtuvieron plantas quiméricas. En todos los tratamientos entre el 46 y 63 % de las semillas no germinaron debido a la toxicidad de la colchicina.

**Tabla 2:** Análisis por densitometría de flujo del efecto de la concentración de colchicina en la inducción de poliploidía en *T. pulcherrima*.

Concentración de colchinina (%) / tiempo	Semillas germinadas	2x	4x	8x	2x + 4x	Semillas muertas
0.0/24 hs	93	93	0	0	0	7
0.2/24 hs	54	49	1	0	4	46
0.4/ 24 hs	37	29	4	0	4	63
0.6/24 hs	47	37	6	1	3	53
0.0/48 hs	93	93	0	0	0	7
0.2/48 hs	41	38	0	3	3	59
0.4/48 hs	44	25	11	8	8	56
0.6/48 hs	50	29	17	3	3	50

En la Fig. 2 se presenta la cantidad relativa de ADN en una planta diploide y una tetraploide de *T. pulcherrima* obtenida por densitometría de flujo, siendo los valores de fluorescencia relativa promedio 6.20 y 14.12, respectivamente.



**Figura 2:** Cantidad relativa de ADN en una planta diploide y una tetraploide de *T. pulcherrima* obtenida por densitometría de flujo. En la abscisa está representada la fluorescencia relativa (escala lineal, arbitraria) y en la ordenada el número de células contadas.

El tamaño de los estomas para el caso de *T. pulcherrima* presentó la misma tendencia que en *T. heptaphylla*, siendo el largo y ancho de los mismos de 3.03 x 2.03  $\mu\text{m}$  y 2.18 x 1.75  $\mu\text{m}$  para plantas tetraploides y diploides, respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3:** Tamaño de los estomas (largo y ancho) de plantas tetraploides y diploides de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima*.

Especie	Nivel de ploidía	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
<i>T. heptaphylla</i>	4 x	3.02 $\pm$ 0.16 a	2.24 $\pm$ 0.22 a
	2 x	2.58 $\pm$ 0.15b	1.77 $\pm$ 0.06 b
<i>T. pulcherrima</i>	4 x	3.03 $\pm$ 0.16 a	2.03 $\pm$ 0.17 a
	2 x	2.18 $\pm$ 0.14 b	1.75 $\pm$ 0.16 b

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ). El análisis es por especie.

### 3- Cruzamientos entre individuos con distinto nivel de ploidía

Los cruzamientos realizados entre individuos con diferente nivel de ploidía se presentan en la Tabla 4. Fue posible la obtención de individuos triploides a partir de los cruzamientos entre individuos diploides y tetraploides de *T. heptaphylla*. El cruzamiento recíproco no produjo descendencia.

El análisis del nivel de ploidía utilizando densitometría de flujo se presenta en la Fig. 3. El pico correspondiente a las plantas triploides ocupó una posición intermedia entre los picos de las plantas diploides y tetraploides.

La auto-polinización en el nivel diploide no produjo frutos a diferencia del nivel tetraploide, donde se obtuvieron 20 frutos a partir de las 30 flores que fueron auto-polinizadas (Tabla 4).

**Tabla 4:** Producción de frutos (%) en los cruzamientos entre genotipos con diferente nivel de ploidía y en las auto-polinizaciones de *T. heptaphylla* ( $2x$  y  $4x$ ).

♀/♂	$4x$	$2x$
$2x$	92.9 (26/28)	0 (0/30)
$4x$	66.7 (20/30)	0 (0/20)

Los números entre paréntesis indican número de frutos obtenidos/ flores polinizadas.

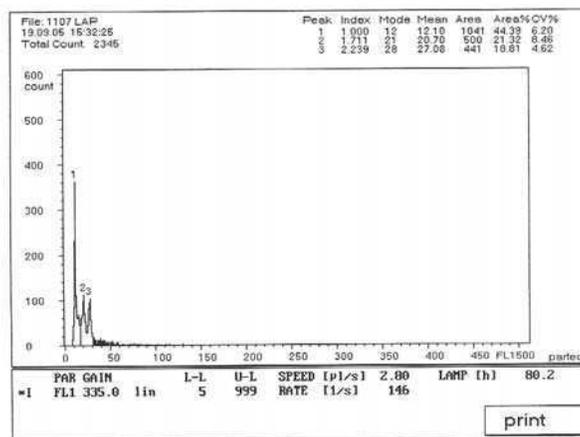
La cantidad de semillas obtenidas en los cruzamientos, su poder germinativo y el análisis del nivel de ploidía de la descendencia (por densitometría de flujo) se presenta en la tabla 5. El porcentaje de germinación de las semillas obtenidas en el caso de la auto-polinización del genotipo tetraploide y en los cruzamientos entre plantas diploides y tetraploides fue de 44.2 % y 15.8 %, respectivamente. En el primer caso la

descendencia fue 100 % tetraploide. En el segundo caso, 98.1 % fue triploide y sólo 1.9%, tetraploide.

**Tabla 5:** Semillas por fruto (N°), poder germinativo (%) y número de plántulas 2 x, 3 x y 4 x analizadas por densitometría de flujo en cruzamientos exitosos.

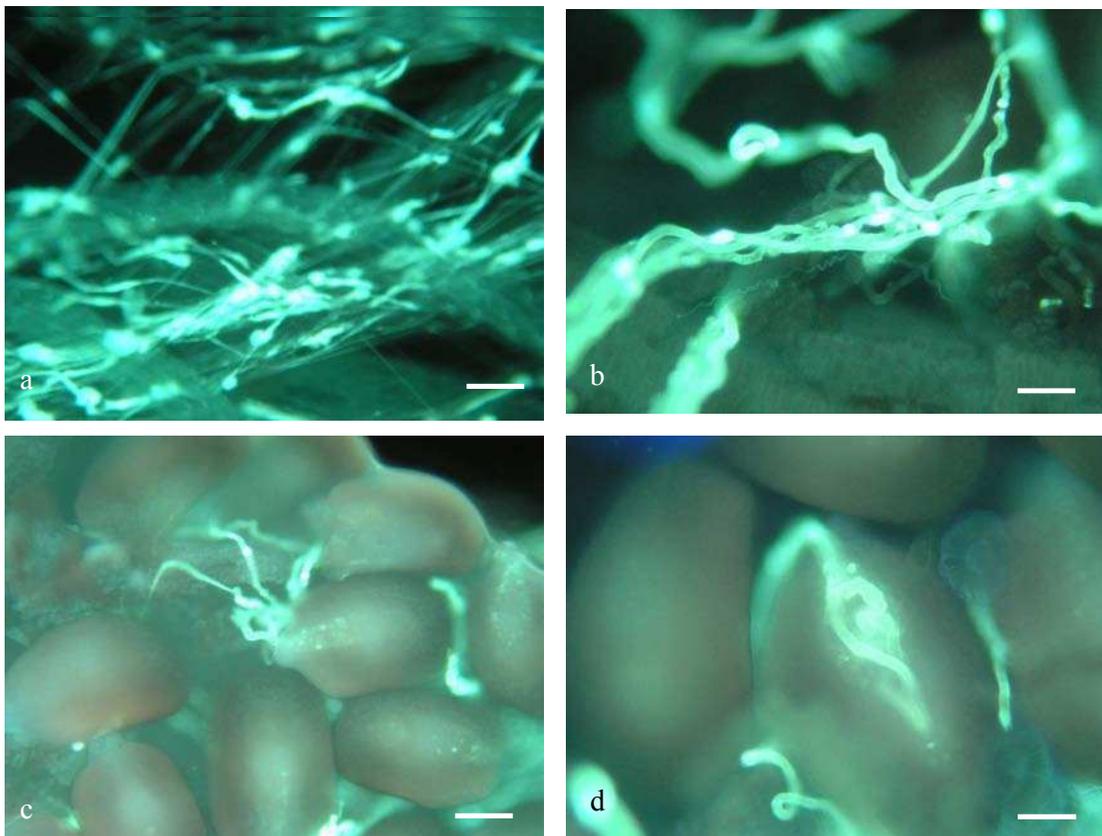
	4x x 4x (auto-polinización)	2x x 4x
Semillas/frutos (N°)	89 ± 42.4	42 ± 15.9
Germinación (%)	44.2	15.8
Plántulas (N°)	48	53
Plántulas 2x (N°)	0	0
Plántulas 3x (N°)	0	52 (98.1 %)
Plántulas 4x (N°)	48 (100 %)	1 (1.9 %)

En la Fig. 3 se presenta conjuntamente la fluorescencia relativa correspondiente a una planta diploide, triploide y tetraploide de *T. heptaphylla*, siendo los valores promedios 12.10, 20.70 y 27.08, respectivamente.



**Figura 3:** Cantidad relativa de ADN en una plantas diploide, una triploides y una tetraploide de *T. heptaphylla* obtenida por densitometría de flujo. En la abscisa está representada la fluorescencia relativa (escala lineal, arbitraria) y en la ordenada el número de células contadas.

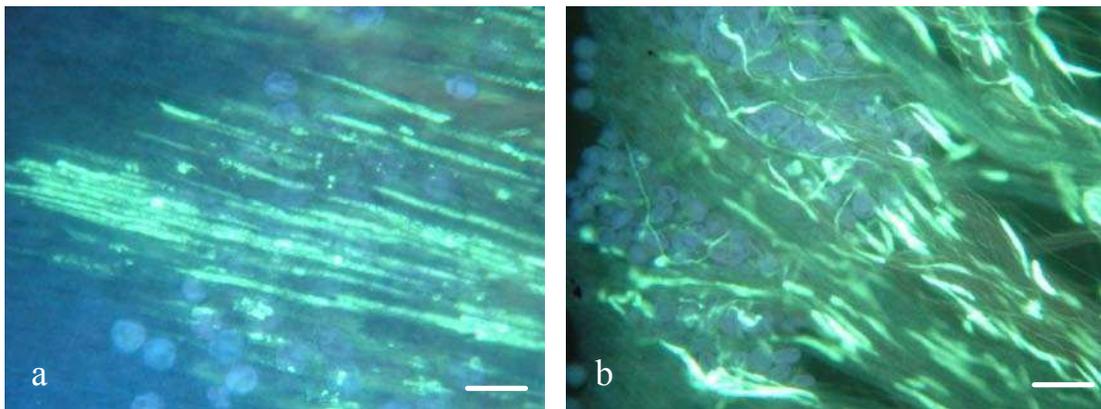
El estudio del crecimiento del tubo polínico en los pistilos llevado a cabo por la técnica de detección de la calosa, demostró que en los cruzamientos entre *T. heptaphylla* 2x y *T. heptaphylla* 4x los tubos polínicos germinaron, crecieron a lo largo del estilo, llegaron al ovario y penetraron normalmente en los óvulos a través de la micrópila. En el cruzamiento recíproco (*T. heptaphylla* 4x x *T. heptaphylla* 2x) se observaron tapones de calosa de mayor tamaño que en los cruzamientos compatibles (Fig. 4 a). Los tubos polínicos crecieron hasta el ovario aunque se presentaron tortuosos (Fig. 4 b). Se observaron anomalías en el crecimiento tales como la penetración de varios tubos en un mismo óvulo y también crecimiento sinuoso del mismo alrededor del saco embrionario (Fig. 4 c y d).



**Figura 4:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. heptaphylla* 4x y *T. heptaphylla* 2x, 4 DPP (MF). **a-**tubos polínicos en la primera mitad del estilo, **b-** tubos polínicos en el ovario, **c-** tubos polínicos penetrando por la micrópila (nótese la presencia de varios tubos polínicos penetrando por la micrópila), **d-** tubo polínico con

crecimiento anormal en el saco embrionario. **Aumentos:** a, b, d, barras = 5  $\mu\text{m}$ , c, barra = 2  $\mu\text{m}$ .

Con respecto a la auto-polinización de *T. heptaphylla* a nivel tetraploide se observó germinación de los granos de polen en el estigma y crecimiento normal de los tubos polínicos (Fig. 5 a). No se observaron tapones de calosa largos como los hallados en la auto-polinización a nivel diploide (Fig. 5 b). Los tubos polínicos llegaron al ovario a los 4 DPP.



**Figura 5:** Tubos polínicos en estigmas auto-polinizados de *T. heptaphylla*, 1 DPP (MF). **a-** genotipo tetraploide, **b-** genotipo diploide, nótese la gran cantidad de tapones de calosa largos en los tubos polínicos. **Aumentos:** a, b, barras = 15  $\mu\text{m}$ .

#### 4- Caracterización de los poliploides

##### *T. heptaphylla*

La floración de los individuos tetraploides de *T. heptaphylla* se produjo a partir de los 18 meses de cultivo, mientras que las plantas diploides alcanzaron su floración entre los 8 y 12 meses.

El tamaño de las flores de los individuos tetraploides y sus contrapartes diploides se presentan en la Tabla 6. Las flores de las plantas tetraploides fueron

significativamente más grandes que las diploides. Los valores de largo y ancho del tubo corolino fueron de 7.1 y 2.4 cm y 4.5 y 1.9 cm para las plantas tetraploides y diploides, respectivamente. Las plantas triploides presentaron el largo del tubo corolino de 5.8 cm, valor que resultó intermedio y significativamente diferente a los individuos diploides y tetraploides. Los diámetros de la corola en anthesis no arrojaron diferencias significativas entre los tres niveles de ploidía. El grosor de los pétalos aumentó significativamente a medida que aumentaba el nivel de ploidía.

En la Fig. 6 se observa el aspecto general de las flores de *T. heptaphylla* en los tres niveles de ploidía analizados.

**Tabla 6:** Tamaño de las flores provenientes de plantas diploides, triploides y tetraploides de *T. heptaphylla*.

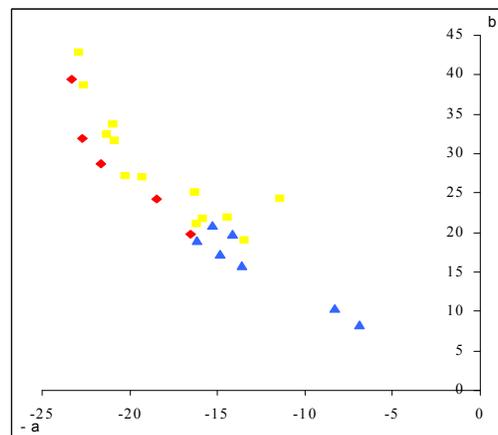
Nivel de ploidía	Diámetro de la corola (cm)		Tubo de la corola (cm)		Grosor de los pétalos(mm)
	Vertical	Horizontal	Largo	Ancho	
2x	4.3 a	4.0 a	4.5 a	1.9 a	0.2 a
3x	5.1 a	4.8 a	5.8 b	2.3 b	0.3 b
4x	5.1 a	5.0 a	7.1 c	2.4 b	0.4 c

Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6:** Aspecto general de las flores de *T. heptaphylla* con distinto nivel de ploidía. Izquierda: genotipo diploide, centro genotipo triploide, derecha genotipo tetraploide. Barra = 1cm.

En la Fig. 7 se presentan los valores a y b correspondientes al color de las hojas maduras de plantas con los tres niveles de ploidía. El color de las hojas de plantas tetraploides fue de un verde más intenso que sus contrapartes triploides y diploides. Es importante aclarar, que en el sistema Hunter, los valores más bajos de a y b indican mayor intensidad de verde y azul respectivamente (Lozano, 1978).



**Figura 7:** Valores a y b según el sistema Hunter correspondientes al color de las hojas de *T. heptaphylla*. ♦ genotipo 2 x, ■ genotipo 3 x, ▲ genotipo 4 x.

Las plantas florecieron en estados tempranos del desarrollo en los tres niveles de ploidía. A los nueve meses de cultivo se detectaron plantas con yemas florales diferenciadas en los individuos diploides, triploides y tetraploides (Tabla 7).

La altura de las plantas tetraploides fue significativamente menor que el de sus contrapartes diploides y triploides. No se hallaron diferencias significativas entre la altura de las plantas diploides y triploides. En la Fig. 8 se presenta el aspecto general de un individuo tetraploide, un triploide y un diploide.

**Tabla 7:** Altura de las plantas diploides, triploides y tetraploides y plantas con yemas florales de *T. heptaphylla* a los 9 meses de cultivo.

	Altura (cm)	Plantas con yemas florales (%)
2 x	25.54 a	73.7 (28/38) <sup>1</sup>
3 x	25.30 a	80.7 (42/52)
4 x	11.22 b	60.4 (28/48)

<sup>1</sup> número de plantas florecidas/número total de plantas.

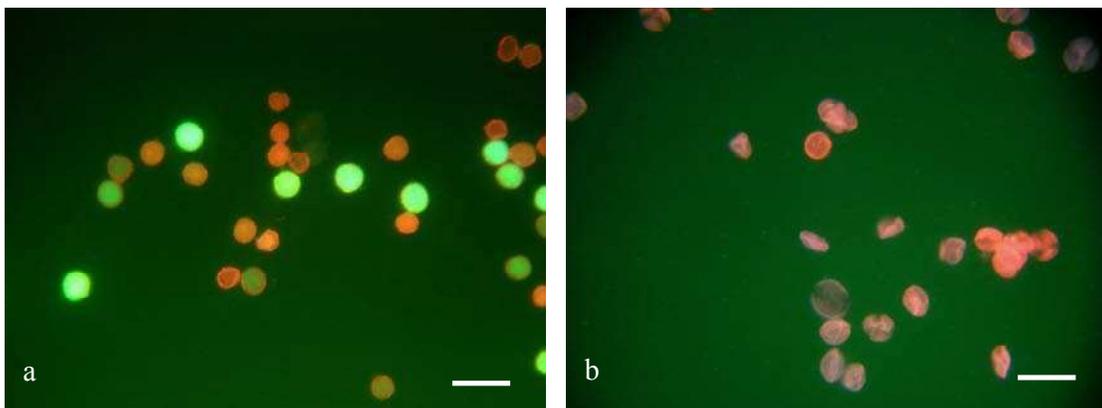
Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8:** Aspecto general de plantas de *T. heptaphylla* con tres niveles de ploidía a los 10 meses de cultivo. Izquierda: genotipo tetraploide, centro genotipo triploide y derecha genotipo diploide. Barra = 5 cm.

Las plantas triploides presentaron variabilidad en cuanto a la viabilidad del polen. Se hallaron individuos estériles aunque también algunos de ellos presentaron viabilidad entre 20 y 60 %. En la Fig. 9 se muestran fotografías del polen de dos individuos triploides de *T. heptaphylla*. La tinción empleada permitió claramente definir el polen viable coloreado de verde intenso y el inviable de color rojo. Es importante aclarar que esta técnica usa dos fluorocromos que permiten contrastar el polen viable del no viable. El fluorocromo diacetato de fluoresceína atraviesa las membranas intactas de los granos de polen, la esterasa citoplasmática la hidroliza y libera fluoresceína, la cual es fluorescente. De esta manera los granos de polen viables se observan verdes o amarillos usando microscopio de fluorescencia (Shivanna y Rangaswamy, 1992). Por otra parte el yoduro de propidio es un fluorocromo cuyas propiedades no le permiten penetrar membranas intactas, por lo que hace que las membranas muertas y los núcleos emitan el rojo característico (Krishan, 1975).

Asimismo, también se advierte el colapso de granos de polen, carácter indicativo de irregularidades producidas en la meiosis.



**Figura 9:** Granos de polen de dos individuos triploides de *T. heptaphylla* con la tinción de Greissl (1989) para el análisis de viabilidad (MF). **a-** individuo con 40% de viabilidad, **b-** individuo estéril. **Aumento:** a, b, barras = 15  $\mu$ m.

*T. pulcherrima*

Hasta los 15 meses de cultivo, las plantas diploides y tetraploides de *T. pulcherrima* no alcanzaron la etapa reproductiva por lo que se presentan solamente datos morfológicos referidos al estado vegetativo.

Las mediciones de la altura de las plantas diploides y tetraploides a los 2 y 8 meses de cultivo arrojaron diferencias significativas, siendo las plantas tetraploides más bajas que sus contrapartes diploides (Tabla 8). La Fig. 10 muestra el aspecto general de las plantas diploides y tetraploides a los 8 meses de cultivo.

**Tabla 8:** Altura (cm) de las plantas diploides y tetraploides de *T. pulcherrima* a los 2 y 8 meses de cultivo. n=25

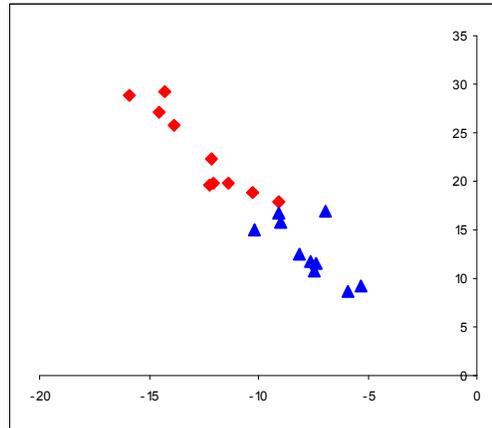
Edad de las plantas/ploidía	Altura (cm)	
	2 x	4 x
2 meses	36.8 a	20.3 b
8 meses	55.1 a	40.6 b

Letras diferentes en filas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10:** Aspecto general de plantas diploides (izquierda) y tetraploides (derecha) de *T. pulcherrima* a los 8 meses de cultivo.

El color de las hojas maduras fue de un color más intenso en las plantas tetraploides tal como se puede ver en la Fig. 11 a través de los valores a y b del sistema Hunter.



**Figura 11:** Valores a y b según el sistema Hunter correspondientes al color de las hojas maduras de *T. pulcherrima* ♦ genotipo 2x, ▲ genotipo 4x.

### Discusión

La inducción de la poliploidía fue posible a partir del tratamiento de semillas de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* con una solución acuosa de colchicina. A pesar que la mencionada técnica ha sido muy utilizada, éste es el primer reporte de su aplicación en el género *Tabebuia*. Las concentraciones utilizadas en el ensayo a partir de semillas de *T. pulcherrima* fueron más cercanas a las óptimas ya que la cantidad de semillas muertas en los tratamientos fue de alrededor del 50%, lo que indica que se aproximaron a la dosis letal media (DL 50). Van Harten (1998) recomienda esta dosis para que los tratamientos mutagénicos sean efectivos. En efecto, las dosis mayores utilizadas en el ensayo de *T. pulcherrima* con respecto a *T. heptaphylla* produjeron mayor cantidad de individuos poliploides.

Cabe aclarar que el uso de la colchicina en las especies leñosas no ha sido una técnica de aplicación masiva, puesto que la misma a menudo produce retraso de la floración (Väinölä, 2000). Pero aquí fueron seleccionados los materiales que florecían en estados tempranos del desarrollo, y por ende, se pudieron evaluar en los poliploides de *T. heptaphylla* los efectos del tratamiento con colchicina sobre las características florales de interés ornamental.

Los genotipos poliploides fueron seleccionados en estado de plántula y la metodología utilizada fue la densitometría de flujo. Este es un método muy efectivo de evaluación de la cantidad relativa de ADN por su exactitud, conveniencia, simplicidad y rapidez de análisis (Dolezel, 1997; Mishiba y Mii, 2000; Saito *et al.*, 2003). Las características morfológicas distintivas de los poliploides obtenidos tales como tamaño de estomas y flores y altura de las plantas, en todos los casos confirmaron los análisis por densitometría de flujo.

La inducción de poliploidía resultó una técnica útil para el plan de mejoramiento de *Tabebuia* debido a que permitió obtener genotipos con hábito de crecimiento más compacto en ambas especies, tal como lo habían reportado Rose *et al.* (2000) para *Buddleia globosa* Hope. Además, las plantas tetraploides de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* presentaron hojas de color verde más intenso lo que permite mayor contraste con las flores, característica importante para la creación varietal.

El cruzamiento entre individuos de *T. heptaphylla* con distinto nivel de ploidía fue posible. Se obtuvieron plantas triploides a partir del cruzamiento entre individuos diploides y tetraploides. El cruzamiento recíproco no fue posible. Esto mismo ya había sido reportado por Golz *et al* (2000) en *Pyrus communis* L., material que sólo produce frutos cuando el genotipo tetraploide es usado como donante de polen.

Algunos individuos triploides resultaron estériles. Estos materiales ameritan futuras evaluaciones debido a la posibilidad de obtener variedades que presenten mayor longevidad floral. En el caso de *Begonia* L. la mayoría de las variedades del grupo “Elatior” son de origen triploide, estériles y se caracterizan por la prolongada duración de sus flores (Hvslef-Eide y Munster, 2006). Armitage *et al.* (2003) mencionan la excelente longevidad de las variedades triploides de *Iris* L. Según Rogers (2006) la polinización es uno de los desencadenantes de la senescencia de los pétalos, la cual inicia una serie de eventos fisiológicos asociados a los reguladores de crecimiento. En los triploides estériles aquí obtenidos, el fracaso de la polinización aportaría mayor longevidad a los pétalos. Por otra parte, Van Harten (1998) menciona que el nivel de ploidía óptimo para las plantas de propagación agámica es el 3x debido a que las plantas suelen ser estériles y de excelente vigor. En efecto, se comprobó en *T. heptaphylla* que el vigor de las plantas triploides fue semejante al de las diploides, evaluado a través de la altura que alcanzaron ambos grupos en un mismo período de cultivo.

La auto-polinización de *T. heptaphylla* en el nivel diploide no produjo frutos tal como se confirmó en el **Capítulo I**. A diferencia de ello, se obtuvieron frutos cuando se auto-polinizó el genotipo tetraploide. Según Nettancourt (2005), los tetraploides inducidos a partir de diploides con auto-incompatibilidad gametofítica usualmente arrojan fenotipos auto-compatibles. En el caso de *Rosa* (género con auto-incompatibilidad gametofítica), la autofecundación es común en cultivares tetraploides (Rajapakse *et al.*, 2001). Goldz *et al.* (2000) afirman la ruptura de la incompatibilidad gametofítica en plantas tetraploides que son heterocigotas en el locus S. En *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill., Chawla, *et al.* (1997) demuestran que la auto-compatibilidad en los tetraploides no deriva de la alteración en la expresión de las proteínas asociadas al gen S.

La ruptura de la auto-incompatibilidad en el genotipo tetraploide obtenido en *Tabebuia*, proporciona las bases para sugerir que la auto-incompatibilidad de acción tardía es un tipo de auto-incompatibilidad gametofítica. Varios reportes discuten las diferencias entre este tipo de auto-incompatibilidad y la depresión por endogamia pero ninguno de ellos hace mención de este hecho (Lipow y Wyatt, 2000; Bittencourt y Semir, 2005; Bianchi *et al.* 2005).

Es de destacar que el crecimiento del tubo polínico en la auto-polinización de *T. heptaphylla* en el nivel tetraploide no presentó las deposiciones de calosa observadas en el nivel diploide (ver **Capítulo I**), lo que permite apoyar aún más la hipótesis que tales deposiciones formando tapones largos podrían estar asociadas a la auto-incompatibilidad.

## Hibridación interespecífica en el género *Tabebuia*



## Capítulo III

## Introducción

En las plantas, la información relativa a la incompatibilidad interespecífica es escasa y mucho menos estudiada que la compatibilidad intraespecífica (Shivanna, 2005). A pesar de ello se han hecho intentos de hibridación interespecífica en muchos géneros de plantas ornamentales, ya que junto con la poliploidía, constituyen la mayor fuente de variación (Van Tuyl *et al.* 2002). Por otra parte, los híbridos interespecíficos tienen la potencialidad de capturar el vigor híbrido y la posibilidad de combinar caracteres de interés. En géneros tales como *Rosa*, *Chrysanthemum* L., *Gladiolus* L., *Alstroemeria* L., *Dianthus* L., *Narcissus* L., *Tajetes* y *Lilium* L. entre otros, la hibridación interespecífica ha sido muy utilizada para la creación varietal (Van Tuyl *et al.*, 2002). Particularmente en el caso del *Lilium*, la hibridación interespecífica ha contribuido al mejoramiento y a partir de ella existen en el mercado un gran número de variedades (Van Tuyl y Lim, 2003).

Las barreras para la hibridación interespecífica constituyen el mayor obstáculo que debe ser superado para llevar a cabo cualquier programa de mejoramiento. Dichas barreras se establecen en estados pre- o post-cigóticos, aunque las últimas son más comunes. Las barreras pre-cigóticas actúan en la superficie del estigma o en el tejido de transmisión, y ocasionalmente, pueden presentarse en el ovario o en los óvulos.

Las barreras post-cigóticas pueden actuar en diferentes estados del desarrollo embrionario o durante la germinación de la semilla y en el crecimiento del híbrido. Se han identificado muchas causas de aborto en el desarrollo embrionario, tales como presencia de genes letales, desarmonía genética en el embrión o fallas en el desarrollo endospermico (Shivanna, 2005). Durante la germinación, también se han identificado

algunas causas de aborto del embrión como por ejemplo en híbridos interespecíficos de *Rhododendron* L. e *Hibiscus* L. (Eeckhaut *et al.* 2006), la incompatibilidad entre el genoma nuclear y el plastoma inhibe el desarrollo de los cloroplastos y la formación de clorofila, y consecuentemente se originan plantas albinas.

De acuerdo a Shivanna (2005), a menudo las barreras no están restringidas a un único nivel del pistilo y por el contrario pueden presentarse en todos los niveles.

En la incompatibilidad interespecífica algunos investigadores han considerado un reconocimiento activo a través de los alelos-S. Un ejemplo lo constituye el caso del cruzamiento entre *Lycopersicon peruvianum* y *L. esculentum* Mill. en el cual, el locus S estaría involucrado en la inhibición del tubo polínico (Nettancourt, 2005).

En la mayoría de los cruzamientos interespecíficos la interrupción del crecimiento del tubo polínico es pasiva, es decir, no resulta de un reconocimiento activo del polen. El resultado es la falta de co-adaptación entre el polen y el pistilo, lo que se considera como un mecanismo “llave- cerradura” (Shivanna, 2005). Esta inhibición pasiva resultante de la falta de información genética entre ambos progenitores ha sido llamada incongruencia por Hogenboom (1973). Este modelo sugiere que la incompatibilidad interespecífica es el resultado de la barrera determinada por una divergencia evolutiva fisiológica o morfológica entre especies, por lo que está ligado a especies filogenéticamente distantes. En contraste a este modelo, Nettancourt (2005) sugiere que la hibridación interespecífica es inhibida por un proceso activo.

En muchos cruzamientos interespecíficos la incompatibilidad opera en sólo una dirección. Este tipo de incompatibilidad se denomina unilateral y es común cuando se cruza una especie auto-incompatible con una auto-compatible. Se ha reportado incompatibilidad unilateral en *Capsicum* L. (Naci Onus y Pickersgill, 2004), *Solanum* L. (Eijlander *et al.*, 2000), *Eucalyptus* L' Her. (Gore *et al.*, 1990), *Lycopersicon* Hill.

(Nettancourt *et al.*, 1974), en cruzamientos entre *S. pennellii* Correll. y *L. esculentum* (Hardon, 1967), etc. Aunque la incompatibilidad unilateral prevalece cuando el cruzamiento se produce entre una especie auto-incompatible con una especie auto-compatible, también se han reportado casos en el cruzamiento en sentido inverso y entre dos especies auto-incompatibles (Shivanna, 2005).

En el género *Tabebuia*, Gentry (1992) refiere la existencia de hibridación natural entre especies nativas de Cuba, pero no hace estudios específicos que prueben la hibridación. Al presente, tampoco hay trabajos relativos a los posibles mecanismos de incompatibilidad interespecífica en este género ni en otros de la familia Bignoniaceae.

Bittencourt (2003) indica que *T. impetiginosa* y *T. heptaphylla* son bilateralmente inter-fértiles y cita incompatibilidad unilateral entre *T. umbellata* (Sord.) Sandwith y *T. crysostricha*. Dicho autor sólo determina la hibridación por el número de semillas obtenidas y no estudia los potenciales híbridos. Considera 4 especies, de las cuales sólo 2 de ellas está presentes en la flora argentina.

### **Objetivo general**

Evaluar la compatibilidad interespecífica en el género *Tabebuia*.

### **Objetivos parciales**

(i) reconocer las barreras pre y/o post cigóticas para la hibridación interespecíficas en el género.

(ii) determinar la aptitud combinatoria, ya que la misma aporta elementos valiosos para el mejoramiento como así también sobre similitud genética y/o distancia genética entre especies;

(iii) caracterizar los híbridos obtenidos;

(iv) seleccionar aquellos híbridos que combinen la forma compacta con variación en el color de las flores y que produzcan flores en el primer año de cultivo.

### **Materiales y Métodos**

Se utilizaron individuos seleccionados por las características ornamentales tales como floración profusa y en estado temprano del desarrollo de las siguientes especies: *T. heptaphylla* (2x y 4x), *T. pulcherrima*, *T. alba*, *T. ochracea*, *T. nodosa*, *T. lapacho*, *T. crysotricha*, y *T. aurea* (ver **Anexo I**, Tabla 2).

Las plantas se cultivaron en macetas en invernáculo con control de temperatura mínima (15° C). Los genotipos selectos se clonaron a partir de injertos para obtener material base suficiente. Los injertos fueron de púa terminal y se realizaron sobre árboles de, al menos, 2 años de cultivo.

#### *1- Cruzamientos*

Los cruzamientos dirigidos se realizaron entre los materiales antes mencionados considerando la combinación de flores rosadas de *T. heptaphylla* (genotipos 2x y 4x) con especies de flores amarillas. Para ello se castraron las flores 1 día antes de su antesis y se eliminó la corola para evitar la atracción de polinizadores. En antesis, se procedió a la polinización con polen fresco y/o conservado a 5° C en silica-gel.

Se realizaron al menos 30 cruzamientos de cada combinación en dos momentos. Se evaluó la producción de frutos por cruzamiento, producción de semillas por fruto y el poder germinativo de las mismas.

La eficiencia reproductiva se calculó según la fórmula de Dafni (1992):

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ frutos}}{\text{N}^{\circ} \text{ flores polinizadas}} \times \frac{\text{N}^{\circ} \text{ promedio semillas/fruto}}{\text{N}^{\circ} \text{ promedio óvulos/ovario}}$$

El número promedio de óvulos por ovario se calculó contando todos los óvulos de 10 ovarios sobre lupa. Para facilitar el recuento se usó un cubreobjetos cuadriculado.

## *2- Crecimiento del tubo polínico*

Se recolectaron pistilos a intervalos de 1, 2, 3 y 4 DPP en cada combinación analizada y su recíproco. Se fijaron en FAA (formol, ácido acético y etanol; 1: 0.5: 8) por al menos 24 horas. Los pistilos se trataron según la metodología detallada en el **Capítulo I**.

Se evaluó el crecimiento diario del tubo polínico en los pistilos considerando la distancia recorrida. Se consideraron los siguientes códigos: 1- germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta primera mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta la segunda mitad del estilo, 4- crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario.

Debido a que los tubos polínicos son muy numerosos y forman un haz apretado se estimó el porcentaje de tubos que alcanzaban cada porción del pistilo.

Se colectaron pistilos a intervalos regulares luego de los cruzamientos, se fijaron en glutaraldehído y se incluyeron en parafina para luego realizar cortes histológicos (ver metodología **Capítulo I**).

### *3- Caracterización de los híbridos*

Las semillas obtenidas a partir de los cruzamientos se sembraron sobre vermiculita húmeda en bolsas de nylon y se mantuvieron en cámara a  $25 \pm 2$  °C. Cuando las plántulas tuvieron al menos 2 hojas verdaderas se transplantaron a bandejas alveoladas (plugs) en sustrato compuesto por turba, perlita, vermiculita (1:1:1), luego a los dos meses de cultivo se transplantaron a macetas de 10 cm de diámetro y a los 4 meses posteriores a macetas de 6 litros de capacidad (Fig. 1). Estos dos últimos trasplantes se hicieron sobre un sustrato compuesto por resaca de río, acículas de pino molidas y tierra (1: 1:1).

Se evaluaron las siguientes características: (a) el tiempo transcurrido desde la siembra a la primera floración, (b) altura de las plantas en plena floración, (c) tamaño y color de las flores y (d) viabilidad del polen.

Se midió el largo y ancho del tubo corolino de los híbridos y sus progenitores con un escalímetro digital (Mitutoyo, Japón).

Para determinar el color de las flores se evaluaron todos los individuos híbridos y sus progenitores en el tiempo de la antesis. Se realizó a través de un colorímetro Minolta Chroma Meter CR-321 (Japón) con lectura directa de L\* (luminosidad), a (intensidad de rojo) y b (intensidad de amarillo). Se tomaron los valores referidos al sector medio del tubo corolino y se analizaron 6 flores por individuo.

Se determinó la viabilidad del polen de los individuos híbridos según Greissl (1989). Se evaluaron aproximadamente 300 granos de polen siguiendo la metodología detallada en el **Capítulo II**.

Se analizó el nivel de ploidía de los híbridos en los casos en que los progenitores presentaban diferente tamaño genómico usando densitometría de flujo (ver metodología en **Capítulo II**).

Para algunas combinaciones fue posible obtener una generación segregante a partir del cruzamiento entre hermanos.



**Figura 1:** Etapas de cultivo de los híbridos obtenidos. **a-** plántulas en estado cotiledonar en bolsas con vermiculita, **b-** plántulas en bandejas alveoladas (plugs), **c-** plantas de dos meses en macetas 10 cm de diámetro, **d-** plantas de 6 meses en macetas de 3 lt de capacidad.

## Resultados

### 1- Cruzamientos

Los resultados obtenidos en las polinizaciones entre dos genotipos de *T. heptaphylla* (2x y 4x) y siete especies de *Tabebuia* de flores amarillas: *T. pulcherrima*, *T. alba*, *T. ochracea*, *T. nodosa*, *T. lapacho*, *T. crysotricha* y *T. aurea* se presentan en la Tabla 1.

Se obtuvieron frutos en las siguientes combinaciones: *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (genotipo 2x), *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (genotipo 4x), *T. heptaphylla* (genotipo 2x) x *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (genotipo 2x) x *T. alba*. En los cruzamientos con las otras especies analizadas no se obtuvieron frutos y la abscisión de los pistilos se produjo entre los 4 y 7 DPP.

En el caso de los cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* se produjeron frutos en cruzamientos en ambas direcciones aunque la mayor cantidad (28.8%) se obtuvo cuando el genotipo tetraploide de *T. heptaphylla* fue utilizado como donante de polen. En el cruzamiento recíproco sólo se obtuvo un fruto (1.4%).

Para el caso de la combinación entre *T. alba* y *T. heptaphylla* se obtuvieron 4 frutos cuando *T. alba* fue utilizada como donante de polen (7.3%). El cruzamiento en sentido inverso no produjo descendencia lo que sugiere la existencia de incompatibilidad unilateral.

A partir de estos resultados se evaluaron otros genotipos para los cruzamientos entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (Tabla 2) y *T. alba* y *T. heptaphylla* (Tabla 3). Se confirmó que la dirección *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* es más exitosa en lo que

respecta a la producción de frutos y la compatibilidad unilateral en el caso de la combinación entre *T. heptaphylla* x *T. alba*.

**Tabla 1:** Número de flores polinizadas y frutos cosechados en los cruzamientos entre genotipos selectos de *T. heptaphylla* 2x y 4x y siete especies de *Tabebuia* de flores amarillas.

	<i>T. heptaphylla</i> ♂		<i>T. heptaphylla</i> ♀	
	genotipo 2x	genotipo 4x	genotipo 2x	genotipo 4x
<i>T. pulcherrima</i>	71/1 (1.4%)	9/0 (0%)	53/2 (3.8%)	52/15 (28.8%)
<i>T. alba</i>	55/4 (7.3 %)	4/0 (0%)	19/0 (0%)	25/0 (0%)
<i>T. ochracea</i>	23/0 (0%)	15/0 (0%)	14/0 (0%)	31/0 (0%)
<i>T. nodosa</i>	20/0 (0%)	18/0 (0%)	20/0 (0%)	22/0 (0%)
<i>T. lapacho</i>	29/0 (0%)	sd	10/0 (0%)	sd
<i>T. crysotricha</i>	32/0 (0%)	10/0 (0%)	52/0 (0%)	69/0 (0%)
<i>T. aurea</i>	11/0 (0%)	10/0 (0%)	10/0 (0%)	10/0 (0%)

Entre paréntesis se indica el porcentaje de fructificación. sd: sin dato.

**Tabla 2:** Número de flores polinizadas y frutos cosechados en los cruzamientos entre genotipos selectos de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima*.

Especie ♀	Genotipo	Especie ♂	Genotipo	Flores polinizadas (N°)	Frutos cosechados (N°)
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	<i>T. pulcherrima</i>	20010927F2	14	0
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	<i>T. pulcherrima</i>	20010927A1	55	1
<i>T. pulcherrima</i>	20010927F2	<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	28	4
<i>T. pulcherrima</i>	20010927A1	<i>T. heptaphylla</i>	20010815x1	21	9
<i>T. pulcherrima</i>	20010927A1	<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	30	12

**Tabla 3:** Número de flores polinizadas y frutos cosechados en los cruzamientos entre genotipos selectos de *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima*

Especie ♀	Genotipo	Especie ♂	Genotipo	Flores polinizadas (N°)	Frutos cosechados (N°)
<i>T. heptaphylla</i>	20010813 x 25	<i>T. alba</i>	2001092514	18	1
<i>T. heptaphylla</i>	20010813 x 25	<i>T. alba</i>	20010926B1	33	2
<i>T. heptaphylla</i>	20010813 x 25	<i>T. alba</i>	2001092511	4	1
<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	<i>T. alba</i>	2001092514	4	0
<i>T. alba</i>	2001092514	<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	2	0
<i>T. alba</i>	20010926B1	<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	17	0
<i>T. alba</i>	2001092514	<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	13	0
<i>T. alba</i>	20010926B1	<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	12	0

La producción de semillas por frutos y su poder germinativo correspondientes a los cruzamientos exitosos se presenta en la Tabla 4. Los frutos obtenidos en los cruzamientos entre *T. heptaphylla* (2x) x *T. alba* y *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* 4x y 2x produjeron 54.66, 156.82 y 99.78 semillas por frutos, respectivamente. En los tres casos las semillas germinaron y produjeron plántulas normales. La combinación *T. heptaphylla* x *T. pulcherrima* produjo sólo un fruto con 9 semillas, germinaron sólo 7 y no evolucionaron.

En la tabla 5 se presenta la eficiencia reproductiva según la fórmula de Dafni (1992) correspondiente a los cruzamientos exitosos. El cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) arrojó el valor 12.76 siendo el más alto obtenido.

**Tabla 4:** Semillas obtenidas por fruto (promedio) y semillas germinadas (promedio) en los cruzamientos exitosos entre *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* y *T. alba*.

Combinación	Sem prom/fruto $\pm$ SD	Sem germinadas prom/fruto $\pm$ SD
<i>T. heptaphylla</i> (2x) x <i>T. alba</i>	54.66 $\pm$ 24.85	26.67 $\pm$ 13.28 (48.79%)
<i>T. pulcherrima</i> x <i>T. heptaphylla</i> (4x)	156.82 $\pm$ 118.15	100.65 $\pm$ 102.92 (64,18 %)
<i>T. pulcherrima</i> x <i>T. heptaphylla</i> (2x)	99.78 $\pm$ 67.03	75.22 $\pm$ 36.69 (75.39%)
<i>T. heptaphylla</i> (2x) x <i>T. pulcherrima</i>	9	7

SD, desvío Standard.

**Tabla 5:** Óvulos por ovario (N°) y eficiencia reproductiva según Dafni (1992) en cruzamientos exitosos entre *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* y *T. alba*

	Ovulos por ovario (N°) <sup>1</sup>	Eficiencia reproductiva <sup>2</sup>
<i>T. heptaphylla</i> (2x) x <i>T. alba</i>	273.2	1.44
<i>T. pulcherrima</i> x <i>T. heptaphylla</i> (4x)	357.0	12.76
<i>T. pulcherrima</i> x <i>T. heptaphylla</i> (2x)	357.0	1.06
<i>T. heptaphylla</i> (2x) x <i>T. pulcherrima</i>	273.2	0.03

<sup>1</sup> Promedio de 10 ovarios.<sup>2</sup> (número de frutos/ número de flores polinizadas) x (número promedio de semillas por fruto/ número promedio de óvulos por ovario) x 100.

## 2- Crecimiento del tubo polínico

Cruzamientos compatibles:

En el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* y su recíproco se observó que la proporción de tubos polínicos que completaron su desarrollo fue reducida en diferentes niveles y por consiguiente muy pocos (10%-20%) llegaron hasta el ovario y luego al saco embrionario (Tabla 6).

**Tabla 6:** Crecimiento diario del tubo polínico a lo largo del pistilo en los cruzamientos *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* y su recíproco (moda).

	1 DPP	2 DPP	3 DPP	4 DPP
<i>T. pulcherrima</i> x <i>T. heptaphylla</i>	2 (80%)	4 (20%)	4 (20%)	4 (10%)
<i>T. heptaphylla</i> x <i>T. pulcherrima</i>	1 (80%)	2 (20%)	3 (20%)	4 (10%)

1- Germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la primera mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta la segunda mitad del estilo, 4- crecimiento de tubos polínicos hasta el ovario.

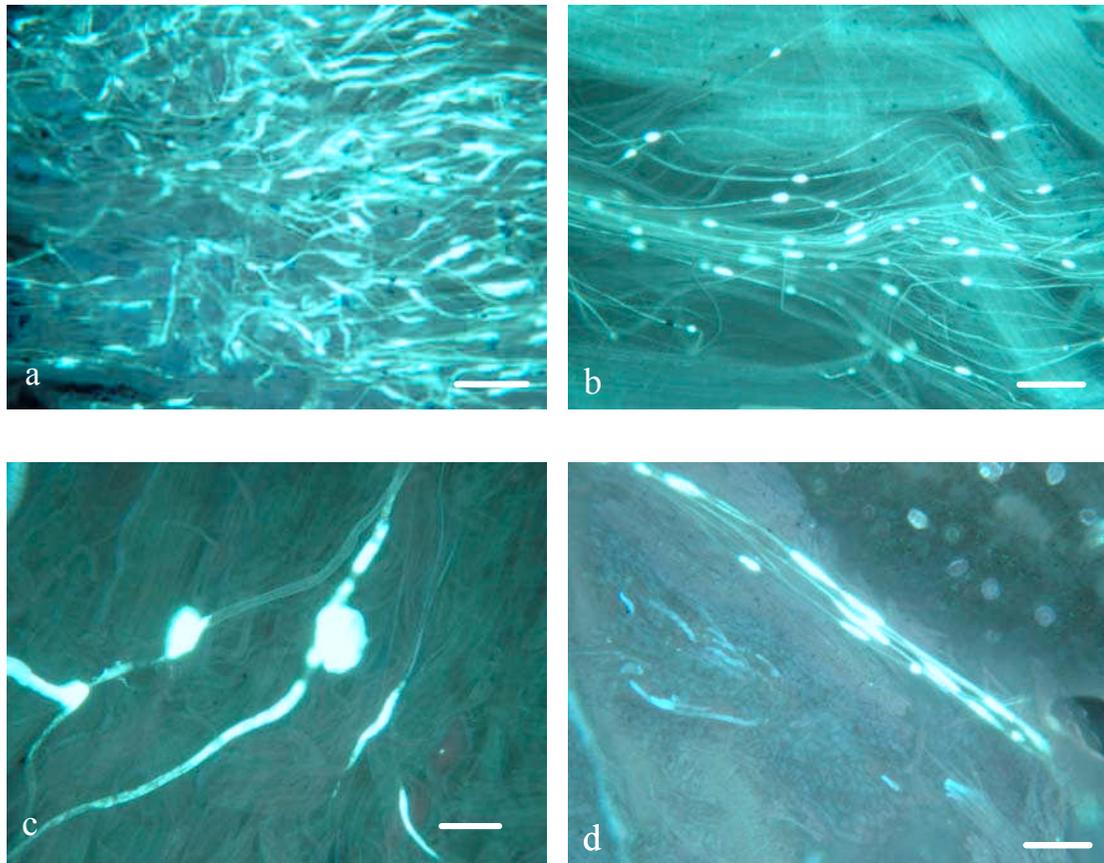
Entre paréntesis se indica el porcentaje estimado del total de tubos polínicos que llegan a cada sector del pistilo.

En el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla*, los tubos polínicos detuvieron su crecimiento en distintas zonas del estilo y presentaron deposición de calosa en la punta del mismo formando estructuras globosas. También se observaron tapones de calosa en tubos polínicos a lo largo del estilo de dimensiones mayores a los normales y de forma globosa (Fig. 2 c). Sólo el 20 % de los tubos polínicos llegaron hasta el ovario (Fig. 2 d). No se observaron anomalías en la penetración de los

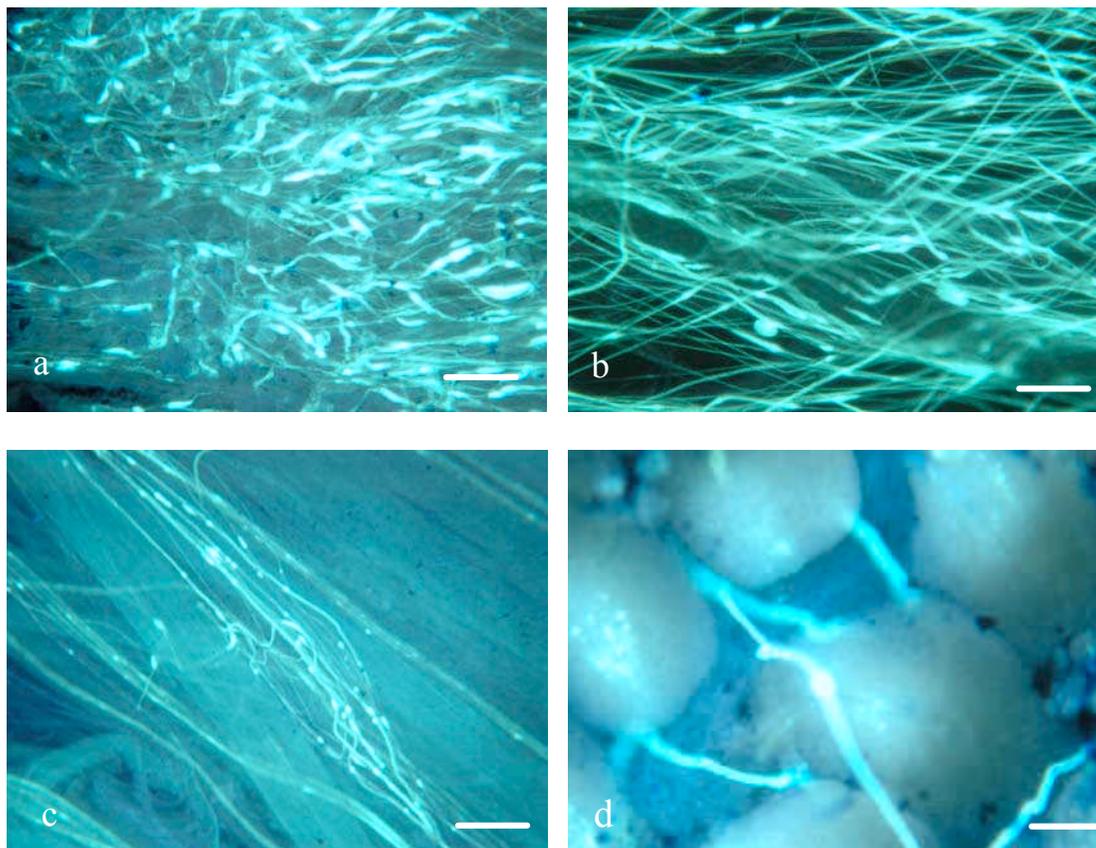
tubos polínicos en la micrópila (Fig. 2). Los tubos polínicos llegaron a los óvulos a los 2 DPP.

En el cruzamiento recíproco (*T. heptaphylla* x *T. pulcherrima*) sucedió algo similar, a pesar de la germinación de los granos de polen, muy pocos tubos polínicos llegaron al ovario (Fig. 3 c).

Es importante destacar que la velocidad de crecimiento fue menor que en el caso anterior, los tubos polínicos llegaron a los óvulos a los 4 DPP.



**Figura 2:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla*, 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** tubos polínicos en la primera mitad del estilo, **c-** tubos polínicos en la segunda mitad del estilo (ver deposiciones de calosa), **d-** tubos polínicos en el ovario (nótese la poca cantidad de tubos). **Aumentos:** a, b, d, barras = 5  $\mu$ m; c barra = 2  $\mu$ m.



**Figura 3:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** tubos polínicos en la primera mitad del estilo, **c-** tubos polínicos en la segunda mitad del estilo (nótese la poca cantidad de tubos polínicos), **d-** tubos polínicos en los óvulos. **Aumentos:** a, b, c, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 5  $\mu\text{m}$ .

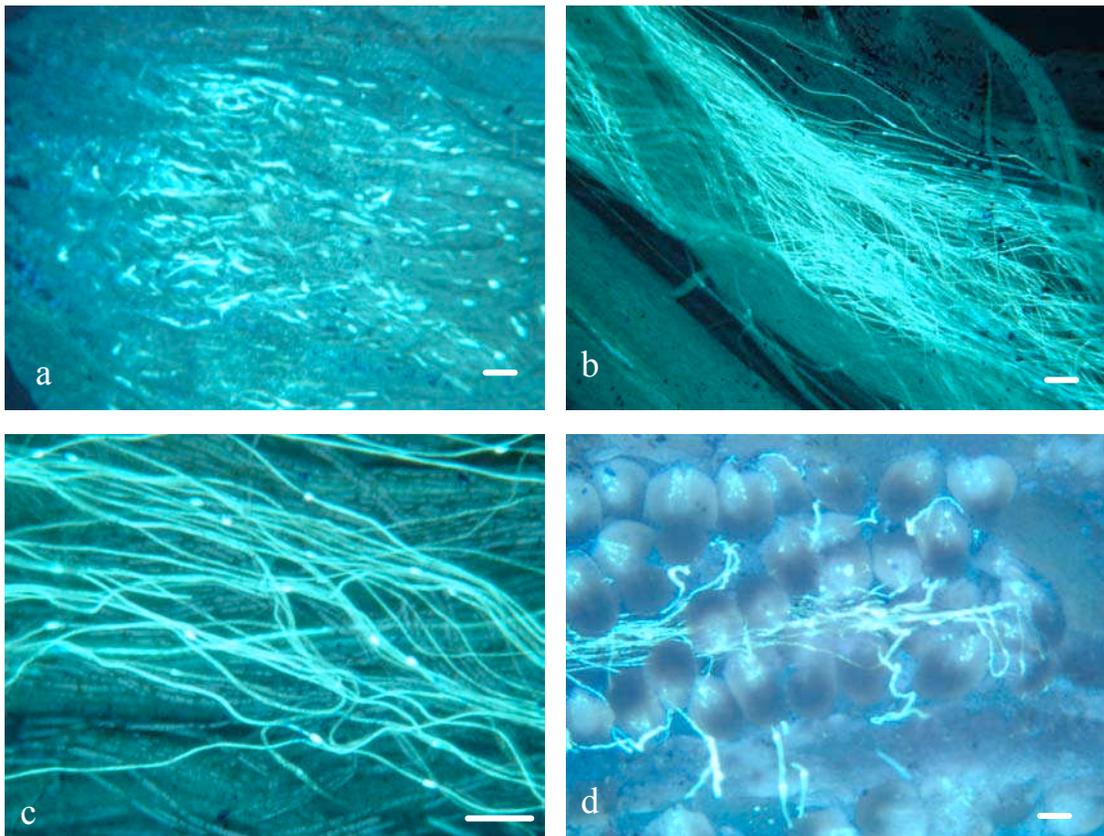
La combinación entre *T. heptaphylla* x *T. alba* presentó características semejantes a la anterior combinación mencionada; es decir, a pesar de la germinación aparentemente normal de los granos de polen en el estigma muy pocos llegaron a los óvulos. A los 4 DPP, se observó que un grupo reducido de tubos polínicos llegaron al ovario y penetraron los óvulos por la micrópila (Tabla 7).

**Tabla 7:** Crecimiento diario del tubo polínico a lo largo del pistilo en los cruzamientos *T. heptaphylla* x *T. alba* y su recíproco (moda).

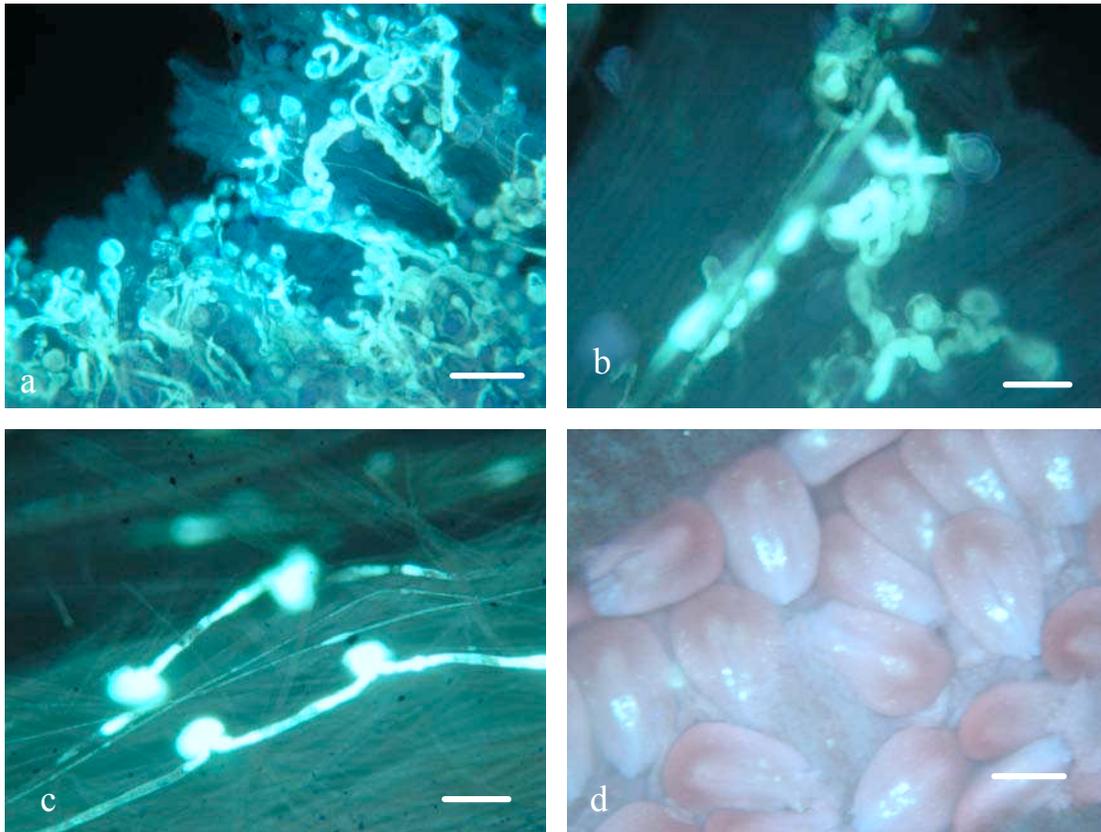
	1 DPP	2 DPP	3 DPP	4 DPP
<i>T. heptaphylla</i> x <i>T. alba</i>	1 (80%)	2 (60%)	3 (40%)	4 (40%)
<i>T. alba</i> x <i>T. heptaphylla</i>	1 (80%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)

1- Germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la primera mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta la segunda mitad del estilo, 4- crecimiento hasta el ovario. Entre paréntesis se indica el porcentaje estimado del total de tubos polínicos que llegan a cada sector del pistilo.

En cruzamiento recíproco (*T. alba* x *T. heptaphylla*), los tubos polínicos presentaron una pronunciada deposición de calosa y crecimiento tortuoso sobre el estigma (Fig. 4). Sólo unos pocos tubos polínicos (20 %) crecieron hasta la primera mitad del estilo y en ellos se observaron tapones de calosa más grandes que los habituales en cruzamientos compatibles y su forma fue similar a la de los hallados en el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla*. No se observó crecimiento de los mismos luego de los 2 DPP y a los 4 DPP se produjo la abscisión de todos los pistilos auto-polinizados.



**Figura 4:** Tubos polínicos en el cruzamiento *T. heptaphylla* x *T. alba*, 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** tubos polínicos en la primera mitad del estilo, **c-** tubos polínicos en la segunda mitad del estilo, **d-** tubos polínicos en el ovario. **Aumentos:** a, b, d barras = 10  $\mu\text{m}$ , c, barra = 5  $\mu\text{m}$ .

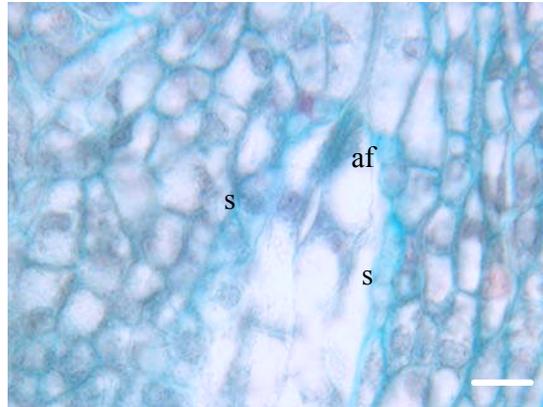


**Figura 5:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. alba* y *T. heptaphylla*, 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-**detalle de tubos polínicos en estigma, nótese el recorrido tortuoso, **c-** tubos polínicos en la primera mitad de estilo (ver detalle de taponos de calosa), **d-** óvulos sin rastros de tubos polínicos **Aumentos:** a, d, barra = 10  $\mu\text{m}$ ; b, c, barra = 5  $\mu\text{m}$ ; d, barra = 100  $\mu\text{m}$ .

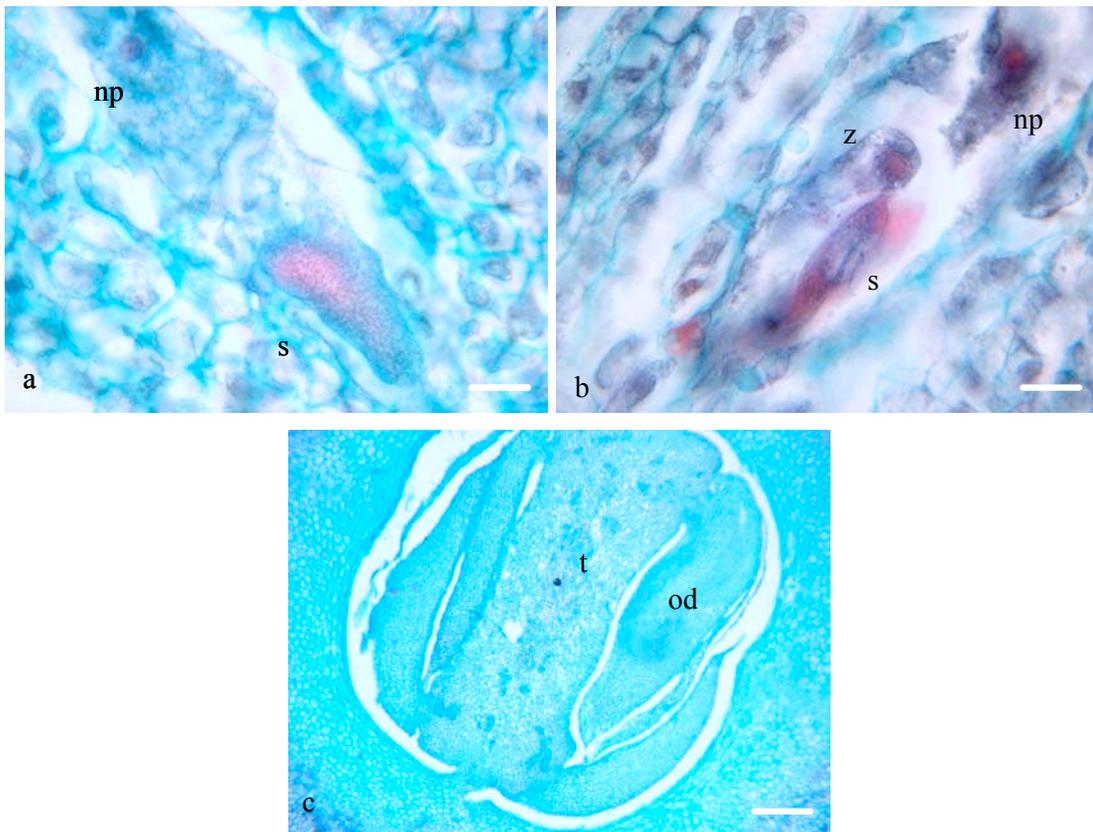
Los estudios embriológicos corroboraron los resultados antes descritos.

En el cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima* no se observa llegada de tubos polínicos a los sacos embrionarios y las sinérgidas persistieron sin cambios a los 4 DPP (Fig. 6).

En el cruzamiento recíproco (*T. pulcherrima* x *T. heptaphylla*), se observó descarga del tubo polínico en una sinérgida, la cual resultó altamente picnótica (Fig. 7 a). Se comprobó la formación del cigoto y se observó desarrollo normal de los óvulos fecundados (Fig. 7 b y c).



**Figura 6:** Aspecto de las sinérgidas y aparato filar en el cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. pulcherrima*, 4 DPP (MO). Nótese que permanecen intactas y no se ven restos de tubo polínico. **Abreviaturas:** s: sinérgida, af: aparato filar. **Aumento:** Barra = 2  $\mu$ m.

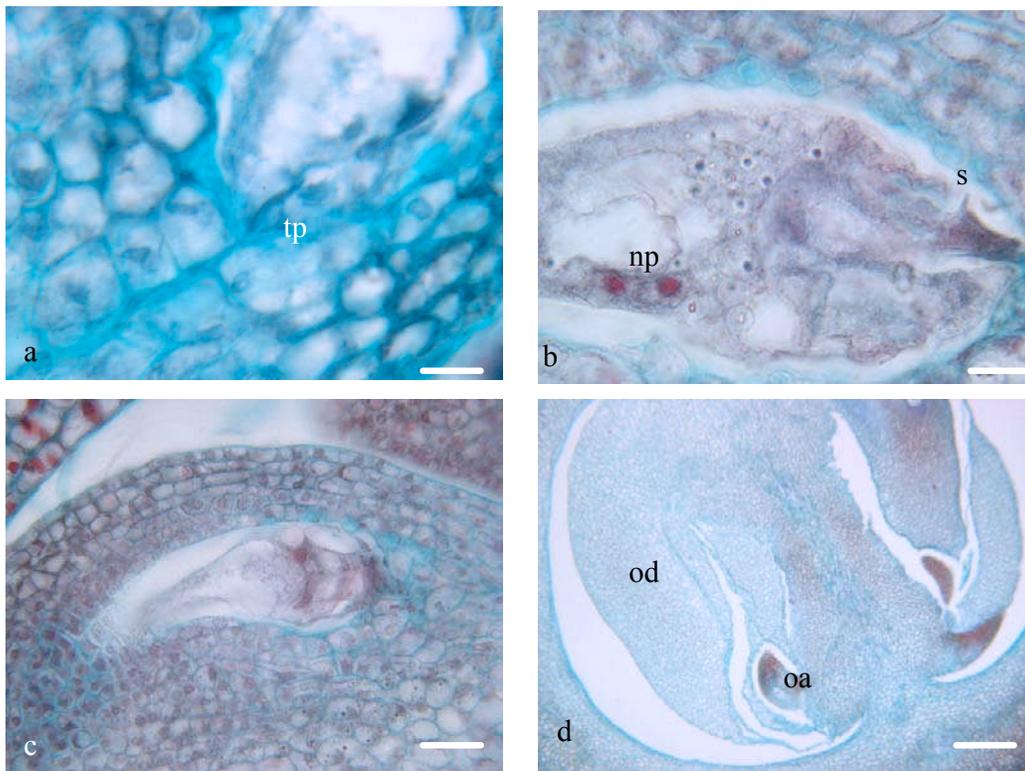


**Figura 7:** Corte transversal de óvulos provenientes del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (MO). **a-** sinérgida degenerada, 4 DPP, **b-** cigoto, 6 DPP, **c-** aspecto general del ovario 11 DPP. **Abreviaturas:** s: sinérgida, np: núcleos polares, z: cigoto, od: óvulos en desarrollo, t: tabique. **Aumentos:** a, b barras = 2  $\mu$ m; c barra = 20  $\mu$ m.

En el cruzamiento *T. alba* x *T. heptaphylla* no se ven sinérgidas degeneradas por lo que se concluye que no hay descarga del contenido del tubo polínico en las mismas.

En el cruzamiento recíproco (*T. heptaphylla* x *T. alba*), se observaron óvulos donde hubo penetración del tubo polínico por la micrópila y se produjo la descarga de contenidos en la sinérgida (Fig. 8 a y b).

En otros óvulos no se produjo tal descarga, permaneciendo sin cambios aparentes (Fig. 8 c). A los 15 DPP, se observó desarrollo de óvulos normales y también óvulos que permanecieron sin cambios (Fig. 8 d).



**Figura 8:** Corte transversal de óvulos provenientes del cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba* (MO). **a-** tubo polínico penetrando por la micrópila 4 DPP, **b-** sinérgida degenerada y nucleolos de núcleos centrales sin unirse 4 DPP, **c-** sinérgidas intactas, sin penetrar, **d-** desarrollo del ovario 15 DPP. **Abreviaturas:** tp: tubo polínico, np: núcleos polares, s: sinérgida, od: óvulo en desarrollo, oa: óvulo abortado. **Aumentos:** a, b, barras = 2  $\mu$ m; c, barra = 5  $\mu$ m; d, barra = 20  $\mu$ m.

## Cruzamientos incompatibles:

En los cruzamientos entre *T. heptaphylla* y *T. crysotricha* en ambas direcciones los tubos polínicos no lograron crecer hasta el ovario y penetrar los óvulos, sólo el 10% de los tubos polínicos crecieron hasta la segunda mitad del estilo (Tabla 8).

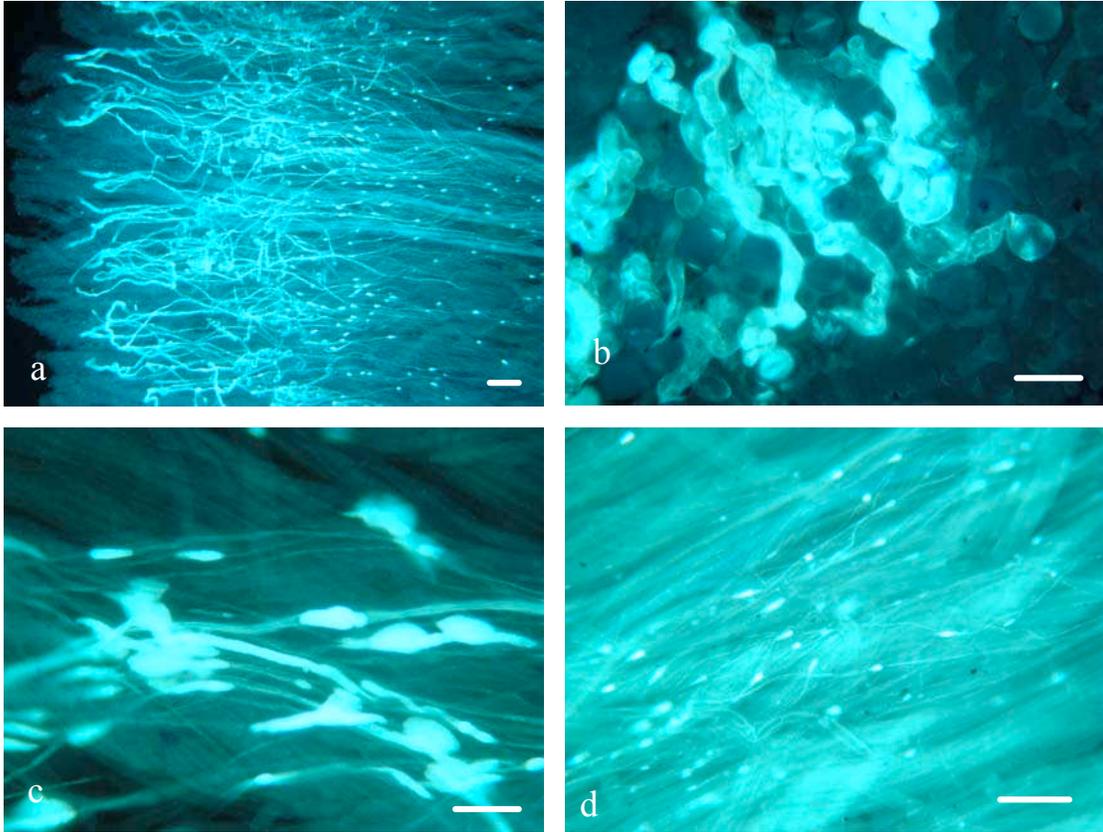
**Tabla 8:** Crecimiento diario del tubo polínico a lo largo del pistilo en los cruzamientos *T. heptaphylla* x *T. crysotricha* y su recíproco (moda).

	1 DPP	2 DPP	3 DPP	4 DPP
<i>T. heptaphylla</i> x <i>T. crysotricha</i>	1 (80%)	2 (10%)	2 (10%)	3 (10%)
<i>T. crysotricha</i> x <i>T. heptaphylla</i>	1 (80%)	2 (10%)	3 (10%)	3 (10%)

1- Germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la primera mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta la segunda mitad del estilo, 4- crecimiento hasta el ovario.

Entre paréntesis se indica el porcentaje estimado del total de tubos polínicos que llegan a cada sector del pistilo.

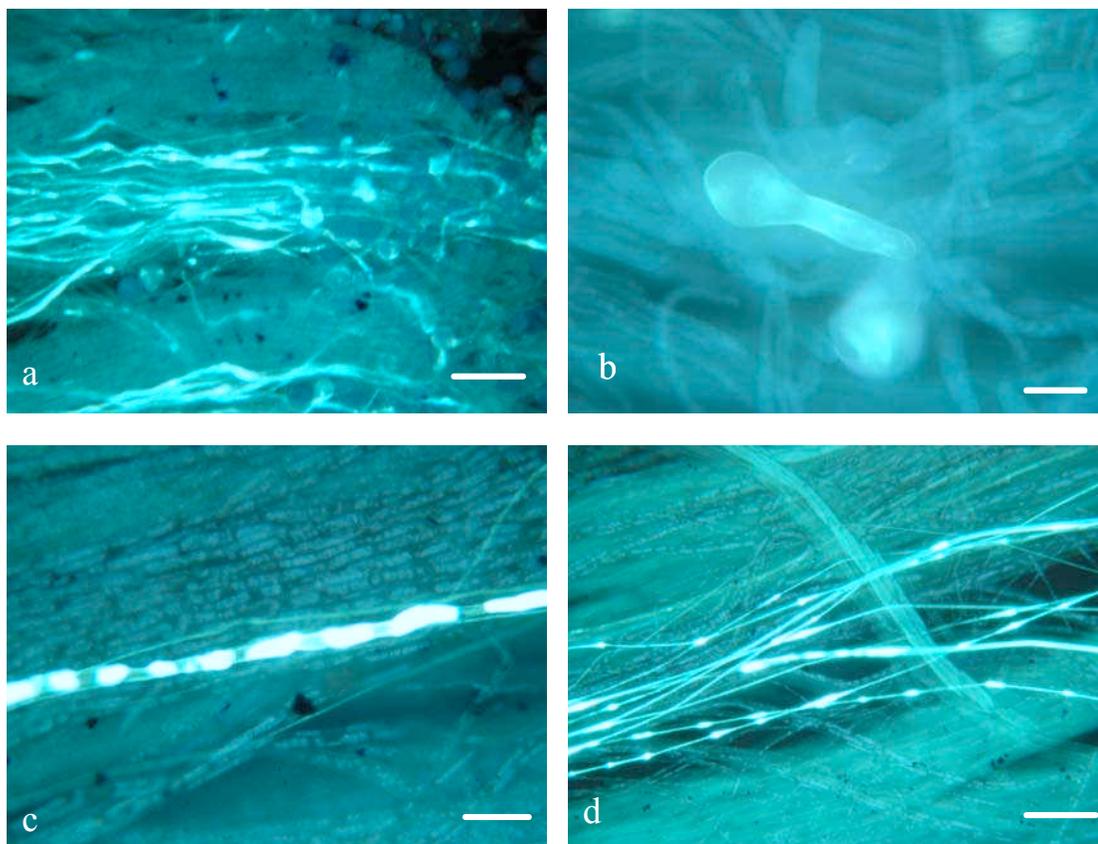
En el caso de *T. crysotricha* x *T. heptaphylla*, los tubos polínicos crecieron en forma tortuosa en el estigma, lo que impidió que los mismos penetren por las papilas estigmáticas; los tubos que lograron superar ese sitio de expresión de la incompatibilidad, crecieron hasta la segunda mitad del estilo, pero en ningún caso se observó llegada a los óvulos (Fig. 6). En la primera mitad del estilo también se observaron tapones de calosa de mayor dimensión que los tapones normales que ocurren en cruzamientos compatibles.



**Figura 9:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. crysostricha* y *T. heptaphylla*, 4 DPP (MO). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** detalle de tubos polínicos en el estigma, **c-** tubos polínicos en la primer mitad del estilo (ver deposiciones de calosa), **d-** tubos polínicos en la segunda mitad del estilo (nótese la poca cantidad de tubos). **Aumentos:** a, d, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; b, c, barras = 5  $\mu\text{m}$ .

En el cruzamiento recíproco (*T. heptaphylla* x *T. crysostricha*) sucedió algo similar al cruzamiento anterior; aunque los tubos polínicos presentaron un patrón de deposición de calosa distinto, en este caso no se detectó enrollamiento de los extremos de los tubos polínicos sino un engrosamiento. En la primer mitad del estilo también se observaron tubos polínicos con tapones de calosa a menos distancia de la habitual formando una estructura en rosario (Fig. 7 c).

Es importante aclarar que no hay muestras analizadas luego de los 4 DPP debido a que en ese tiempo se produce la abscisión de los pistilos.



**Figura 10:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. crysotricha* 4 DPP (MO). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** detalle de engrosamiento de tubo polínico en el estigma, **c-** tubos polínicos en la primera mitad del estilo (ver deposiciones de calosa en forma de rosario), **d-** tubos polínicos en la segunda mitad del estilo (nótese la poca cantidad de tubos). **Aumentos:** a, d, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; b, barra = 2  $\mu\text{m}$ ; c barra = 5  $\mu\text{m}$ .

En el caso de los cruzamientos entre *T. heptaphylla* y *T. ochracea* en ambas direcciones, se detectó que sólo el 50% de los granos de polen observados en el estigma germinaron y cierta cantidad de los tubos polínicos (10%) crecieron hasta el ovario, a pesar de ello no lograron penetrar en los óvulos (Tabla 9). Cuando *T. heptaphylla* fue polinizada con *T. ochracea* se observó germinación normal de los granos de polen en el estigma pero sólo el 50% de los tubos polínicos lograron crecer hasta la mitad del estilo. Los tubos que llegaron a la base del ovario (10%) presentaron anomalías en lo que

respecta a la deposición de calosa tales como enrollamientos (Fig. 8 c) y engrosamientos en la punta (Fig. 8 d y e).

A pesar de observar tubos polínicos cercanos a los óvulos en ningún caso de detectó su entrada a través de la micrópila (Fig. 8 e y f). Los tubos polínicos llegaron al ovario a los 2 DPP (Tabla 9).

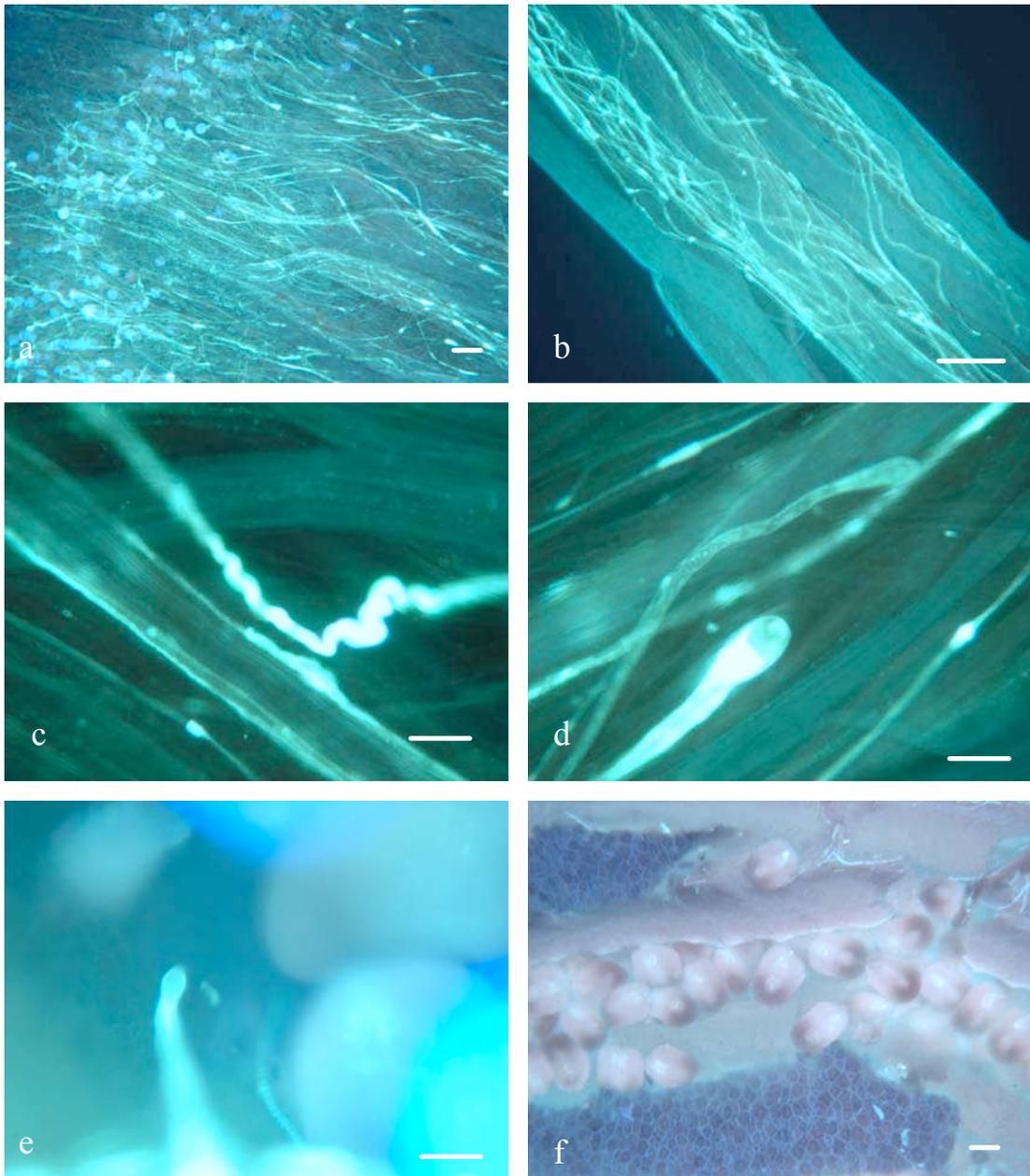
**Tabla 9:** Crecimiento diario del tubo polínico a lo largo del pistilo en los cruzamientos *T. heptaphylla* x *T. ochracea* y recíproco (moda).

	1 DPP	2 DPP	3 DPP	4 DPP
<i>T. heptaphylla</i> x <i>T. ochracea</i>	2 (50%)	4 (10%)	4 (10%)	4 (10%)
<i>T. ochracea</i> x <i>T. heptaphylla</i>	1 (50%)	2 (50%)	3 (10%)	4 (10%)

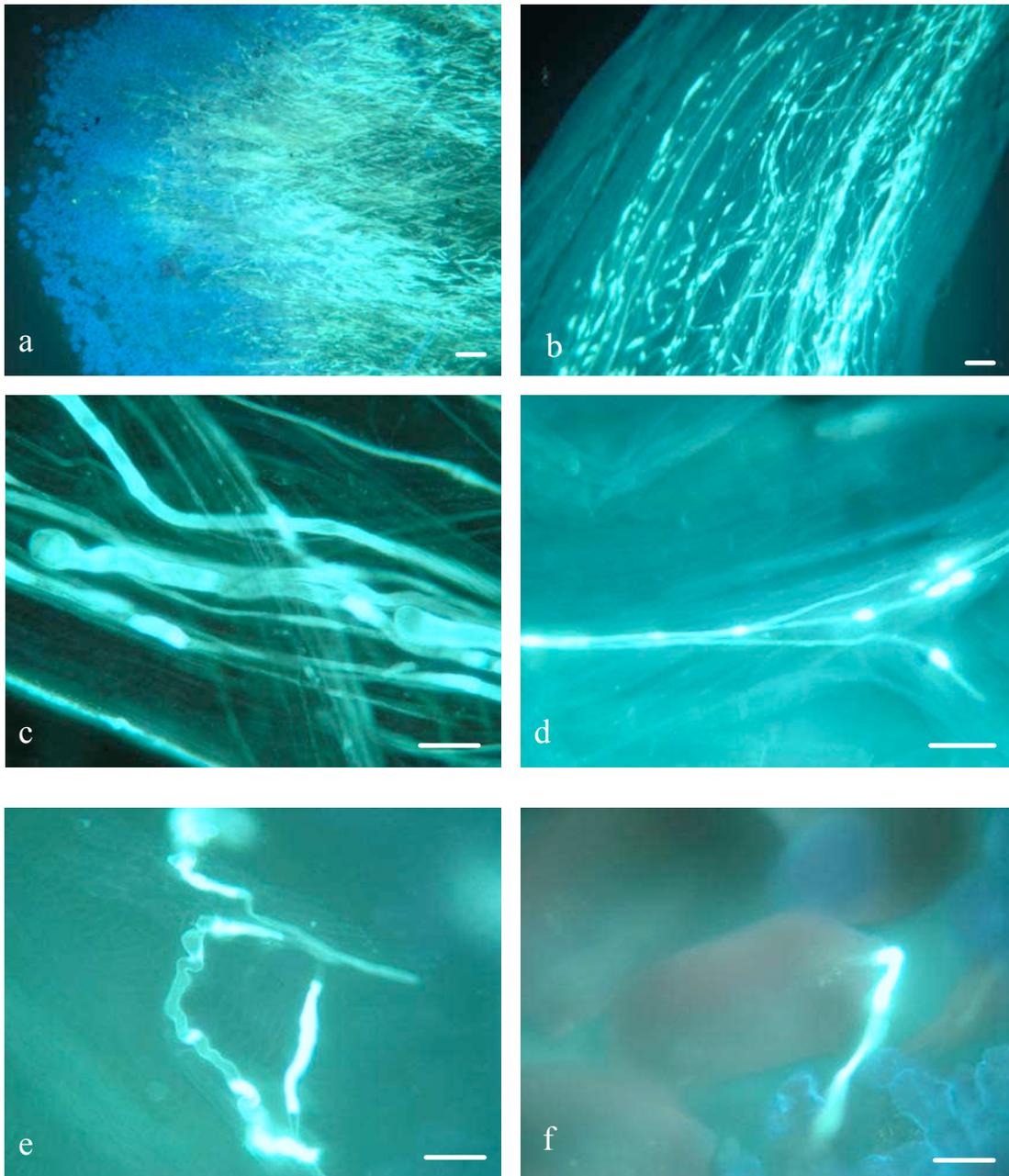
1- Germinación y crecimiento de tubos polínicos en el estigma, 2- crecimiento de tubos polínicos hasta la primera mitad del estilo, 3- crecimiento de tubos polínicos hasta la segunda mitad del estilo, 4- crecimiento hasta el ovario.

Entre paréntesis se indica el porcentaje estimado del total de tubos polínicos que llegan a cada sector del pistilo.

El cruzamiento recíproco (*T. ochracea* x *T. heptaphylla*) se observó una disminución en la velocidad de crecimiento ya que recién a los 4 DPP se observaron tubos polínicos en el ovario. También se observó que el 50% de los tubos polínicos llegaron a la mitad del estigma (Fig. 9 b) y sólo el 10% logró llegar al ovario (Fig. 9 d). Los tubos polínicos que llegaron al ovario presentaron pérdida de la dirección (Fig. 9 e) y se observó que muy pocos de ellos lograron penetrar a los óvulos por la micrópila.



**Figura 11:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. ochracea*, 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** tubo polínico en el estilo **c-** crecimiento tortuoso de tubo polínico en la entrada del ovario, **d-** detalle de puntas engrosadas de tubos polínicos en la entrada del ovario, **e-** tubo polínico con punta engrosada cercano a un óvulo, **f-** ovario sin rastros de tubos polínicos. **Aumentos:** a, b, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; c, d, e, barras = 5  $\mu\text{m}$ ; f, barra = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12:** Tubos polínicos correspondientes al cruzamiento entre *T. ochracea* y *T. heptaphylla*, 4 DPP (MO-F). **a-** tubos polínicos en estigma, **b-** tubos polínicos en el estilo, **c-** tubos polínicos con engrosamientos en el estilo, **d-** tubos polínicos en la entrada del ovario (nótese la poca cantidad) **e-** crecimiento tortuoso de tubos polínicos y con deposiciones anormales de calosa en el ovario **f-** tubo polínico penetrando por la micrópila del óvulo. **Aumentos:** a, b, c, barras = 10  $\mu\text{m}$ ; d, e, f, barras = 5  $\mu\text{m}$ .

### 3- Caracterización de los híbridos

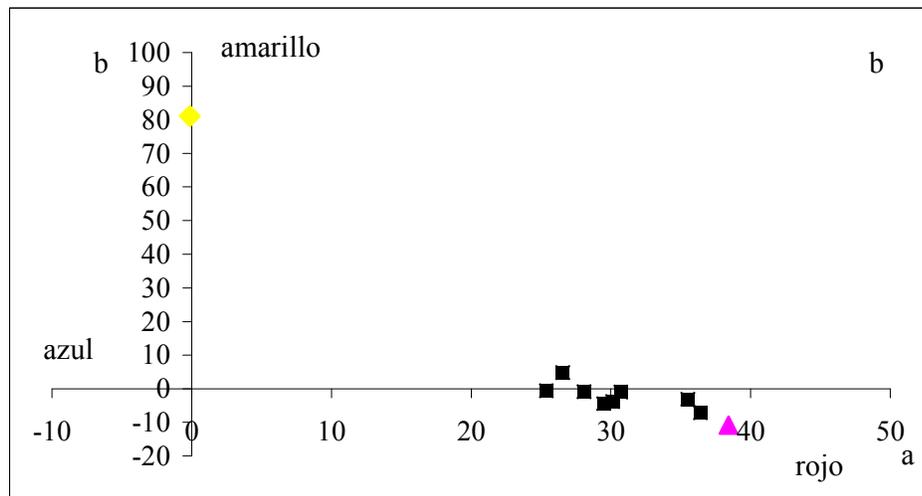
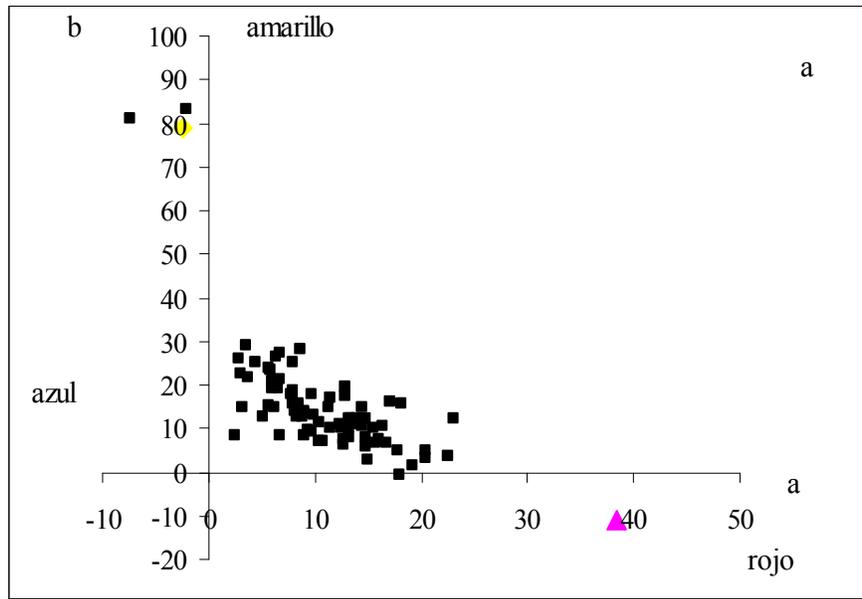
#### *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla*

Tal como se presentó en la Tabla 1, se obtuvieron híbridos a partir del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* en los dos niveles de ploidía de esta última especie (2x y 4x).

Los híbridos provenientes del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* 2x florecieron en el primer año de cultivo al igual que los parentales. Los híbridos provenientes del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) florecieron durante el segundo año de cultivo.

El análisis del color de las flores por colorimetría permitió caracterizar los híbridos. Los valores a y b según el sistema Hunter de los híbridos (*T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* 2x) se ubicaron en posición intermedia con respecto a los parentales, excepto en dos individuos que presentaron un color semejante a *T. pulcherrima* (Figs. 13 a y 14). Es de destacar que dichos individuos resultaron muy promisorios desde el punto de vista de la creación varietal ya que combinaron las características foliares de *T. heptaphylla* y el color de las flores de *T. pulcherrima*. El valor L, indicativo de luminosidad, resultó en los híbridos intermedio al de los parentales (Fig. 15).

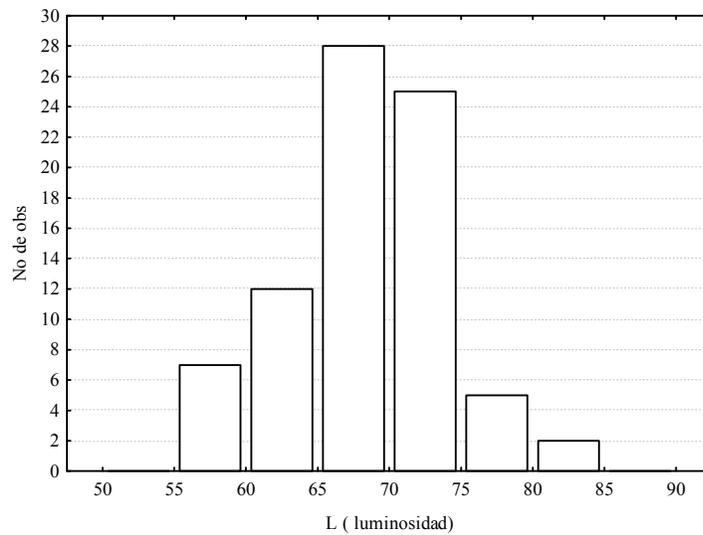
Los híbridos obtenidos a partir del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) presentaron valores de a y b cercanos a los valores del parental masculino (Fig.13 b).



**Figura 13:** Valores de a y b según el sistema Hunter correspondientes al color de los tubos corolinos de los híbridos y los parentales. **a-** híbridos derivados del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (2x) y los parentales. ♦ *T. pulcherrima* ▲ *T. heptaphylla* ■ híbridos. **b-** híbridos derivados del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) y los parentales. ♦ *T. pulcherrima* ▲ *T. heptaphylla* (4x) ■ híbridos. Cada valor representa el promedio de seis observaciones.



**Figura 14:** Inflorescencia correspondiente a un híbrido seleccionado proveniente del cruzamiento entre *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (2x).



**Figura 15:** Luminosidad (valor L según el sistema Hunter) del tubo corolino de los híbridos derivados del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (2x). L: *T. pulcherrima*: 74.2, *T. heptaphylla* (2 x) 48.9.

En la Fig. 16 se presenta el aspecto general de las flores de algunos de los híbridos obtenidos a partir del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (2x) y los parentales. Se puede apreciar la variación en color y forma de las flores provenientes de los híbridos y la presencia de estrías en la garganta en algunos de ellos, presente en el parental femenino (*T. pulcherrima*).



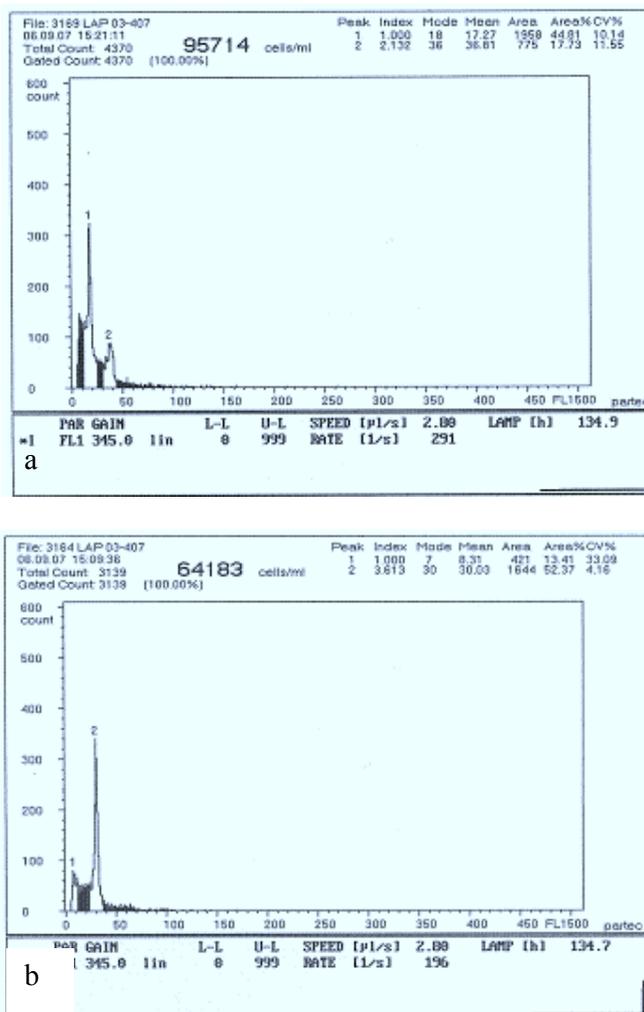
**Figura 16:** Flores de los híbridos correspondientes al cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (**a, b, c, d, e, f**) y los parentales: *T. pulcherrima* (**g**), *T. heptaphylla* 2x (**h**). Aumento: barras = 1 cm.

Debido a que en el cruzamiento *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (4x) están involucrados individuos con diferente tamaño genómico, los híbridos pudieron ser caracterizados usando densitometría de flujo. En la tabla 10 se presentan los valores numéricos que arrojaron dichos análisis, en la misma se aprecia los valores de moda y promedio intermedios de los híbridos con respecto a los parentales. En la Fig.17 se observan los gráficos obtenidos cuando se analizaron los parentales y un híbrido obtenido de los mismos.

**Tabla 10:** Valores de fluorescencia relativa (escala lineal y arbitraria) obtenida usando densitometría de flujo correspondientes a *T. pulcherrima*, *T. heptaphylla* (4x) y los híbridos obtenidos.

Genotipos	Moda	Promedio	CV <sup>1</sup>
<i>T. pulcherrima</i>	21	20.73	6.06
<i>T. heptaphylla</i> (4x)	40	38.92	5.78
Híbrido 1	31	30.37	5.76
Híbrido 2	33	32.26	5.43
Híbrido 3	32	31.48	3.97
Híbrido 4	32	30.54	4.09
Híbrido 5	31	33.01	3.79
Híbrido 6	34	27.51	4.54
Híbrido 7	27	28.79	7.82
Híbrido 8	29	31.11	7.23
Híbrido 9	31	30.46	4.10
Híbrido 10	30	33.03	4.16

<sup>1</sup> Coeficiente de variabilidad



**Figura 17:** Cantidad relativa de ADN obtenida por densitometría de flujo. **a-** *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x), **b-** híbrido (*T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* 4x). En la abscisa está representada la fluorescencia relativa (escala lineal, arbitraria) y en la ordenada la cantidad de células contadas.

En la Fig. 18 se presenta el aspecto de la corola de un híbrido proveniente del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* 4x y los parentales. Se puede observar que el híbrido es muy semejante a *T. heptaphylla* 4x (parental masculino) aunque con estrías en la garganta del tubo corolino provenientes de *T. pulcherrima*.



**Figura 18:** Flores de los parentales e híbrido. **a-** *T. pulcherrima*, **b-** *T. heptaphylla* (4x), **c-** híbrido (*T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* 4x). **Aumento:** a, b, c, barras = 1 cm.

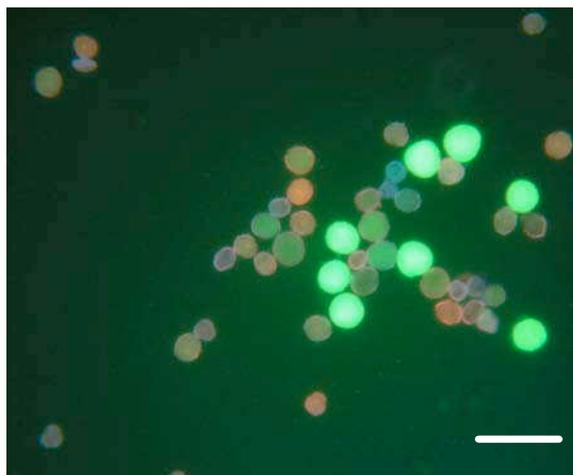
El tamaño de las flores, expresado como el ancho y largo del tubo corolino se presenta en la Tabla 11. Se hallaron diferencias significativas entre los parentales y los híbridos en lo que respecta al largo del tubo corolino, siendo los valores 3.95, 4.95 y 5.64 cm para *T. pulcherrima*, los híbridos y *T. heptaphylla* (4x) respectivamente. Con respecto al ancho no se detectaron diferencias entre los híbridos y el parental femenino aunque sí con el masculino.

**Tabla 11:** Ancho y largo del tubo corolino en los híbridos derivados del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) y los parentales. Promedio y desvío estándar.

	Largo (cm)	Ancho (cm)
<i>T. pulcherrima</i>	3.95 ± 0.10 a	1.63 ± 0.20 a
Híbridos	4.95 ± 0.46 b	1.87 ± 0.21 a
<i>T. heptaphylla</i>	5.64 ± 0.28 c	2.17 ± 0.12 b

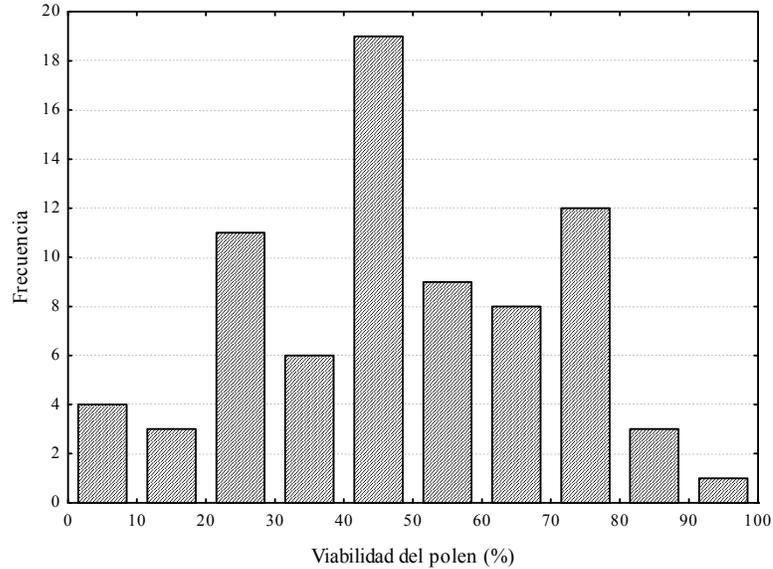
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).

La tinción utilizada para el análisis de la viabilidad del polen de los híbridos obtenidos permitió clasificar fácilmente los granos de polen según en color adquirido. El polen de color verde fluorescente intenso se consideró viable y los que adquirieron una tonalidad roja se consideraron inviables (Fig. 19). Los individuos híbridos presentaron una viabilidad de polen entre 20 y 80%.



**Figura 19:** Viabilidad de polen de un individuo derivado del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* (4x) (MF). **Aumento:** barra = 10  $\mu$ m.

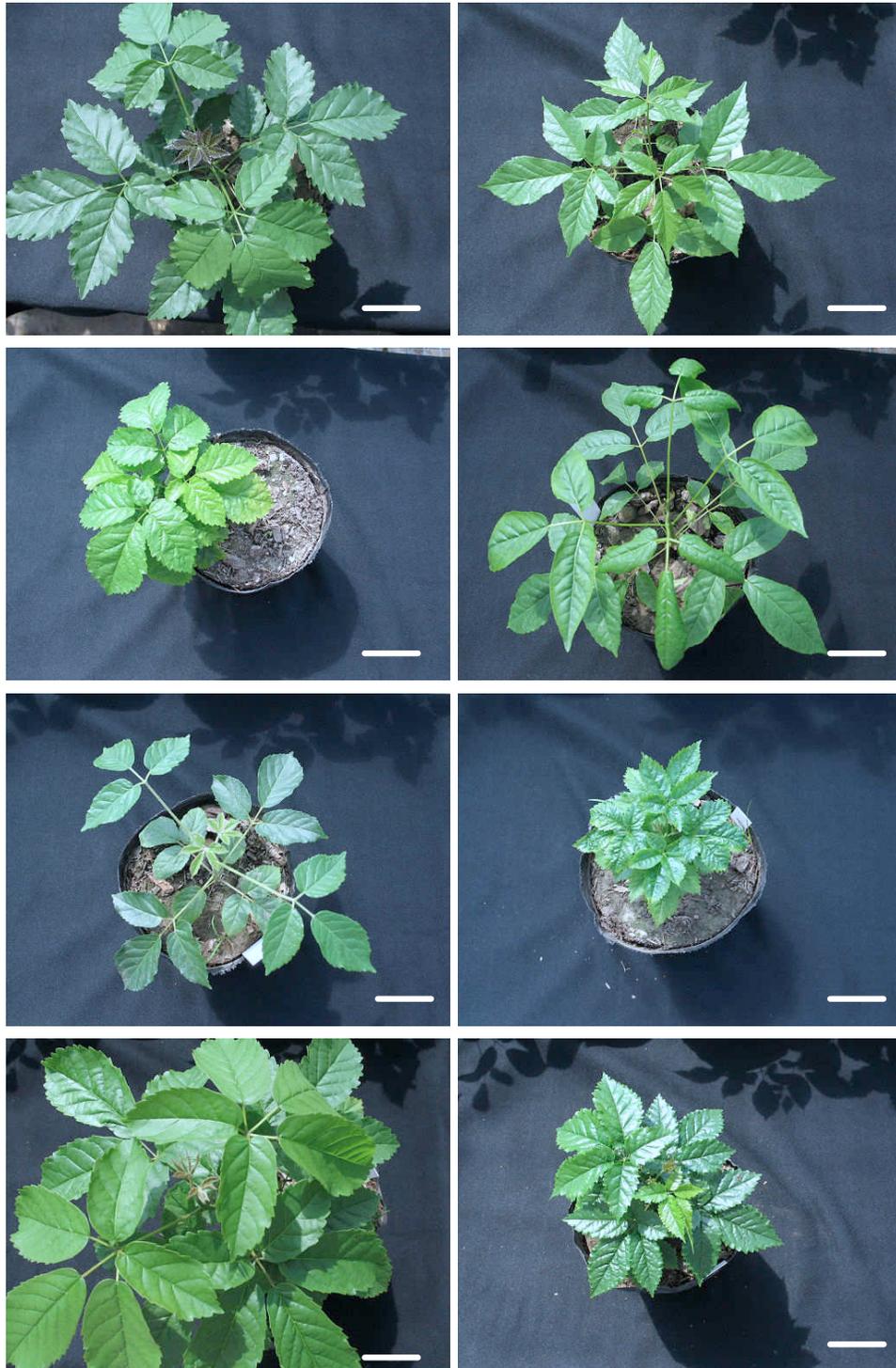
En la Fig. 20 se presenta la frecuencia correspondiente al número de individuos en relación con la viabilidad hallada.



**Figura 20:** Frecuencia (Nº) de híbridos derivados del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* 2x con distintos rangos de viabilidad de polen.

Debido a que se hallaron individuos fértiles entre los híbridos obtenidos fue posible la obtención de una generación segregante a partir del cruzamiento entre hermanos.

En la Fig. 21 se presenta el aspecto general de las plantas F2 a los 4 meses de cultivo donde se puede apreciar la variación hallada en el hábito de crecimiento de las plantas y el polimorfismo presente en las hojas.

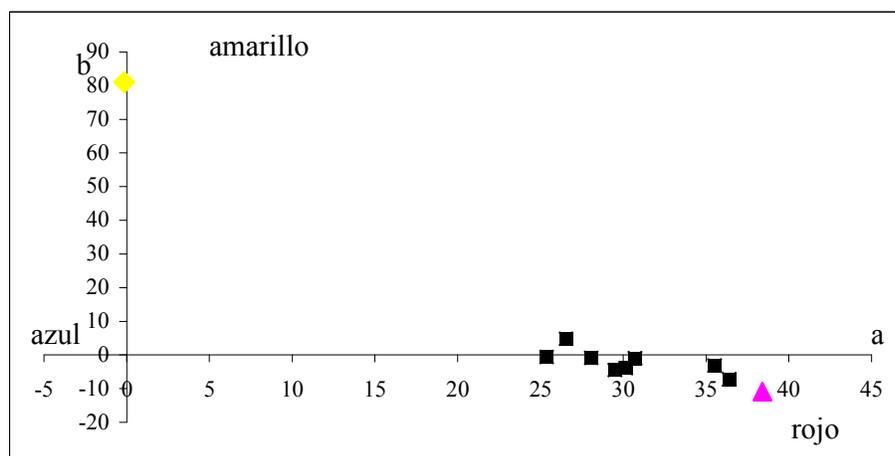


**Figura 21:** Aspecto general de la generación segregante (F2) del cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* 4x a los 4 meses de cultivo. **Aumento:** barras = 5 cm.

*T. heptaphylla* x *T. alba*

Los híbridos resultantes del cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba* florecieron al segundo año de cultivo.

El color del tubo corolino de las flores de los híbridos resultó en una posición intermedia al de los padres a partir de los valores de a y b según el sistema Hunter (Fig. 22).



**Figura 22:** Valores de a y b según el sistema Hunter correspondientes al color de los tubos corolinos de los híbridos derivados del cruzamiento entre *T. heptaphylla* ( $2x$ ) y *T. alba* y los progenitores. ♦ *T. alba* ▲ *T. heptaphylla* ■ híbridos. Cada valor representa el promedio de seis observaciones.

El tamaño de las flores, expresado como el ancho y largo del tubo corolino de los híbridos y sus parentales se presenta en la tabla 12. Se hallaron diferencias significativas en ambas mediciones y los valores de los híbridos resultaron intermedios entre los padres, siendo los valores para el largo del tubo corolino de 4.41, 4.96 y 6.88 cm para *T. heptaphylla*, los híbridos (*T. heptaphylla* x *T. alba*) y *T. alba* respectivamente. Para el ancho, los valores fueron 1.60, 2.29 y 3.00 cm, respectivamente.

**Tabla 12:** Ancho y largo del tubo corolino en los híbridos derivados del cruzamiento entre *T. heptaphylla* (2x) y *T. alba* y los parentales. Promedio y desvío estándar.

	Largo (cm)	Ancho (cm)
<i>T. heptaphylla</i>	4.41 ±0.19 a	1.60 ±0.09 a
Híbridos	4.96 ± 0.27 b	2.29 ±0.26 b
<i>T. alba</i>	6.88 ±0.27 c	3.00 ±0.28 c

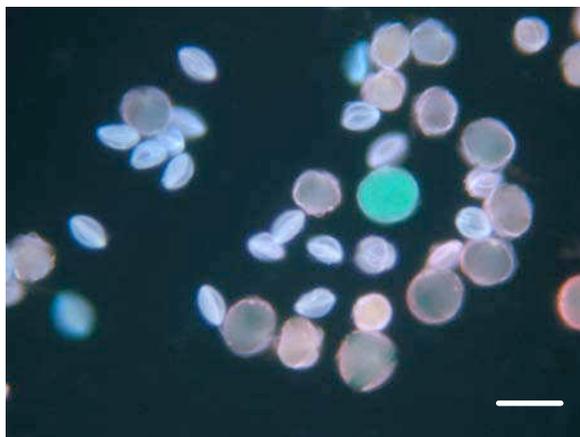
Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).

En la Fig. 23 se presenta el aspecto general de las flores de algunos de los híbridos obtenidos en el cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba* y sus parentales. Se evidencia en la figura la variación en el color y forma de las flores de los híbridos y también en algunos de ellos la presencia de estrías en la garganta, característica de *T. alba* no presente en *T. heptaphylla*.

Con respecto a la viabilidad del polen de los 11 híbridos que llegaron a floración, 5 resultaron 100% estériles, 4 presentaron una viabilidad de polen menor al 10% y solo 2 alrededor de 50%. En la Fig. 24 se puede apreciar gran cantidad de granos de polen colapsados, signo de irregularidades producidas en la meiosis.



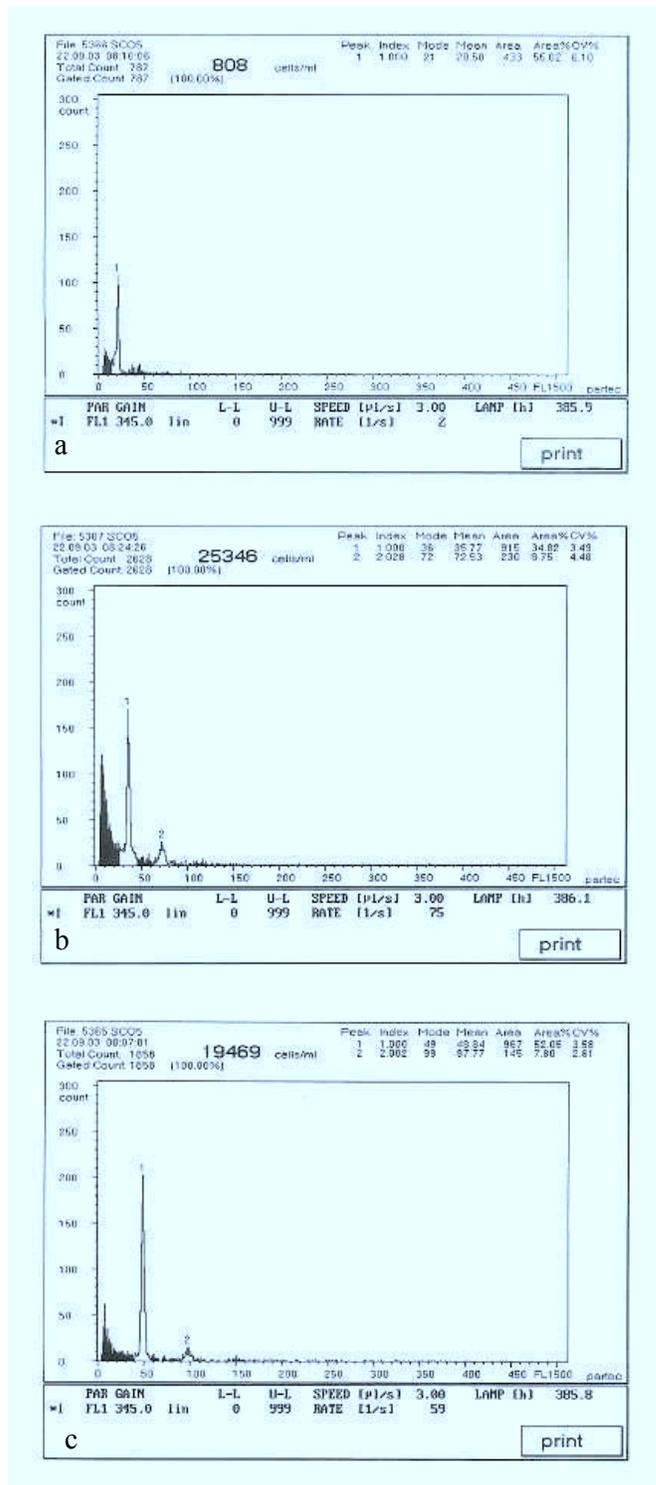
**Figura 23:** Flores de los híbridos correspondientes al cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba* (**a, b, c, d, e, f**) y los parentales: *T. heptaphylla* (**g**), *T. alba* (**h**). **Aumento:** barras = 1 cm.



**Figura 24:** Viabilidad del polen de un híbrido obtenido a partir del cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba* (MF). **Aumento:** barra = 5  $\mu\text{m}$ .

Se comprobó la producción de híbridos en el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. crysotricha*, ambas especies de flores amarillas. Dichas especies presentan distinto tamaño genómico, siendo la primera diploide y la segunda tetraploide (Piazzano, 1998). Por tal motivo se pudieron evaluar tempranamente los híbridos putativos por densitometría de flujo. En la Fig. 25 se presenta la cantidad relativa de ADN correspondiente a los parentales y a una planta híbrida obtenidos, siendo 20.5, 35.8 y 48.8 para *T. pulcherrima*, un híbrido (*T. pulcherrima* x *T. crysotricha*) y *T. crysotricha*, respectivamente. De esta manera, se corroboró la naturaleza híbrida de los individuos obtenidos ya que los valores de fluorescencia relativa en todos los casos analizados fueron intermedios al de los parentales.

No se presentan los datos referidos a la producción de frutos en la hibridación entre especies de *Tabebuia* de flores amarillas ya que no se pudo cumplimentar un número mínimo de cruzamientos en todas las combinaciones y direcciones.



**Figura 25:** Cantidad relativa de ADN obtenida por densitometría de flujo. **a-** *T. pulcherrima*, **b-** híbridos (*T. pulcherrima* x *T. crysotricha*), **c-** *T. crysotricha*. En la abscisa está representada la fluorescencia relativa (escala lineal, arbitraria) y en la ordenada la cantidad de células contadas.

## Discusión

Los resultados obtenidos probaron que existe fertilidad entre algunas especies de *Tabebuia* consideradas en este estudio, y demostraron que la barrera genética entre las mismas es baja.

Los cruzamientos entre *T. pulcherima* y *T. heptaphylla* produjeron frutos en ambas direcciones aunque sólo se obtuvieron plántulas cuando *T. heptaphylla* fue utilizada como donante de polen.

La combinación entre *T. heptaphylla* y *T. alba* produjo frutos sólo cuando *T. alba* fue donante de polen, lo que indica incompatibilidad unilateral. Según Nettancourt (2005), dicho tipo de incompatibilidad se presenta comúnmente cuando una especie auto-incompatible se cruza con una auto-compatible. En este estudio se comprobó que este cruzamiento no sigue tal regla ya que ambas especies, siendo auto-incompatibles produjeron frutos (ver **Capítulo I**).

Los cruzamientos entre *T. heptaphylla* y las siguientes especies: *T. ochracea*, *T. nodosa*, *T. lapacho*, *T. crysotricha* y *T. aurea*, no produjeron frutos lo que sugiere una mayor distancia genética.

Es importante destacar que *T. heptaphylla* produjo híbridos con especies simpátricas (*T. pulcherrima* y *T. alba*) lo que indica que la barrera entre ellas es temporal ya que la floración entre las especies no coincide siendo *T. heptaphylla* de floración más temprana que las otras dos. Los estudios fenéticos realizados por Rivera (1999) agrupan *T. heptaphylla* y *T. alba*, dejando al resto de las especies de *Tabebuia* alejadas de las anteriores.

El estudio del crecimiento del tubo polínico en el pistilo basado en la afinidad del fluorocromo azul de anilina a la calosa ha resultado efectivo para el análisis de los eventos post polinización en los cruzamientos interespecíficos. Tal como afirman Dumas y Knox (1983), el estudio de la deposición de la calosa provee información acerca del diálogo que se produce entre el tubo polínico y el pistilo en el caso de los cruzamientos interespecíficos evidenciando la distancia genética entre las especies involucradas.

En el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* y su recíproco, se observó que los tubos polínicos detenían su crecimiento en distintos niveles del estilo lo que indica que las barreras pre-fertilización no estuvieron restringidas específicamente a un nivel en particular del mismo, sino que por el contrario pudo ser activa en varios niveles. Shivanna (2005) menciona que las barreras previenen la fertilización interrumpiendo el crecimiento del tubo polínico en un nivel determinado o en varios niveles y sugiere entre otras posibles causas, que podría ser producido por la ausencia de factores quimiotrópicos en la micrópila.

También se observó que los tubos polínicos llegaron a los óvulos más rápidamente en *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* que en su recíproco. A pesar que la cantidad de tubos polínicos que llegan a los óvulos es semejante en el cruzamiento entre *T. pulcherrima* y *T. heptaphylla* y su recíproco, en el primer caso, los tubos polínicos llegaron a los óvulos más tempranamente. Es de destacar que sólo en este sentido se obtuvieron individuos híbridos. Se podría postular que en este caso se produciría la fecundación antes que algún mecanismo de incompatibilidad a nivel del ovario, se haga efectivo. Una disminución similar en la velocidad de crecimiento en cruzamientos incompatibles es reportada en *Petunia hybrida* Vilm. (Herrero y Dickinson (1981) y en *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. (Kaufman y Rumpunen, 2002).

En el caso de *T. alba* x *T. heptaphylla*, los tubos polínicos crecieron en forma tortuosa sobre el estigma lo que provocó la pérdida de la dirección. Este tipo de inhibición del crecimiento de los tubos polínicos en el estigma es una de las barreras más frecuentes reportadas y se presenta particularmente cuando se cruzan especies filogenéticamente distantes. Shivana (2005) menciona algunas posibles causas de tal inhibición: falta de adhesión del polen al estigma, hidratación incompleta o ausencia de factores en el estigma para la germinación del polen, incapacidad del tubo polínico en utilizar los nutrientes del estilo, escasez de nutrientes o falta de enzimas necesarias.

La identificación de patrones diferentes de deposición de calosa en las combinaciones *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* y *T. heptaphylla* x *T. alba* está indicando mecanismos diferentes de incompatibilidad. Estas anomalías diferentes podrían representar modificaciones en la síntesis o en la deposición de calosa. Según Williams *et al.* (1982), el crecimiento tortuoso formando enrollamientos en espiral resultan de un cambio de polaridad o dirección del crecimiento de la pared del extremo del tubo polínico y en caso de engrosamientos en la punta de los tubos polínicos (ballon like) derivan del debilitamiento de la pared y/o de la presión osmótica diferencial entre el tubo polínico y el pistilo y es un producto de la interacción entre ambos.

Entre los cruzamientos que no produjeron frutos, como en el caso de los cruzamientos entre *T. heptaphylla* y *T. crysotricha* se halló que la incompatibilidad era pre-cigótica. Se sugieren dos sitios de auto-incompatibilidad, uno más pronunciado que se produce en el nivel del estigma donde se detectó menor cantidad de granos de polen germinados y anomalías en el crecimiento del tubo polínico (crecimiento tortuoso) y otro que se produce en la segunda mitad del estilo con una excesiva deposición de calosa. En el caso del cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. ochracea* y su recíproco, se observó que en las dos direcciones 10 % de los tubos polínicos llegaron a los ovarios

pero en la primera dirección, éstos llegaron más rápidamente. Es interesante aclarar que en los cruzamientos exitosos, es decir aquellos donde se obtuvo descendencia, la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos fue mayor que en los no exitosos tal como reportaron Herrero y Dickinson (1981) en *P. hybrida*.

La caracterización de la presencia de barreras pre-cigóticas para la hibridación interespecífica en el género *Tabebuia* llevada a cabo en este trabajo, permitirá establecer estrategias que permitan superarlas de manera racional y eficiente. Muchas técnicas se han propuesto para ello, tales como polinización en pimpollo, corte de estilo y posterior polinización, injerto de estilo, polinización *in vitro*, uso de mezcla de polen compatible e incompatible (*mixed pollen*) o polen compatible inactivado por irradiación pero aún capaz de germinar (*mentor pollen*), tratamientos químicos, etc. (Van Tuyl y De Jeu, 2005). Se continuará trabajando en la evaluación y selección de la técnica más apropiada a aplicar en aquellos cruzamientos abordados en esta tesis que no produjeron frutos.

La caracterización morfológica de cada uno de los híbridos tal como color de los tubos corolinos y tamaño de las flores no sólo permitió confirmar su naturaleza híbrida, sino también la efectividad de la polinización, debido a que dichas características resultaron intermedias en los híbridos con respecto a los parentales. La escasa bibliografía que hace referencia a la posibilidad de hibridación entre distintas especies de *Tabebuia* no la verifica por ningún método. Bittencourt (2003) sólo da valores de germinación de las semillas híbridas putativas y Gentry (1992) sólo sospecha la posibilidad de hibridación interespecífica entre especies de Cuba debido a que encuentra dificultades taxonómicas.

Asimismo, la obtención de estos híbridos puede contribuir para elucidar problemas de tipo taxonómico que actualmente se están investigando como es el caso de la nueva especie *T. aguaraguensis* propuesta por Zapater y Califano (com. pers.).

Desde el punto de vista del mejoramiento de *Tabebuia* la obtención de híbridos en estas combinaciones fue de sumo interés por la variación obtenida especialmente en lo que se refiere a la coloración de las flores. Asimismo, la fertilidad en algunos ejemplares permitió la obtención de una generación segregante.

La capacidad de florecer en estados tempranos del desarrollo previamente encontrado en *T. heptaphylla* pudo ser transferida a los híbridos. Esta característica permitió seleccionar individuos en el primer y/o segundo año de cultivo. Esos individuos fueron clonados y actualmente están siendo evaluados para la posible producción comercial. Estos clones y la selección de futuros clones en las generaciones segregantes, permitirán formar una serie comercial de variedades que se sumarán al clon *Sorpresa Rosa-INTA* (ver **Anexo II**).

**Propagación de clones selectos de *T. heptaphylla* por injertos: influencia del porta-injerto.**



## Introducción

La propagación vegetativa constituye una etapa esencial en la multiplicación masiva de clones selectos. Entre otros métodos, el enraizamiento de estacas es el método más comúnmente usado para la clonación de especies leñosas aunque en muchos casos la clonación por injertos es utilizada.

El objetivo principal de aplicar la técnica de injerto es propagar clones selectos que no pueden ser propagados fácilmente por otras técnicas de propagación asexual. También, es posible obtener otros beneficios de ciertos porta-injertos como renovar cultivares de cultivos ya establecidos, acelerar la madurez reproductiva, obtener formas especiales de crecimiento de las plantas y estudiar enfermedades virales (Hartman, 1997).

Sax (1950) recomienda este método para la producción de plantas ornamentales leñosas y puntualiza sus efectos en los hábitos de crecimiento. Sin embargo, los reportes sobre el tema son escasos y la información disponible se limita especialmente a los árboles frutales (Smith *et al.*, 2003; Stenzel *et al.*, 2003) y también ha sido usada con éxito en rosas (Ohkawa, 1986; Cid *et al.*, 1989). Al presente, no hay información acerca del uso de esta técnica para la clonación de especies de *Tabebuia*.

Debido a que *T. heptaphylla* es una especie de dificultoso enraizamiento, se estudió la posibilidad de su clonación a partir de la técnica de injerto.

En este capítulo se presentan los resultados de los ensayos experimentales realizados en dos clones selectos de *T. heptaphylla* y su relación con cuatro porta-injertos.

### Objetivo general

Determinar la factibilidad del injerto como método de propagación de genotipos selectos de *Tabebuia*.

### **Objetivo parcial**

Seleccionar un porta-injerto que mantenga las características de los clones seleccionados de *T. heptaphylla*, entre ellos el mantenimiento de la capacidad de florecer en estados tempranos del desarrollo luego del injerto de los mismos.

### **Materiales y métodos**

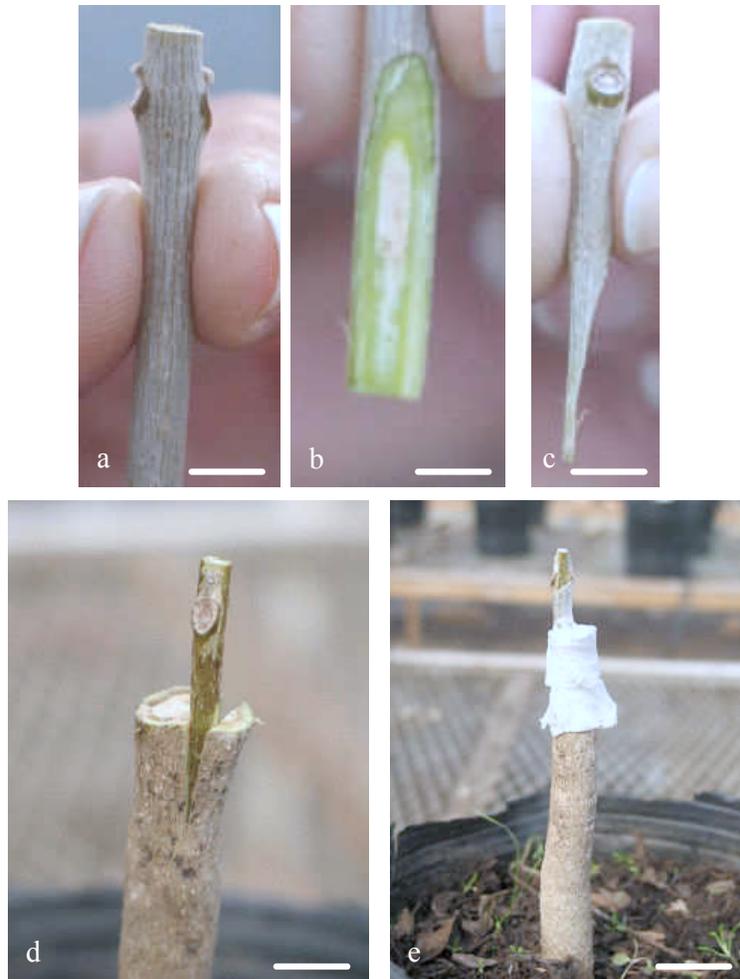
Se utilizaron como porta-injerto plantas de un año de cultivo provenientes de semillas. Se utilizaron tres entradas de *T. heptaphylla*: hept 1 (genotipo sin la capacidad de florecer en estados tempranos del desarrollo), hept 2 (genotipo seleccionado por florecer en el primer año de cultivo), hept 3 (genotipo con floración a los 3 años de cultivo) y una entrada de *T. impetiginosa*, imp 1 (genotipo sin floración en estados tempranos del desarrollo).

Se utilizaron como púas dos clones de *T. heptaphylla*, los cuales fueron seleccionados por florecer en el primer año de cultivo (A y B) y se utilizó un clon sin dicha característica como testigo (C).

A mediados de febrero de 2002, se procedió a la realización de los injertos. Estos fueron de púa terminal. Se utilizaron púas desfoliadas de 2 cm con un nudo a las cuales se les hizo un corte basal en bisel; luego se adosaron al porta-injerto, el cual fue hendido en su parte central. Se puso en contacto el cambium del porta-injerto con el de

la púa y se colocó ajustadamente una cinta de injertar (Fig. 1). La púa fue mantenida cubierta con un film por al menos 20 días. El material injertado se colocó en invernáculo bajo una malla de sombreo del 80% (saram).

Los clones A, B, y C fueron injertados en los porta-injertos hept1, hept 2, hept 3 e imp 1. Se consideraron 10 plantas para cada combinación.



**Figura 1:** Secuencia correspondiente al injerto de púa terminal en *T. heptaphylla*. **a-** púa, **b-** detalle corte basal de la púa, **c-** detalle lateral de la púa, **d-** corte del porta-injerto y ubicación de púa, **e-** fijación porta-injerto y púa con film. **Aumentos:** a, b, c, barra = 0.5 cm; d, barra = 2 cm; e, barra = 5 cm.

Se evaluaron las siguientes características: (i) cantidad de plantas florecidas en el primer ciclo de cultivo, (ii) período a floración, (iii) altura de las plantas en plena floración y (iv) crecimiento vegetativo post- floración. Se relevó también la cantidad de

plantas florecidas en el segundo ciclo de cultivo, el número de inflorescencias por planta y el largo del tubo corolino (20 flores por combinación).

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Estatística* versión 6.1 Stat Soft®.

## Resultados

La aplicación de la técnica de injerto para la propagación de *T. heptaphylla* fue exitosa ya que se obtuvieron plantas en el 91.7 % de los injertos realizados en las combinaciones analizadas y no se observaron síntomas externos de incompatibilidad entre el porta-injerto y los clones injertados (Fig. 2).



**Figura 2:** a- Aspecto general del material injertado de *T. heptaphylla* a los 30 días de realizado el mismo, b- detalle de la unión entre el porta-injerto y la púa a los 2 meses de realizado en injerto. **Aumentos:** a, barra = 5 cm; b, barra = 1 cm.

El porcentaje de plantas que llegaron a plena floración varió entre 30 y 100 % cuando los clones A y B fueron utilizados como púas (Tabla 1). El clon A presentó mayor porcentaje de floración que el clon B en todos los porta-injertos evaluados. El 77.8-100 % de las plantas florecieron cuando hep 2, hep 3 e imp 1 fueron utilizados

como porta-injerto, cuando el clon fue injertado sobre hep 1 sólo florecieron el 62.5 % de las plantas. Los clones A y B florecieron dentro de los seis meses de realizado el injerto. El clon C (control) no llegó a floración en ninguno de los porta-injertos evaluados (Tabla 1).

**Tabla 1:** Efecto del propagación a través de injerto en la floración de tres clones de *T. heptaphylla*.

Clones	Pie	Plantas (N°)	Plantas florecidas (N°)	Días a floración (prom ±SD)	Altura a floración (cm)	Plantas florecidas en el segundo ciclo (N°)
A	hep. 1	8	5 (62.5) <sup>1</sup>	170.4±6.9	28.4 a	5 (62.5) <sup>1</sup>
	hep. 2	9	9(100.0)	160.6±10.9	36.2 a	9 (100.0)
	hep. 3	9	7 (77.8)	145.0±12.9	32.9 a	6 (66.7)
	imp. 1	8	7 (87.5)	157.1±16.2	37.2 a	7 (87.5)
B	hep. 1	10	3 (30.0)	169.3±6.5	37.7 ab	4 (40.0)
	hep. 2	10	7 (70.0)	167.6±5.7	35.4 a	8 (80.0)
	hep. 3	9	6 (66.7)	152.7±4.1	45.8 bc	7 (77.8)
	imp. 1	10	4 (40.0)	170.3±6.3	51.0 c	6 (60.0)
C	hep. 1	10	0 (0.0)	—	—	-
	hep. 2	10	0 (0.0)	—	—	-
	hep. 3	8	0 (0.0)	—	—	-
	imp. 1	9	0 (0.0)	—	—	-

<sup>1</sup> porcentaje

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

La altura a floración no mostró diferencias significativas cuando el clon A fue injertado en los cuatro porta-injertos. En el clon B, la altura que las plantas presentaban en plena floración fue menor cuando se usaron como porta-injertos hep. 1 y hep. 2 (Tabla 1).

En el segundo ciclo de cultivo se relevaron la cantidad de plantas florecidas y se observó la misma tendencia que en la primera observación.

Las características ornamentales tales como largo del tubo corolino y número de inflorescencias por planta fueron similares en algunas combinaciones excepto en el caso del clon A en donde el tubo corolino fue más largo cuando éste fue injertado sobre hep. 2 y hep. 3 (Tabla 2).

**Tabla 2:** Longitud del tubo corolino y número de inflorescencias por planta en el clon A y B de *T. heptaphylla*.

Porta- injerto/ clon	Long del tubo corolino (cm)		Inflorescencias /planta N°	
	Clon A	Clon B	Clon A	Clon B
hep. 1	4.52 a	4.79 a	1.4 a	1.3 a
hep. 2	4.95 b	4.97 a	1.7 a	1.4 a
hep. 3	4.79 b	4.90 a	1.8 a	1.3 a
imp. 1	4.69 a	4.50 a	1.6 a	1.3 a

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).

El crecimiento vegetativo medido como la altura de las plantas luego de la floración se presenta en la Tabla 3. Los datos obtenidos a los 7 meses de realizado el injerto (septiembre) demostraron que el clon A produjo plantas más compactas sobre los cuatro porta-injertos evaluados. Con respecto a la altura de las plantas a los 10 meses de cultivo (diciembre), las plantas más bajas fueron obtenidas cuando el clon A fue injertado sobre hept. 1 y hept. 2 y en el caso del clon B, cuando fue injertado sobre hept. 2.

En la Fig. 3 se presenta el clon A sobre los cuatro porta-injertos evaluados a los 6 meses de realizado el injerto.

**Tabla 3:** Efecto del propagación a través de injerto en el crecimiento vegetativo de tres clones de *T. heptaphylla*.

Clones	Pie	Altura de la planta (cm)		
		3-sep.	12-nov.	18-dic.
A	hep. 1	32.7 a	40.9 a	52.8 a
	hep. 2	37.5 a	48.6 ab	71.0 ab
	hep. 3	35.0 a	71.3 cde	105.1 d
	imp. 1	38.0 ab	57.6 bcd	95.0 cd
B	hep. 1	58.0 c	73.0 de	92.7 cd
	hep. 2	55.9 c	57.0 bc	63.9 a
	hep. 3	53.5 c	64.6 cd	84.0 bc
	imp. 1	48.8 bc	59.6 bcd	68.1 ab
C	hep. 1	48.8 bc	80.6 e	110.7 d
	hep. 2	53.5 c	65.6 cd	69.8 ab
	hep. 3	48.7 bc	60.9 bcd	83.6 bc
	imp. 1	52.4 c	72.5 de	95.6 cd

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas según test de Tukey ( $p < 0.05$ ).



**Figura 3:** Aspecto general del clon A de *T. heptaphylla* en los cuatro porta-injertos evaluados a los 6 meses de realizado el injerto. **Aumento:** Barra = 5 cm.

### Discusión y conclusiones

Se obtuvieron plantas en el 91.7 % de los injertos realizados en las combinaciones analizadas y no se observaron síntomas externos de incompatibilidad lo que sugiere que el método de injerto fue válido para la propagación de clones selectos de *T. heptaphylla*.

Hep 2 resultó ser el porta-injerto más apropiado para la producción en maceta ya que el crecimiento de los clones seleccionados fue menos vigoroso que en los otros porta-injertos considerados, lo que permite obtener plantas más compactas. Además sobre dicho porta-injerto, el 100% y 70-80% de las plantas correspondientes a los clones A y B respectivamente florecieron. Esto concuerda con lo observado por Brennan *et al.* (1998) en *Leucaena* Benth donde se demuestra que los porta-injertos afectaron el crecimiento vegetativo de clones selectos.

Los clones A y B florecieron cuando eran injertados en los cuatro porta-injertos evaluados, el clon C (control) no floreció en ninguno de ellos. De estos resultados se deduce que la capacidad de florecer en estados tempranos del desarrollo de los porta-injertos hep. 2 y hep. 3 no fue transferida al clon C.

Se puede concluir que la forma compacta y la capacidad de florecer en estados tempranos del desarrollo del clon A no se alteraron por la técnica de clonación evaluada, aunque la combinación con hept. 2 produjo mayor número de plantas con flores.

## **Conclusiones finales y perspectivas**



La presente tesis permitió abordar aspectos relativos a la auto-incompatibilidad y la compatibilidad interespecífica en el género *Tabebuia*, y avanzar en los estudios de la caracterización y mecanismos de acción de ambas.

Las principales conclusiones son las siguientes:

- ✓ Se comprobó la existencia de un sistema de auto-incompatibilidad, que opera en las tres especies estudiadas: *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*. El sistema de auto-compatibilidad pudo ser categorizado como de acción tardía (late acting self-incompatibility) al comprobarse que los tubos polínicos crecen hasta el ovario en los pistilos auto-polinizados.
- ✓ La homogeneidad en la abscisión de los pistilos y en el estado de desarrollo del endosperma previo a la abscisión permitieron confirmar que se trata de un sistema de auto-incompatibilidad y no de depresión por endogamia.
- ✓ En la auto-polinización de las tres especies, se comprobó la eficiencia de la doble fecundación. Sin embargo, la abscisión de los pistilos, que se produce entre los 4 y 8 DPP, (según la especie) puso en evidencia la auto-incompatibilidad de los cruzamientos.
- ✓ En la polinización cruzada y en la auto-polinización, durante el período de 4-8 días que siguen a la doble fecundación, el endosperma inicia su desarrollo. La orientación de las paredes en las primeras divisiones y el origen de los haustorios, permiten caracterizar la endospermogénesis como de tipo *Parmentiera* en la clasificación de Govindu.

- ✓ En las tres especies, el estado de endospermogénesis más avanzado que se encontró en el momento de la abscisión de los pistilos, fue el de 8-células. Hasta ese estado, el cigoto permanece indiviso.
- ✓ Se detectó que la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos es diferente según se trate de auto-polinización (los tubos polínicos llegan a los óvulos a los 2 DPP) o de polinización cruzada (los tubos polínicos llegan al óvulo 3 o 4 DPP, variando según la especie).
- ✓ Por inducción de poliploidía se obtuvo variación genética en el género *Tabebuia*. Los genotipos tetraploides cuando se los compara con su contraparte diploide, resultaron de menor altura y el color de sus hojas fue más intenso. Se obtuvieron individuos triploides estériles a partir del cruzamiento de individuos diploides con tetraploides. Dichos materiales ameritan futuras evaluaciones considerando la posibilidad de obtener variedades que presenten mayor longevidad floral.
- ✓ Se confirmó la ruptura de la auto-incompatibilidad en los individuos tetraploides de *T. heptaphylla*.
- ✓ Se estableció la aptitud combinatoria en el género *Tabebuia*; se obtuvieron híbridos en los siguientes cruzamientos: *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (2x), *T. pulcherrima* x *T. heptaphylla* (4x); *T. heptaphylla* (2x) x *T. alba* y *T. pulcherrima* x *T. crysotricha*.
- ✓ Se comprobó la existencia de incompatibilidad unilateral en el cruzamiento entre *T. heptaphylla* y *T. alba*.
- ✓ Se determinó que los mecanismos de incompatibilidad interespecífica operan previo a la fecundación (mecanismos pre-cigóticos).

- ✓ Los estudios relativos a la propagación de clones selectos de *T. heptaphylla* permitieron afirmar que el método de injerto es válido ya que mantiene las características de los clones especialmente en lo relativo a la capacidad de florecer en el primer ciclo de cultivo.

Otras conclusiones menores, que continúan en estudio:

En *T. heptaphylla*:

- ✓ En los tubos polínicos se reportan dos patrones de deposición de calosa, diferentes según se trate de auto-polinización o de polinización cruzada. En los tubos polínicos crecidos en pistilos auto-polinizados, los tapones fueron más frecuentes y de mayor tamaño.
- ✓ El contenido de P, S, K y Ca en las papilas estigmáticas y en el polen adherido a las mismas es diferente, según se trate de auto-polinización o de polinización cruzada.

En *T. heptaphylla*, *T. alba* y *T. pulcherrima*:

- ✓ Se caracterizó el estigma como de tipo húmedo, de acuerdo a la clasificación de Heslop Harrison y Shivana.
- ✓ Se estudió las características histológicas de los tejidos del estigma y del estilo asociados al crecimiento del tubo polínico y el proceso de secreción de los exudados.

- ✓ Se detectó la ocurrencia de un proceso de autofagia operando en las papilas de las ramas estigmáticas en el momento de la anthesis. De este modo se reporta un programa de muerte celular programada en tejidos florales.

Estos estudios han enriquecido el plan de mejoramiento del género *Tabebuia* que se lleva a cabo en el Instituto de Floricultura INTA-Castelar debido a que se obtuvieron materiales con interés ornamental (plantas poliploides, híbridos interespecíficos) y se ha generado información básica relativa a la biología reproductiva. Ambos hechos aportan valiosas herramientas para encarar nuevas estrategias. En efecto, al confirmar que las barreras a la hibridación interespecífica operan a nivel pre-cigótico, se pueden seleccionar técnicas para sortearlas como polinización en estado de pimpollo, corte del estilo seguida de polinización, injerto de estilo, polinización *in vitro*, etc. La confirmación de que los híbridos obtenidos florecen en estados tempranos de desarrollo posibilita la obtención de nuevas variedades de valor ornamental.

## **Anexo I**



El material utilizado en esta tesis forma parte de la colección del género *Tabebuia* que se conserva *in vivo* en el Instituto de Floricultura (IF), INTA Castelar.

La colección se mantiene en invernáculo con control de temperatura mínima (15° C). La propagación del material se realizó a través de injertos (ver **Capítulo IV**). Se realizan periódicamente tareas de mantenimiento de la colección tales como podas, cambio de sustrato y realización de nuevos injertos para rejuvenecimiento del material.

La codificación del material proveniente de las recolecciones está formada por un número compuesto por el año, el mes y el día de recolección, seguido de una letra que está asociada a la parada (código de ubicación o parada), terminando con un número correlativo relacionado a cada colecta en dicha parada. Ejemplo: si se realiza un viaje de recolección el día 3 de enero de 2006 y en la primera parada se recolectan 2 entradas. Los códigos asignados serían: 20060103A1 y 20060103A2, la siguiente parada llevaría el código 20060103B, siguiendo los números correlativos de acuerdo a las entradas incorporadas en esa parada y así sucesivamente.

Los datos de pasaporte relativos a toda la colección asociados a los números antes mencionados se encuentran en la base de datos *BG-BASE* del IF y está disponible para la comunidad científica.

La codificación del material en proceso de mejoramiento, es decir luego de la realización de cruzamientos, selección, poliploidización, etc. está formado por un número compuesto por el año, el mes y el día, seguido de la letra “X” indicando que fue cosechado/seleccionado en el IF; finalmente tiene un número de orden correlativo. Ejemplo: se selecciona una planta por determinadas características el día 3 de enero de 2006, dicha planta tendrá la codificación. 20060103x1. Los datos relativos a los materiales en proceso de mejoramiento siguen esta codificación y están disponibles en un libro foliado.

Todo el proceso que se lleva a cabo en el área de Mejoramiento del IF, tal como recolección de germoplasma, caracterización, mejoramiento, evaluación y propagación, está bajo un sistema de gestión de la calidad según la Norma ISO 9001 (ISO, 2000).

**Tabla 1:** Entradas de *Tabebuia* utilizadas en los cruzamientos realizados en el **Capítulo I.**

<b>Taxón</b>	<b>Código</b>	<b>Lugar</b>	<b>Colector o mejorador</b>	<b>Observaciones<sup>1</sup></b>
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	PM-IF	KA, GF	Floración profusa en ETD
<i>T. heptaphylla</i>	20010813x25	PM-IF	KA, GF, SS	Floración profusa en ETD
<i>T. heptaphylla</i>	20010813x26	PM-IF	KA, GF, SS	Floración profusa en ETD
<i>T. pulcherrima</i>	20010927F2	Misiones	KA, GF	Floración profusa
<i>T. pulcherrima</i>	20010927A1	Misiones	KA, GF	Floración en ETD
<i>T. alba</i>	20010925I1	Misiones	KA, GF	Floración profusa
<i>T. alba</i>	20010925I4	Misiones	GF, SS	Floración profusa

<sup>1</sup> Se indican los principales motivos de la recolección o selección dentro del plan de mejoramiento de *Tabebuia*.

KA Ken-ichi Arizumi; GF Gabriela Facciuto, SS Silvina Soto

PM-IF: Material obtenido a partir del Plan de Mejoramiento del Instituto de Floricultura.

ETD: estados tempranos del desarrollo.

**Tabla 2:** Entradas de *Tabebuia* utilizadas en los cruzamientos realizados en los **Capítulos II y III.**

<b>Taxón</b>	<b>Código</b>	<b>Lugar</b>	<b>Colector o mejorador</b>	<b>Observaciones<sup>1</sup></b>
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	PM-IF	KA, GF	Floración profusa en ETD.
<i>T. hetaphylla</i>	20020527x2	PM-IF	GF	Genotipo tetraploide
<i>T. hetaphylla</i>	20010813x25	PM-IF	GF	Floración profusa en ETD
<i>T. pulcherrima</i>	20010927F2	Misiones	KA, GF	Floración profusa
<i>T. pulcherrima</i>	20010927A1	Misiones	KA, GF	Floración en ETD
<i>T. alba</i>	20010925I4	Misiones	KA, GF	Compacidad
<i>T. alba</i>	20010926B1	Misiones	KA, GF	Floración en ETD
<i>T. alba</i>	20010925I1	Misiones	KA, GF	Floración profusa
<i>T. alba</i>	20010925I4	Misiones	KA, GF	Floración profusa
<i>T. ochracea</i>	20000927G1	Salta	KA, GF	Compacidad
<i>T. nodosa</i>	20051208B1	Salta	GF, SS	Floración en ETD
<i>T. lapacho</i>	20000927F2	Salta	KA	Flores grandes
<i>T. crysotricha</i>	20001110x4	PM-IF	KA, GF	Floración profusa
<i>T. aurea</i>	20000923E1	Formosa	KA	Floración en ETD

<sup>1</sup> Se indican los principales objetivos de la recolección o selección dentro del plan de mejoramiento de *Tabebuia*.

PM-IF: Material obtenido a partir del Plan de Mejoramiento del Instituto de Floricultura,

KA Ken-ichi Arizumi; GF Gabriela Facciuto, SS Silvina Soto.

ETD: estados tempranos del desarrollo.

**Tabla 3:** Entradas de *Tabebuia* utilizadas en los cruzamientos realizados en el **Capítulo IV**.

<b>Taxón</b>	<b>Código</b>	<b>Lugar</b>	<b>Observaciones<sup>1</sup></b>
<i>T. heptaphylla</i>	comercial	San Pedro	Porta-injerto (hept. 1)
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x8	PM-IF	Porta-injerto (hept. 2)
<i>T. heptaphylla</i>	20010814x5	PM-IF	Porta-injerto (hept. 3)
<i>T. impetiginosa</i>	comercial	PM-IF	Porta-injerto (imp. 1)
<i>T. heptaphylla</i>	20010815x9	PM-IF	Púa (clon A) floración en ETD
<i>T. heptaphylla</i>	20020527x2	PM-IF	Púa (clon B) floración en ETD
<i>T. heptaphylla</i>	comercial	San Pedro	Púa (clon C) sin floración en ETD

PM-IF: Material obtenido a partir del Plan de Mejoramiento del Instituto de Floricultura.

ETD: estados tempranos del desarrollo.

<sup>1</sup> Codificación y características del material.

## Anexo II



Se presenta en este anexo el descriptor elaborado para el género *Tabebuia* y los datos del clon seleccionado “*Sorpresa Rosa* INTA” a los fines de su inscripción en el Registro Nacional de Cultivares, INASE.

Para obtener un Título de Propiedad, la nueva variedad debe reunir los siguientes requisitos: debe ser diferente, homogénea y estable, debe cumplir con la condición de novedad (comercial) y debe contar con una denominación adecuada. Tanto la información que se solicita como el análisis de la misma tienden a verificar el cumplimiento de estas condiciones y requisitos (<http://www.inase.gov.ar/tikiwiki/tiki-index.php?page=inseRNPC>).

Se debe demostrar que la variedad a presentar es diferente a todas las que están en el mercado en, al menos, una característica. También debe presentar estabilidad genética, es decir no manifestar cambios en las sucesivas multiplicaciones.

Para cumplimentar estos requisitos se deben completar los siguientes documentos:

- 1- *Declaración Jurada de solicitud de inscripción*;
- 2- *Anexo I*; Datos del Solicitante.
- 3- *Anexo II*: Descripción de la variedad;
- 4- *Anexo III*: Fundamentación de la Novedad;
- 5- *Anexos IV a, IV b y IV c*: correspondientes al procedimiento para el mantenimiento de la pureza varietal; origen genético-método de obtención e historia del mejoramiento de la variedad; y condición OGM de la variedad, respectivamente.

## Descriptor *Tabebuia*: "Sorpresa Rosa INTA"

### 1. Planta

#### 1.1 Forma de la planta

<b>2</b>	1. arborea	2. arbustiva
----------	------------	--------------

#### 1.2 Hábito de crecimiento

<b>1</b>	1. vertical	2. semi-vertical	3. horizontal
	4. semi-horizontal		

#### 1.3 Forma de la copa

<b>1</b>	1. circular	2. piramidal	3. elíptica
	4. rectangular	5. piramidal invertida	

#### 1.4 Altura de la planta (primera floración)

<b>2</b>	1. enana (< 30 cm)	2. semi-enana (30-60 cm)	
	3. pequeña (60 cm-1m)	4. mediana (1-2m)	5. alta (> 2m)

### 2. Hojas

#### 2.1 Limbo

<b>2</b>	1. entero	2. lobado
----------	-----------	-----------

#### 2.2 Número de folíolos

<b>3</b>	1. 1	2. entre 2 y 5	3. entre 6 y 7	3. más de 7
----------	------	----------------	----------------	-------------

#### 2.3 Forma de los folíolos

<b>3</b>	1. ovados	2. lanceolados	3. elípticos
----------	-----------	----------------	--------------

**2.4 Margen de los folíolos**

<b>2</b>	1. enteros    2. levemente aserrados    3. muy aserrados
----------	--

**2.5 Longitud (folíolo central)**

<b>2</b>	1. corto (< 5 cm)    2. medio (5-10 cm)    3. largo (10-15 cm) 4. muy largo (>15 cm)
----------	---

**2.6 Ancho (folíolo central)**

<b>2</b>	1. angosto (> 3 cm)    2. medio (3-5 cm)    3. ancho (> 5 cm)
----------	---

**2.7 Forma del ápice (folíolo central)**

<b>3</b>	1. redondeado    2. levemente acuminado 3. acuminado    4. muy acuminado
----------	---

**2.8 Antocianinas en la cara adaxial (en hoja joven)**

<b>1</b>	1. ausentes    2. medio    3. abundantes
----------	--

**2.9 Presencia de tricomas (pelos)**

<b>1</b>	1. poco    2. medio    3. abundante
----------	-------------------------------------

**2.10 Color de la cara adaxial**

<b>2</b>	1. verde claro    2. verde medio    3. verde oscuro
----------	---

**2.11 Color de la cara abaxial**

<b>2</b>	1. blanco verdoso    2. verde claro    3. verde medio 4. verde oscuro
----------	--

**2.12 Variegado**

<b>1</b>	1. ausencia    2. presencia
----------	-----------------------------

**2.13 Forma de la hoja**

<b>2</b>	1. ovada	2. lanceolada	3. elíptica
----------	----------	---------------	-------------

**2.14 Forma del corte transversal de una hoja**

<b>1</b>	1. cóncavo	2. plano	3. convexo
----------	------------	----------	------------

**2.15 Brillo en la cara adaxial**

<b>1</b>	1. ausente 4. fuerte	2. poco	3. medio
----------	-------------------------	---------	----------

**2.16 Pecíolo (longitud)**

<b>3</b>	1. corto (> 4 cm)	2. media (4-8 cm)	3. largo (> 8 cm)
----------	-------------------	-------------------	-------------------

**3. Inflorescencia****3.1 Número de flores por inflorescencia**

<b>4</b>	1. muy pocas (1-10) 4. muchas (>30)	2. pocas (11-20)	3. media (21-30)
----------	--	------------------	------------------

**3.2 Forma (solamente variedades con más de seis flores por inflorescencia)**

<b>1</b>	1. elíptica	2. redondeada	3. cónica
----------	-------------	---------------	-----------

**4. Caliz****4.1 Presencia de tricomas**

<b>2</b>	1. ausencia 4. mucho (abundante)	2. poco	3. medio
----------	-------------------------------------	---------	----------

**4.2 Color (sin tricomas)**

<b>3</b>	1. verde 4. rojo verdoso	2. verde rojizo	3. rojo
----------	-----------------------------	-----------------	---------

## 4.3 Apice del lóbulo del caliz

2	1. truncado	2. obtuso	3. agudo
---	-------------	-----------	----------

## 5. Corola

## 5.1 Longitud del tubo floral (Fig.1)

2	1. corto (< 4 cm)	2. mediano (4-6 cm)	3. largo (6-8 cm)
	4. muy largo (>8 cm)		

## 5.2 Ancho del tubo (Fig.1)

2	1. angosto (< 1 cm)	2. medio (1-2 cm)	3. ancho (> 2 cm)
---	---------------------	-------------------	-------------------

## 5.3 Diámetro (Fig. 1)

(A)

4	1. muy angosto (< 2 cm)	2. angosto (2-3 cm)	3. mediano(3-4 cm)
	4. ancho (4-5 cm) 5. muy ancho (>5 cm)		

(B)

4	1. muy angosto (< 2 cm)	2. angosto (2-3 cm)	3. mediano(3-4 cm)
	4. ancho (4-5 cm) 5. muy ancho (>5 cm)		

## 5.4 Fragancia

2	1. ausente	2. medianamente perfumada
	3. muy perfumada	

## 5.5 Tipo

1	1. simple	2. doble
---	-----------	----------

## 5.6 Número de pétalos (solamente variedad con corola doble)

5	1. pocos (<5)	2. medio (5)	3. muchos (>5)
---	---------------	--------------	----------------

## 5.7 Contorno de los márgenes

3	1. liso	2. levemente ondulado
---	---------	-----------------------

3. ondulado

4. muy ondulado

**5.8** Color del dorso del tubo en la parte central

7	0	B
---	---	---

RHS Colour Chart (indicar número de referencia)

**5.9** Color de los lóbulos superiores

7	0	B
---	---	---

RHS Colour Chart (indicar número de referencia)

**5.10** Color de los lóbulos inferiores

7	0	B
---	---	---

RHS Colour Chart (indicar número de referencia)

**5.11** Color predominante de la garganta

0	9	A
---	---	---

RHS Colour Chart (indicar número de referencia)

**5.12** Pureza del color predominante de la garganta

2
---

1. poco

2. medio

3. mucho

**6. Pistilo****6.1** Largo en relación a los estambres

3
---

1. corto

2. igual

3. largo

**7. Ciclo****7.1** Persistencia de las hojas

3
---

1. caducifolia

2. semicaducifolia

3. perennifolia

**7.2** Tiempo a la primera floración

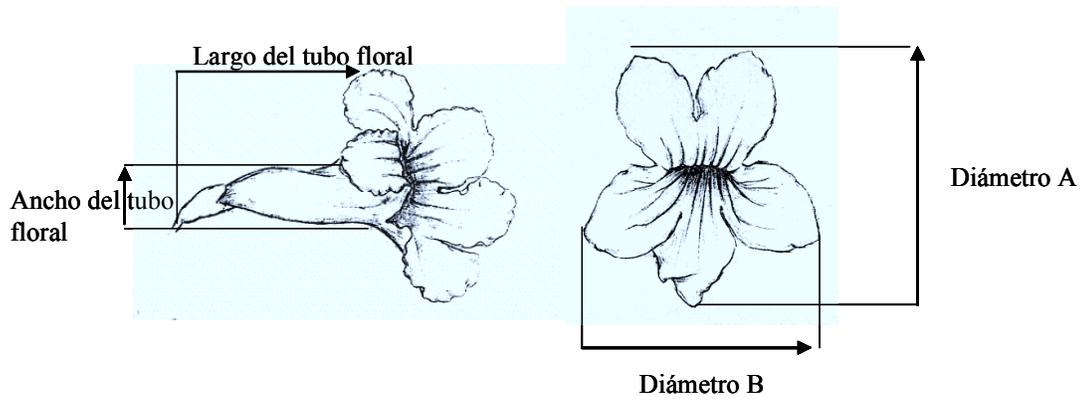
1
---

1. muy temprano  
4. tardío2. temprano  
5. muy tardío

3. mediano

### 7.3 Capacidad de reflorescencia

- |   |                      |          |          |
|---|----------------------|----------|----------|
| 3 | 1. nula<br>4. fuerte | 2. débil | 3. media |
|---|----------------------|----------|----------|



**Figura 1:** Medidas de las flores de *Tabebuia*. Dibujo: Angélica Marino.

## Bibliografía



- Allard R W. 1980.** *Principios de la mejora genética de las plantas*. Barcelona: Ediciones Omega, S.A.
- Anderson N O. 2006.** *Flower Breeding and Genetics. Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*. Holanda: Springer.
- Arbo M M. 1999.** Bignoniaceae. En: Zuloaga F, Morrone ed. *Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. Acanthaceae-Euphorbiaceae*. Missouri: Missouri Botanical Garden Press. 361-374.
- Armitage A M, Laushman J M, Dugan P. 2003.** *Specially Cut Flowers. The production of Annuals, Perennials, Bulbs and Woody Plants for Fresh and Dried Cut Flowers*. Workman Pub. Co. Oregon.
- Barros M G. 2001.** Pollination ecology of *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. and *T. ochracea* (Cham.) Standl. (Bignoniaceae) in Central Brazil cerrado vegetation. *Revista Brasileira de Botanica* 24 (3): 255-261.
- Bianchi M B, Gibbs P. 2000.** Late-acting self-incompatibility in *Capparis retusa* (Capparaceae), a species of Chaco woodland in NE Argentina. *Revista Brasileira de Botanica* 23 (4): 395-400.
- Bianchi M B, Harris S A, Gibbs P E, Prado D E . 2005.** A study of the mating system in *Dolichandra cynanchoides* (Bignoniaceae): an Argentinian Chaco woodlands liane with a late-acting self-incompatibility. *Plant Systematic and Evolution*. 251: 173-181.
- Bittencourt N S Jr. 2003.** Auto-Incompatibilidades de Ação Tardia e Outros Sistemas Reproductivos en Bignoniaceae. Tesis presentada en el Instituto de Biología de la Universidad de Campinas para la obtención del título de doctor en Biología Vegetal.

- Bittencourt N S Jr, Gibbs P E, Semir J. 2003.** Histological Study of Post-pollination events in *Spathodea campanula* Beauv. (Bignoniaceae), a species with Late-acting Self-incompatibility. *Annals of Botany* 91: 827-834.
- Bittencourt N S Jr, Semir J. 2005.** Late-Acting Self-Incompatibility and other Breeding Systems in *Tabebuia* (Bignoniaceae). *International Journal of Plant Science* 166 (3):493-506.
- Bouman F. 1984.** The Ovule. En Johri B M Ed. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer-Verlag. 124-157.
- Brennan E B, Mudge K W, Sherrer A. 1998.** Open-pollinated, interspecific F1 hybrid seed orchards of *Leucaena*. I Rootstock effects. *Agroforestry Systems* 41: 221-235.
- Bullock S H. 1985.** Breeding systems in flora of tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 17:287-301.
- Cabrera A L. 1971.** Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* XIV (1-2).
- Callaway D J, Callaway M B. 2000.** *Breeding Ornamental Plants*. Oregon: Timber Press.
- Ciampolini F, Faleri C, Cresti M. 1995.** Structural and Cytochemical Analysis of the Stigma and Style in *Tibouchina semidecandra* Cogn. (Melastomaceae). *Annals of Botany* 76:421-427.
- Cid M C, Caballero M, Reimann-Philipp R. 1989.** Rose Rootstock Breeding for Salinity Tolerance. *Acta Horticulturae* 246: 345-351.
- Comai L. 2005.** The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature* 6:836-846.
- Cope R W. 1962.** The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity* 17:157-182.

- Crowe L K. 1971.** The polygenic control of outbreeding in *Borago officinalis*. *Heredity* 27 (1): 111-118.
- Chauhan S V S, Yadav V, Yadav D K. 1987.** Studies into the Causes of Seedlessness in some Bignoniaceae. *Journal of Experimental Botany* 38 (186):173-177.
- Chawla B, Bernatzky R, Liang W, Marcotrigiano M. 1997.** Breakdown of self-incompatibility in tetraploid *Lycopersicon peruvianum*: inheritance and expression of S- related proteins. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 992-996.
- Dafni A. 1992.** *Pollination ecology, a practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Dafni A, Maués M M. 1998.** A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction* 11: 177-180.
- Dolezel J. 1997.** Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38:285-302.
- Dumas C, Knox R B. 1983.** Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics* 67:1-10.
- Edlund A F, Swanson R, Preuss D. 2004.** Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination. *The Plant Cell* 16: S84-S97.
- Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Laere K, Van Bockstaele E. 2006.** Interspecific Hybridization in Woody Ornamentals: How to deal with barriers? *Acta Horticulturae* 725: 117-126.
- Eijlander R, Ter Laak W, Hermsen J G Th, Ramanna M S, Jacobsen E. 2000.** Occurrence of self-compatibility, self-incompatibility and unilateral incompatibility after crossing diploid *S. tuberosum* (SI) with *S. verrucosum* (SC): I. Expression and inheritance of self-compatibility. *Euphytica* 115: 127-139.

- Entani T, Takayama S, Iwano M, Shiba H, Che F S, Isogai A. 1999.** Relationships between polyploidy and self-incompatibility phenotype in *Petunia hybrida* vilm. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63 (11):1882-1888.
- Fabris H A. 1965.** Flora Argentina. Bignoniaceae. *Revista del Museo de La Plata* (nueva serie) Tomo IX. Botánica N° 43.
- Facciuto G, Grigioni G, Irurueta M, Kobayashi N. 2002.** Caracterización objetiva del aroma de distintos genotipos de *Tabebuia heptaphylla* (lapacho rosado): primeros resultados. 1er Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. Buenos Aires. Argentina.
- Facciuto G, Soto S, Hagiwara J C, Mata D, Escandón A, Miyajima I. 2003.** Desarrollo de Germoplasma de Plantas Ornamentales a partir de Bignoniáceas nativas. IV Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Mar del Plata Argentina.
- Ferraz P A L, de Abreu F C, Pinto A V, Glezer V, Tonholo J, Goulart M O F. 2001.** Electrochemical aspects of the reduction of biologically active 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphtho-quinones. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 507 (1-2), 275-286.
- Franklin-Tong N (V E), Franklin C H. 2003.** Gametophytic self- incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science* 8 (12): 598-605.
- Gentry A H. 1992.** Bignoniaceae-Part II (Tribe Tecomae). Flora Neotropica Monograph 25 (II). New York: The New York Botanical Garden.
- Gibbs P E, Bianchi M B. 1993.** Postpollination events in species of *Choricia* (Bombacaceae) and *Tabebuia* (Bignoniaceae) with late-acting self-incompatibility. *Botanica Acta* 106 (1): 64-71.

- Gibbs P E, Bianchi M B. 1999.** Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family Clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSD: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. *Annals of Botany* 84: 449-457.
- Gibbs P, Bianchi M B, Taroda Ranga N. 2004.** Effects of self-, Chase and Mixed Self/ Cross- pollinations on Pistil Longevity and Fruit Set in *Ceiba* Species (Bombacaceae) with Late-acting Self- incompatibility. *Annals of Botany* 94: 305-310.
- Gobatto-Rodrigues A A, Stort M N. 1992.** Biología floral e reprodução de *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl) Miers (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 15: 37-41.
- Golz J F, Clarke A E, Newbigin E. 2000.** Mutational Approaches to the Study of Self-incompatibility: Revisiting the Pollen-part Mutants. *Annals of Botany* 85 (suplemento A): 95-103.
- Gore P L, Potts B M, Volker P W, Megalos J. 1990.** Unilateral Cross-Incompatibility in *Eucalyptus*: the Case of Hybridisation between *E. globulus* and *E. nitens*. *Australian Journal of Botany* 38 (4): 383-394.
- Govindu H C. 1950.** Studies in the embryology of some members of the Bignoniaceae. *Proceedings of the Indian Academy of Science*. B 32: 164-178.
- Griesbach R J, Bhat R N. 1990.** Colchicine-induced Polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience* 25 (19): 1284-1286.
- Greissl R. 1989.** Vitality analysis of monadic and polyadic pollen grains using optical contrast-fluorescence microscopy. *Scientific and Technical Information* 9 (5): 180-184.
- Hancock J F. 1997.** The Colchicine Story. *HortScience* 32(6): 1011-1012.
- Hardon J J. 1967.** Unilateral incompatibility between *Solanum pennellii* and *Lycopersicon esculentum*. *Genetics* 57: 795-808.

- Hartman H T. 1997.** Plant Propagation: Principles and Practices. Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
- Herrero M, Dickinson H G. 1981.** Pollen tube development in *Petunia hybrida* following compatible and incompatible intraspecific matings. *Journal of Cell Science* 47: 365-383.
- Heslop-Harrison Y, Shivanna K R. 1977.** The Receptive Surface of the Angiosperm Stigma. *Annals of Botany* 41: 1233-1258.
- Hiscock S J, Mc Innis S M. 2003.** Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends in Plant Science* 8 (12):606-613.
- Hogenboon N G. 1973.** A model for incongruity in intimate partner relationships. *Euphytica* 21: 405-414.
- Horn W. 2002.** Breeding methods and Breeding Research. En: Vainstein A ed. *Breeding for ornamentals: classical and molecular approaches*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 47-83.
- Hvoslef-Eide A K, Munster C. 2006.** Begonia: History & Breeding. En: Anderson N O ed. *Flower Breeding and Genetics. Issues, Challenges and Opportunities for the 21<sup>st</sup> Century*. Holanda: Springer, 241-275.
- ISO. 2000.** Norma Internacional ISO 9001. Sistemas de gestión de la calidad-requisitos. Número de referencia ISO 9001:2000 (traducción certificada). [www.iso.ch](http://www.iso.ch).
- Iwano M, Wada M, Morita Y, Shiba H, Takayama S, Isogai A. 1999.** X-ray microanalysis of papillar cells and pollen grains in the pollination process in *Brassica* using a variable-pressure scanning electron microscope. *Journal of Electron Microscopy* 48 (6): 909-917.

- Johri B M, Ambegaokar K B, Srivastava P S. 1992.** *Comparative Embriology of Angiosperms*. Vol 2. Berlin: Springer-Verlag.
- Kang Y R, Nasrallah J R. 2001.** Use of genetically ablated stigmas for the isolation of genes expressed specifically in the stigma epidermis. *Sexual Plant Reproduction* 14: 85-94.
- Kao T, Mc Cubbin A G. 1996.** How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proceedings National Academic Science USA*. 93:12059-12065.
- Kaufmane E, Rumpunen K. 2002.** Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). *Scientia Horticulturae* 94: 257-271.
- Kenrick J, Kaul V, Williams E G. 1986.** Self-incompatibility in *Acacia retinoides*: site of pollen-tube arrest is the nucellus. *Planta* 169: 245-250.
- Kenta T, Shimizu K K, Nakagawa M, Okada K, Hamid A A, Nakashizuka T. 2002.** Multiple factors contribute to out crossing in tropical emergent *Dipterocarpus tempehes*, including a new pollen-tube guidance mechanism for self-incompatibility. *American Journal of Botany* 89: 60-66.
- Krishan A. 1975.** A rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *Journal of Cell Biology* 66:188-193.
- Lipow S R, Wyatt R. 1999.** Floral morphology and late-acting self-incompatibility in *Apocynum cannabinum* (Apocynaceae). *Plant Systematic and Evolution* 219: 99-109.
- Lipow S R, Wyatt R. 2000.** Single gene Control of Postzygotic self-incompatibility in poke milkweed, *Asclepias exaltata* L. *Genetics* 154: 893-907.
- Lorenzi H. 2002.** *Arvores Brasileiras*. Vol 1. 4ta Edición. Nova Odessa.
- Lozano R D. 1978.** *El color y su medición*. Buenos Aires: Editorial América Lee.

- Lush W M, Clarke A E. 1997.** Observations of pollen tube growth in *Nicotiana alata* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction* 10: 27-35.
- Mishiba K, Mii M. 2000.** Polysomaty analysis in diploid and tetraploid *Portulaca grandifolia*. *Plant Science* 156: 213-219.
- Naci Onus A, Pickersgill B. 2004.** Unilateral Incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): Occurrence and Taxonomic Distribution. *Annals of Botany* 94: 289-295.
- Nettancourt D D, Devreux M, Leri U, 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*. *Theoretical and Applied Genetics* 44: 278-288.
- Nettancourt D D. 2005.** *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. (Segunda Edición). Berlin: Springer.
- O' Brien, Mc Cully M E. 1981.** *The Study of Plant Structure, Principles and Selected Methods*. Melbourne: Termarcarphi PTY. LTD.
- Ohkawa K. 1986.** Rootstock native to Japan. *Acta Horticulturae* 189: 61-66.
- Osborn N M, Kevan P G, Lane M. 1988.** Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. *Plant Systematics and Evolution* 159: 85-94.
- Otto F. 1990.** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. En: *Methods in Cell Biology*. Crissman H A, Darzynkiewicz, Z Eds. New York: Academic Press, 33: 105-110.

- Owens S J, Mc Grath S, Fraser M A, Fox L R . 1984.** The Anatomy, Histochemistry and Ultrastructure of Stigmas and Styles in Commelinaceae. *Annals of Botany* 54: 591-603.
- Piazzano M. 1998.** Números cromosómicos en Bignoniaceae de Argentina. *Kurtziana* 26: 179-189.
- Rabe A J, Soltis D E. 1999.** Pollen Tube growth and self-incompatibility in *Heuchera micrantha* var. *diversifolia* (Saxifragaceae). *International Journal of Plant Science* 160 (6): 1157-1162.
- Rajapakse S, Byrne D H, Zhang L, Anderson N, Arumuganathan K, Ballard R E. 2001.** Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics* 103:575-583.
- Ramos A R, Venturieri G A, Cuco S, Castro N M. 2005.** The site of self-incompatibility action in cupuassu (*Theobroma grandiflorum*). *Revista Brasileira de Botanica* 28 (3): 569-578.
- Rehman S, Yun S J. 2006.** Developmental regulation of K accumulation in pollen anthers, and papillae: are anther dehiscence, papillae hydration, and pollen swelling leading to pollination and fertilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) regulated by changes in K concentration? *Journal of Experimental Botany* 57 (6):1315-1321.
- Rivera G. 1999.** Estudios fenéticos de las especies argentinas de la familia Bignoniaceae. *Anales del Instituto de Biología Universidad Autónoma de México, Serie Botánica* 70 (2):141-158.
- Rogers H J. 2006.** Programmed cell death in floral organs: How and Why do flowers die?. *Annals of Botany* 97:309-315.
- Rose J B, Kubba J, Tobutt K R. 2000.** Induction of tetraploidy in *Buddleia globosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 121-125.

- Rudd J J, Franklin-Tong V E. 2001.** Unravelling response-specificity in  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathways in plant cells. Tansley review no 124. *New Phytologist* 151:7-33.
- Sage T L, Strumas F, Cole W W, Barrett S C H. 1999.** Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 86:855-870.
- Saito H, Mizunashi K, Tanaka S, Adachi Y, Nakano M. 2003.** Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. *Science Horticulture* 97:185-192.
- Sax K. 1950.** Dwarf Trees. *Arnoldia* 10 (12): 73-78.
- Seavey S R, Bawa K S. 1986.** Late-acting self-incompatibility. *Botanical Review* 52 196-217.
- Seavey S R, Carter S K. 1994.** Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 81 (3): 331-338.
- Sedgley M. 1981.** Ultrastructure and histochemistry of the watermelon stigma. *Journal of Cell Science* 48:137-146.
- Shivanna K R, Rangaswamy N S. 1992.** *Pollen Biology: a laboratory manual*. Berlin: Springer- Verlag.
- Shivanna K R. 2005.** Barriers to hybridization. En: Shivanna, K R, y Sawhney V K eds. *Pollen Biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press. 261-272.
- Singh A, Perdue T D, Paolillo D J. 1989.** Pollen- pistil interactions in *Brassica oleracea*: cell calcium in self and cross pollen grains. *Protoplasma*: 151: 57-61.
- Singh J, Chauhan S V S. 1996.** Morphological changes in the stigma of seasonally transient sterile *Tecoma stans* L. *Phytomorphology* 46 (1): 1-7.

- Smith M W, Hoult M D, Bright J D. 2003.** Rootstock affects yield, yield efficiency and harvest rate of 'Kensington Pride' Mango. *HortScience* 38(2):273-276.
- Spurr A R. 1969.** A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26:31-43.
- Stenzel N M C, Neves C S V J, Gomes J C, Medina C C. 2003.** Performance of 'Ponkan' Mandarin on Seven Rootstocks in Southern Brazil. *HortScience* 38(2):176-178.
- Stone S L, Goring D R. 2001.** The molecular biology of self-incompatibility systems in flowering plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 93-114.
- Takamura T, Miyajima I. 1996.** Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae* 65: 305-312.
- Takamura T, Lim K B, Van Tuyl J M. 2002.** Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid lilies. *Acta Horticulturae* 572: 37-42.
- Taroda N, Gibbs P E. 1982.** Floral Biology and Breeding system of *Sterculia chicha* St. Hil. (Sterculiaceae). *New Phytologist* 90: 735-743.
- Torretta J P, Medán D, Basilio A. 2002.** Biología reproductiva de tres especies de Bignoniaceae en la Reserva ecológica "El Bagual", NE de Argentina. VIII Congreso Latinoamericano de Botánica. Cartagena de Indias.
- Väinölä A. 2000.** Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112: 239-244.
- Van Doorn W G, Woltering E J. 2005.** Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* 10 (3):117-122.
- Van Harten A M. 1998.** *Mutation Breeding. Theory and Practical Applications.* Cambridge: Cambridge University Press.

- Van Tuyl J M. 1992.** Survey research on mitotic and meiotic polyploidization at CPRO-DLO. *The lily yearbook of North American Lily Society* 43: 11-18.
- Van Tuyl J M, Lim K B, Ramanna M S. 2002.** Interspecific Hybridization and Introgression. En: Vainstain A. *Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 85-103.
- Van Tuyl J M, Lim K. 2003.** Interspecific Hybridisation and Polyploidisation in Ornamental Plant Breeding. *Acta Horticulturae* 612:13-22.
- Van Tuyl J M, De Jeu M J. 2005.** Methods for overcoming interspecific crossing barriers. En: Shivanna, K R y Sawhney V K eds. *Pollen Biotechnology and Crop Production and Improvement*. Cambridge: Cambridge University Press, 273-292.
- Wilkins H, Anderson N O. 2006.** Creation of New Floral Products. Annualization of perennials. Horticultural and commercial Significance. En: Anderson N O ed. *Flower Breeding and Genetics. Issues, Challenges and Opportunities for the 21<sup>st</sup> Century*. Holanda: Springer, 49-64.
- Williams E G, Knox R B, Rouse J L. 1982.** Pollination Sub-system distinguished by pollen tube arrest after incompatible interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal Cell Science* 53: 255-277.
- Yamaguchi M. 1989.** Basic studies on the flower color breeding of carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) *Bulletin of the Faculty of Horticulture Minami Kyushu University* 19:1-78.