



Universitat de Lleida

Estudio de las posibilidades de hibridación en el género prunus L. para la mejora genética de patrones

M^a Jose Rubio Cabetas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

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

M^a JOSE RUBIO CABETAS

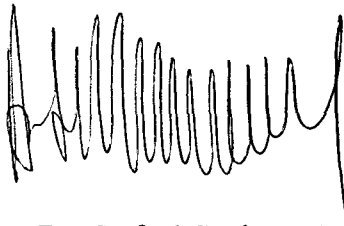
UNIVERSIDAD DE LLEIDA

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

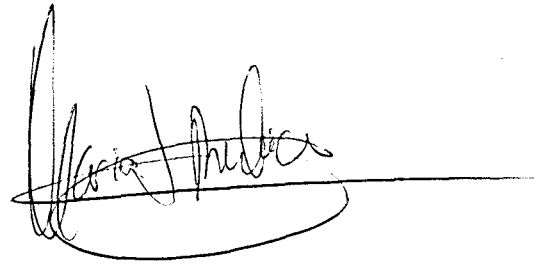
Memoria que presenta la Licenciada en
Ciencias Biológicas M^a José Rubio Cabetas
para aspirar al Grado de Doctor.

Fdo. M^a José Rubio Cabetas

V^o B^o DIRECTOR DEL TRABAJO



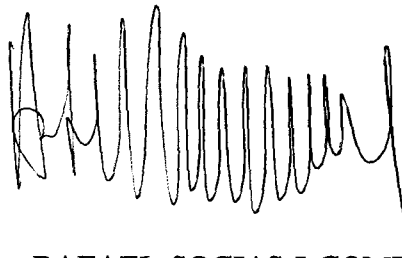
Fdo. Dr. Rafael Socias I Company



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

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

Zaragoza, Mayo 1993.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of vertical, wavy lines that form a stylized, somewhat abstract representation of the name 'Rafael Socias i Company'.

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

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

*A Luis, Jacinto y M^a José de Ben
por su ánimo en todo momento.*

Agradecimientos:

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

Al Ministerio de Educación y Ciencia que ha financiado este trabajo de tesis, así como al Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón que ha financiado en los últimos meses la realización de este trabajo y en especial a la Unidad de Fruticultura, donde se ha llevado a cabo este trabajo de tesis.

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

A la D^a Maria Herrero, por sus comentarios, así como a todo el personal del departamento de fruticultura, que en las diferentes fases durante el desarrollo de este trabajo han contribuido de forma especial a él. Especialmente mis compañeras becarias: Rosario, Esther, Pilar y las chicas solidarias en los momentos críticos de la primavera: Isabel, Rosa, M^a Cruz, Olga, o que en algún momento han contribuido con su experiencia a hacer el trabajo más llevadero: Pilar, Amalia, Teresa y Reyes, así como a Pilar Bergua. Sin olvidar por ello a personas de otros departamentos que han colaborado y apoyado de forma especial, Rosa Sanz, Juan Barriuso e Ignacio Susín.

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

Por ultimo y no por ello menos importante a mis hermanos y amigos que en los últimos momentos han soportado la impaciencia, neuras y su soliralidad han contribuido a que esto llegara a su fin.

RESUMEN

SUMMARY

INTRODUCCION.	5
I. PATRONES FRUTALES	5
I.1. DISTRIBUCION DE PATRONES.	7
I.2. SISTEMATICA. GENERO <i>PRUNUS</i> L.	9
I.2.1. ESPECIES CULTIVADAS:	10
I.2.2. ESPECIES PATRON:	10
II. INTRODUCCION. INCOMPATIBILIDAD EN ANGIOSPERMAS.	13
II.1. AUTOINCOMPATIBILIDAD.	13
II.2. INCOMPATIBILIDAD INTERESPECIFICA.	16
II.3. HIBRIDACION INTERESPECIFICA.	20
III. CRUZAMIENTOS INTERESPECIFICOS EN EL GENERO <i>PRUNUS</i> L.	22
III.1. Hibridaciones en el Subgénero <i>Amygdalus</i> (L.) Focke	23
III.2. Hibridaciones en el Subgénero <i>Prunophora</i> Focke.	26
III.3. Hibridaciones en el Subgénero <i>Cerasus</i> Pers.	30
IV. OBJETIVOS GENERALES	32
V. MATERIAL VEGETAL.	33
V.1. CRUZAMIENTOS INTRAESPECÍFICOS.	34
V.2. CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS.	34
V.3. DESCRIPCION DE LOS CLONES UTILIZADOS EN LOS CRUZAMIENTOS.	35
1. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO.	40
1.1. INTRODUCCIÓN	40
1.1.1 La flor en el Género <i>Prunus</i> L.	40

Indice

1.1.2. Grano de polen.	41
1.1.3. Pistilo y receptividad del estigma.	43
1.1.4. Interacciones en el estigma.	45
1.1.5. Interacciones en el estilo.	47
1.1.5. Barreras y Técnicas.	50
1.1.6. Incongruencia y Selección Gametofítica.	52
1.2. MATERIAL Y METODOS.	54
1.2.1. Especies polinizadoras estudiadas.	54
1.2.1.1. Extracción del polen.	54
1.2.1.2. Estudio del potencial germinativo y viabilidad.	55
1.2.1.2.1. Medio de cultivo.	55
1.2.1.2.2. Preparación y siembra del polen.	55
1.2.1.2.3. Observación microscópica y conteo.	55
1.2.1.3. Tratamiento estadístico de los datos.	56
1.2.2. Polinizaciones controladas en laboratorio.	56
1.2.2.1. Cruzamientos intraespecíficos.	57
1.2.2.1. Seguimiento en laboratorio a diferentes temperaturas.	57
1.2.2.2. Observación del tubo polínico con microscopía de fluorescencia.	58
1.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.	58
1.3. RESULTADOS.	60
1.3.1. Germinación del polen "in vitro". Viabilidad.	60
1.3.2. Polinizaciones en laboratorio. Seguimiento de los tubos polínicos.	62
1.3.2.1. Longitud recorrida por los tubos polínicos.	62
1.3.2.2. Velocidad de crecimiento a lo largo del pistilo.	69
1.3.2.3. Cinética de crecimiento de los tubos polínicos.	76
1.4. DISCUSIÓN.	85
1.4.1. Germinación de polen.	85

1.4.2. Crecimiento de tubos polínicos.	86
2. ESTUDIO DEL ÓVULO Y FECUNDACION	95
2.1. INTRODUCCION.	95
2.1.1 Descripción del proceso de fecundación.	95
2.1.2. Desarrollo de las estructuras ovulares en <i>Prunus</i> L.	96
2.1.4. Fecundación en las distintas especies.	100
2.1.5. Técnicas para superar fracasos en la fertilización.	101
2.2. MATERIAL Y METODOS.	104
2.2.1. Cruzamientos intra e interespecíficos analizados.	104
2.2.2. Preparación del material para su observación al microscopio.	105
2.2.2.1. Fijación del material.	105
2.2.2.2. Inclusión y cortes del material en parafina.	106
2.2.2.3. Observación microscópica con luz normal.	107
2.2.2.3.1. Tinción Gerlach.	107
2.2.2.3.2. Tinción de almidón.	108
2.2.2.4. Observación microscópica con luz ultravioleta.	108
2.2.2.4.1. Tinción de callosa.	108
2.3. RESULTADOS.	109
2.3.1. Estado de los ovarios en antesis.	109
2.3.2. Desarrollo de los óvulos y el megagametofito.	109
2.3.3. Cambios en el ovario al paso del tubo hacia el óvulo.	110
2.3.4. Fecundación.	111
2.3.3.1. Fecundación en Cruzamientos Intraespecíficos.	111
2.3.3.2. Fecundación en Cruzamientos Interespecíficos.	111
2.4. DISCUSIÓN.	113
2.4.1. Desarrollo del saco embrionario.	113
2.4.2. Crecimiento de tubo polínico en el ovario y fecundación.	115

Indice

3. DESARROLLO POSTZIGOTICO. CULTIVO "IN VITRO" DE OVULOS.	120
31. INTRODUCCION.	120
3.1.1. Desarrollo normal de la semilla.	120
3.1.2. Anormalidades en el desarrollo de la semilla híbrida.	122
3.1.3. Barreras de postfecundación.	123
3.1.3.2. Cultivo "in vitro" como técnica de superar barreras postzigóticas.	124
3.1.3.3. Reguladores de crecimiento y medios de cultivo.	125
3.2. MATERIAL Y METODOS.	128
3.2.1. Cruzamientos estudiados.	128
3.2.1.1. Cruzamientos intraespecíficos:	128
3.2.1.2. Cruzamientos interespecíficos.	129
3.2.2.. Fijación de los óvulos en el día del cultivo "in vitro".	129
3.2.2.1. Ovulos incluídos en parafina y microscopía de fluorescencia.	130
3.2.2.2. Técnica del "clearing" y microscopía de contraste de fase.	130
3.2.2.3. Estudio de la degeneración del óvulo.	131
3.2.2.4. Estudio de la translocación en el óvulo.	132
3.2.3. Cultivo "in vitro" de óvulos.	133
3.2.3.1. Establecimiento del cultivo.	133
3.2.3.2. Medio de cultivo para óvulos.	133
3.2.3.3. Medio de cultivo para embriones.	135
3.2.3.4. Diseño del experimento.	138
3.2.3.5. Toma de datos.	138
3.3.RESULTADOS.	139
3.3.1. Estudio del óvulo el día de cultivo "in vitro".	139
3.3.1.1. Presencia de embrión y endospermo en los diferentes	

Indice

cruzamientos.	139
3.3.1.2. Porcentaje de fecundación de los diferentes cruzamientos.	140
3.3.1.3. Porcentaje de degeneración de los óvulos en los diferentes cruzamientos.	142
3.3.2. Crecimiento en cultivo "in vitro".	144
3.3.2.1. Embrión.	144
3.3.2.2. Endospermo.	144
3.3.2.3. Callo.	145
3.4. DISCUSION.	151
3.4.1. Estado de los óvulos.	151
3.4.2. Técnicas empleadas para el estudio.	154
3.4.3. Cultivo "in vitro".	155
4. CUAJADO FINAL EN CAMPO.	160
4.1. INTRODUCCIÓN.	160
4.1.1. Desarrollo del fruto.	160
4.1.2. Caída de frutos.	161
4.1.3. Identificación de los híbridos interespecíficos.	164
4.2. MATERIAL Y METODOS.	165
4.2.1. Polinizaciones en campo.	165
4.2.2.1. Cruzamientos intraespecíficos:	165
4.2.2.2. Cruzamientos interespecíficos.	165
4.2.2. Determinación de los niveles de caída y cuajado.	166
4.3 RESULTADOS.	168
4.3.1. Cuajado inicial.	168
4.3.2. Cuajado final y caída de flores polinizadas y no polinizadas	175

Indice

4.4. DISCUSION.	182
4.4.1. Desarrollo del fruto y cuajado inicial.	182
4.4.2. Caída en los diferentes cruzamientos.	184
VI. DISCUSION GENERAL	187
1. Crecimiento de los tubos polínicos e incompatibilidad en el estilo.	187
2. Incompatibilidad en el ovario. Estudio del óvulo.	189
3. Cultivo "in vitro".	191
4. Curvas de caída.	193
VII. CONCLUSIONES	195
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	197
IX. APENDICE.	236

RESUMEN

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMMARY

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

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

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

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

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

Summary

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

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

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

INTRODUCCION.

I. PATRONES FRUTALES

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

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

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

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

Introducción general

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

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

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

I.1. DISTRIBUCION DE PATRONES.

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

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

FUENTE: CARRERA (1987).

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

FUENTE: PUERTA (1984).

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

Introducción general

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

FUENTE: PUERTA (1984).

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

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

FUENTE: PUERTA (1984).

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

FUENTE: FELIPE, Comunicación personal.

I.2. SISTEMÁTICA. GÉNERO *PRUNUS* L.

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

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

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

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

El subgénero **CERASUS** *Pers.* incluye 7 secciones:

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

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

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

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

I.2.1. ESPECIES CULTIVADAS:

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

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

I.2.2. ESPECIES PATRON:

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

Patrones francos:

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

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

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

Patrones clonales:

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

Híbridos francos:

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

Híbridos clonales:

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

P. avium x *P. pseudocerasus*: 'Colt'

P. domestica x *P. spinosa*: Damas-1869

P. cerasifera x *P. salicina*: Mirobolan GF-31

P. cerasifera x *P. munsoniana*: Mariana-GF-8-1, Mariana-2624.

P. amygdalus x *P. persica*: INRA-GF-557, INRA-GF- 677, Adafuel, Hansen-2.168, Hansen-536.

P. cerasifera x *P. persica*: Yumir, Myran.

P. cerasifera x (*P. cerasifera* x *P. persica*): Ishtara

P. persica x *P. davidiana*: 'Cadaman' (Avimag).

II. INTRODUCCION. INCOMPATIBILIDAD EN ANGIOSPERMAS.

II.1. AUTOINCOMPATIBILIDAD.

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

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

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

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

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

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

Introducción general

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

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

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

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

II.2. INCOMPATIBILIDAD INTERESPECÍFICA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Introducción general

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

La incompatibilidad interespecífica se manifiesta generalmente por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estilo. Esta inhibición es estilar en las especies cuya autoincompatibilidad se expresa en el estilo y estigmática cuando la autoincompatibilidad se expresa en el estigma (DE NETTANCOURT, 1977). En observaciones hechas en *Solanaceas* la inhibición del tubo polínico en cruzamientos interespecíficos es más temprana y más marcada que la inhibición del propio polen (LEWIS y CROWE, 1958); en *Nicotiana* la inhibición parece ser más temprana y se considera como estigmática (PANDEY, 1968). Los primeros estudios de cruzamientos interespecíficos en este género entre una especie diploide y otra hexaploide mostraron que el polen de las especies hexaploides se detienen antes en el estilo de las especies diploides que en el caso contrario (ROY, 1928). KURSAKOW en sus trabajos de hibridación interespecífica en el género *Prunus* L. concluyó que cuando el crecimiento del tubo polínico es completo no se produce el aborto del embrión (KURSAKOW y DUBOVITSKAYA, 1971; KURSAKOW y SEDYSHEVA 1975). Sin embargo, no puede considerarse que éste sea el comportamiento general en los cruzamientos interespecíficos, ya que es muy frecuente que el tubo polínico alcance la base del estilo sin que por ello quede asegurada la fecundación (WILLIAMS *et al.*, 1982), lo que muestra que la incompatibilidad interespecífica es un problema más complejo.

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

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

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

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

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

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

II.3. HIBRIDACION INTERESPECIFICA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Parece ser que *P. davidiana*, una especie de melocotonero silvestre, con resistencia a clorosis y gran vigor, se cruza fácilmente con *P. persica* y con almendro. 'Nemaguard', seleccionado en California de entre plantas de semillas procedentes de Extremo Oriente (KESTER y GRASSELLY, 1983), se supone que es un híbrido entre *P. davidiana* y *P. persica*. Posteriormente se han realizado más cruzamientos, con el fin de seleccionar y utilizar la F₂ de semilla como patrones. Las dos especies son muy próximas y los individuos F₂ muestran una disyunción más débil que la F₂ de híbridos melocotonero x almendro, aunque el vigor híbrido de la F₁ es próximo al de la F₁ de melocotonero x almendro. Cuando el cruzamiento se ha realizado entre 'Nemaguard' x *P. davidiana* la descendencia es más homogénea (GRASSELLY y OLIVIER, 1988; PISANI y ROSELLI, 1983). A partir de 'Nemaguard', se han seleccionado nuevos patrones, como 'Nemared', seleccionado de plántulas F₃ de 'Nemaguard' x melocotonero de hoja roja (RAMMING y TANNER, 1983).

Una mayor distancia genética entre las especies de melocotonero y almendro se pone de manifiesto cuando se analiza la descendencia de cruzamientos entre *P. davidiana* x *P. amygdalus*, ya que la F₂ muestra mayor disyunción que la de *P. davidiana* x *P. persica* (GRASSELLY y OLIVIER, 1988).

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

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

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

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

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

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

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

Híbridos triploides:

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

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

Híbridos pentaploides:

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

Híbridos hexaploides:

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

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

Híbridos diploides:

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

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

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

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

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

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

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

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

Híbridos espontáneos entre *P. cerasifera* y *P. armeniaca* han sido descritos en la literatura (KNIGHT, 1969) y de algunos de ellos se comercializan sus frutos, como es el caso del albaricoquero púrpura o *P. dasycarpa* (REHDER, 1940). Desde entonces se han obtenido y estudiado cruzamientos entre estas dos especies (RAMMING, 1976), hasta que se han llegado a seleccionar de una población de híbridos entre un mirabolán y el albaricoquero 'NJA1' plantas que han dado frutos y que se han comercializado con el nombre de 'Plumcot' (MUSACCHI, 1992).

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

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

Introducción general

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

Los cruzamientos interespecíficos entre *P.armeniaca* y otras especies, entre ellas especies del subgénero *Amygdalus*, han sido puestos de manifiesto (MEHLENBACHER, *et al.*, 1986). Así, la cruzabilidad interespecífica no está restringida dentro de un subgénero, es decir, que el conjunto de especies del género *Prunus* son susceptibles de cruzarse, si no operan barreras genéticas insalvables. Cruzamientos intersubgenéricos son conocidos desde hace mucho tiempo, como *P. nigra* Aiton x *P. tenella* Batsch (= *P. nana* Stokes; almendro ruso) (CUMMING, 1963). Este híbrido resulta fértil y presenta caracteres de los dos parentales, ciruelo y almendro ruso, pero híbridos de *P. amygdalus* x ciruelos resultan estériles (BERNHARD, 1962).

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

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

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

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

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

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

- Eucerasus: *P. cerasus*, *P. fruticosa*; tetraploides (4x)
P. avium, *P. canescens*, *P. mahaleb*; diploides (2x)
- Pseudocerasus: *P. concinna*, *P. incisa*, *P. nipponica*,
P. subhirtella, *P. pseudocerasus*; diploides (2x)

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

- Diploide: *P. avium* x *P. canescens*
- Triploides: *P. avium* x *P. cerasus*
P. avium x *P. fruticosa*
P. canescens x *P. cerasus*
P. canescens x *P. fruticosa*

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

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

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

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

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

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

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

IV. OBJETIVOS GENERALES

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

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

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

V. MATERIAL VEGETAL.

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

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

CUADRO V. Especies utilizadas y nivel de ploidía:

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

V.1. CRUZAMIENTOS INTRAESPECÍFICOS.

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

V.2. CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS.

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

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

'MONIQUI'

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

'CANINO'

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

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

1989).

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

'MIROBOLAN 605- A.D.'

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

'MIROBOLAN-B-E.M.'

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

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

'MONTIZO'

Es un ciruelo ''Pollizo de Murcia'' *P. insititia* perteneciente al grupo de 'ciruelos de crecimiento lento' (San Julián y Damas). Seleccionado en la Unidad de Fruticultura de Zaragoza, a partir de una población de semillas en 1975 (FELIPE, 1990). Parece haber heredado la polivalencia de los 'Pollizos de Murcia', ya que no muestra incompatibilidad con almendro, albaricoquero ni melocotonero y por supuesto con ciruelo. Los pollizos en general son resistentes a la asfixia radicular y a suelos compactos, calizos y salinos, pero son sensibles a la sequía. Propaga bien por estaquilla leñosa (FELIPE, 1989; MORENO, 1992), su sistema radicular no es tan superficial como en otros 'Pollizos' por lo que hasta los ocho años ha emitido pocas sierpes (FELIPE, 1990). Resistente a nematodos del grupo *Meloidogyne* (PINOCHET *et al.*, 1990).

'PUEBLA DE SOTO-101-AD'

Es un clon del ciruelo ''Pollizo de Murcia'' *P. insititia*, ciruelo de crecimiento lento. Seleccionado en la EE de Aula Dei, a partir de una población de sierpes recogida en diferentes localidades de la región de Murcia (CAMBRA, 1979). Tiene compatibilidad generalizada con albaricoquero, almendro, melocotonero y nectarina (CAMBRA, 1983). La propagación por estaquilla leñosa es mediocre (FELIPE, 1989). Actualmente se propaga aceptablemente mediante cultivo 'in vitro'. El sistema radicular es superficial y serpea bastante (CAMBRA, 1979; FELIPE, 1989; MORENO, 1992).

'INRA- REINA CLAUDIA-1380'

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

'CACHIRULO'

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

'BALONES'

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

'MIROBOLAN INRA GF 31'

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

'MYRANDIER 617'

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

***P. tomentosa* Thunb.**

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

1. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO.

1.1.INTRODUCCIÓN

1.1.1 La flor en el Género *Prunus* L.

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

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

1.1.2. Grano de polen.

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

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

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

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

(RIEGER *et al.*, 1976).

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

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

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

1.1.3. Pistilo y receptividad del estigma.

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

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

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

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

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

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

También en los sistemas de incompatibilidad gametofítica del género *Prunus*, como en cerezo, se han identificado diferentes antígenos; uno de ellos se ha llamado antígeno S, que se ha comprobado que sólo está presente justo antes de la eclosión (CLARKE *et al.*, 1981) en el período de receptividad del pistilo, y que no se encuentra en ninguna otra estructura de la flor. Este antígeno es capaz de inhibir el crecimiento de los tubos polínicos de los granos de polen de donde es extraído (WILLIAMS *et al.*, 1982, citado por DUMAS *et al.*, 1985). Otro antígeno ha sido llamado P y se ha detectado en estilos de albaricoquero, melocotonero y peral (DUMAS *et al.*, 1985), aunque de momento se desconoce su función. Posteriormente se han identificado otras proteínas en el estilo de algunas *Solanaceas* asociadas con el sistema de incompatibilidad gametofítico (MAU *et al.*, 1986).

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

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

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

1.1.4. Interacciones en el estigma.

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

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

Generalmente, las especies de estigma seco manifiestan incompatibilidad de tipo esporofítico. En este caso los productos de naturaleza proteínica se forman en el tapetum y se añaden a la exina del grano de polen (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1973). Estos productos se establecen libremente en el estigma y están envueltos en una reacción complementaria (VAN WENT y WILLEENSE, 1977; MATTSON *et al.* 1974). Los tubos incompatibles se paran después de que sus ápices tomen contacto con las papilas del estigma (HESLOP-HARRISON, 1978). El origen del ápice polínico proviene de la intina del grano de polen, con un componente microfibrilar de celulosa que es la pared primaria de la célula somática (LINSKENS, 1976).

Los casos de incompatibilidad gametofítica suelen estar relacionados con especies de estigma húmedo (VAN WENT y WILLEENSE, 1977), como es el caso del género *Prunus*. En este tipo de incompatibilidad, los productos implicados en su manifestación se forman en el polen durante su desarrollo y se almacenan en la intina (KNOX y HESLOP-HARRISON, 1969;

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

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

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

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

1.1.5. Interacciones en el estilo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.5. Barreras y Técnicas.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1.6. Incongruencia y Selección Gametofítica.

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

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

1.2. MATERIAL Y METODOS.

1.2.1. Especies polinizadoras estudiadas.

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

1.2.1.1. Extracción del polen.

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

1.2.1.2. Estudio del potencial germinativo y viabilidad.

1.2.1.2.1. Medio de cultivo.

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

1.2.1.2.2. Preparación y siembra del polen.

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

1.2.1.2.3. Observación microscópica y conteo.

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

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

1.2.1.3. Tratamiento estadístico de los datos.

Para llevar a cabo el estudio estadístico de los datos obtenidos al determinar la viabilidad, se consideraron los porcentajes medios de los 5 portos analizados correspondientes a cada una de las variedades estudiadas como especies polinizadoras. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de la germinación "in vitro" tras 24 h de incubación, para ver la diferencia entre los cultivares y seguidamente se hizo una separación de medias según el test de Duncan de los porcentajes de germinación de cada uno, para ver qué variedades pueden considerarse iguales desde el punto de vista de la germinación del polen en medio artificial. Los niveles de significación fueron del 5% en todos los análisis realizados. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SAS, versión 6.1, utilizando las funciones de SAS/BASIC y PROC/GLM.

1.2.2. Polinizaciones controladas en laboratorio.

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

1.2.2.1. Cruzamientos intraespecíficos.

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

Cruzamientos interespecíficos.

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

1.2.2.1. Seguimiento en laboratorio a diferentes temperaturas.

Se recogieron muestras de las flores cada 8 horas entre las flores mantenidas a 22° C y cada 24 horas entre las flores a 12° C hasta completar 6 muestras para cada temperatura, ya que a estas temperaturas los tubos polínicos compatibles tienen el tiempo suficiente de llegar hasta el ovario (WILLIAMS, 1970). Los pistilos se fijaron en una solución de FAA (5% de formaldehído al 40%, 5% de ácido acético glacial y 90% de alcohol al 70%). El material así fijado se mantuvo hasta su estudio a 4-5° C. Para el estudio del crecimiento de los tubos polínicos las flores se lavaron tres veces con agua destilada y se ponen en una solución de sulfito sódico al 5% para mantenerlas en el autoclave durante 10 minutos a 1,2 kg.cm⁻². Este

tratamiento ablanda los tejidos (JEFFERIES y BELCHER, 1974) y facilita la eliminación de las capas celulares que rodean el tejido transmisor por donde crece el tubo polínico así como la tinción de proteínas de los tubos.

1.2.2.2. Observación del tubo polínico con microscopía de fluorescencia.

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

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

1.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.

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

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

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

Los análisis se realizaron en el programa estadístico SAS, versión 6.1, utilizando las funciones de SAS/BASIC y PROC/GLM.

1.3. RESULTADOS.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2.1. Longitud recorrida por los tubos polínicos.

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

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

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

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

Longitud media del tubo polínico más largo (mm)

Variedad Polinizada	Estilo (mm)	V a r i e d a d Polinizadora	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
Moniquí	12	Canino	3.97	4.59	8.64	10.79	12.50	11.94
Cachirulo	11	Balones	3.67	6.50	7.55	9.44	10.29	10.35
Cachirulo	11	Tomentosa	1.76	3.32	4.68	3.51	5.29	7.26
Mirob B	6	Moniquí	1.58	3.30	3.80	5.04	5.41	5.46
Cachirulo	11	MirAD 605	2.69	— ²	5.56	7.34	6.94	7.79
Cachirulo	11	Mird 617	2.61	6.17	7.42	10.11	10.43	10.94
MirAD605	7	Mirb B	2.67	5.51	7.07	7.45	7.40	7.16
G F 31	8	Tomentosa	2.26	4.44	4.63	4.15	5.96	6.01
Pde S 101	8	Montizo	1.86	5.12	6.64	7.66	7.59	7.68
RCI 1380	9	Montizo	2.61	4.92	8.45	8.80	8.69	8.97

²=Sin datos**CUADRO 1.3.2.1.2.** Longitud media recorrida por los tubos polínicos mas largos a intervalos de 8 h y una temperatura de 22°C

Longitud media del tubo polínico más largo (mm)

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

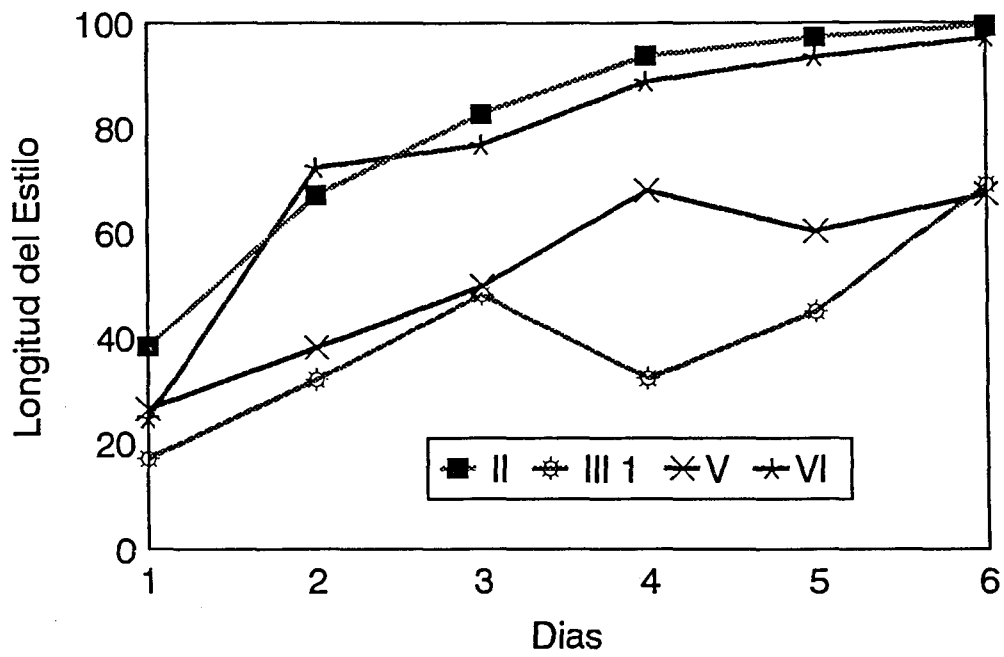


Figura 1.3.1.1.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12^o C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'

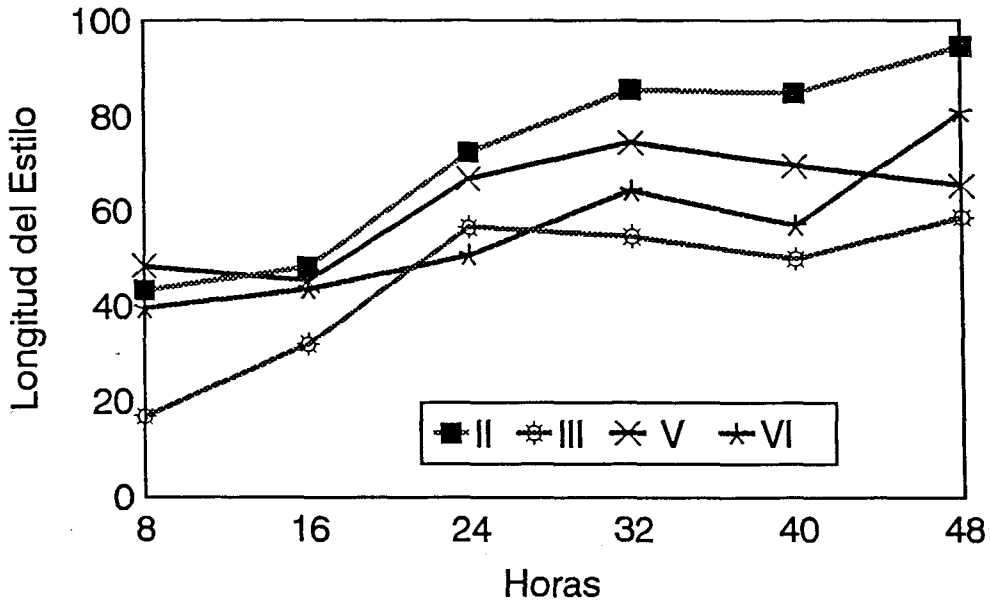


Figura 1.3.1.1.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22^o C de los cruzamientos realizados en el híbrido 'Cachirulo'

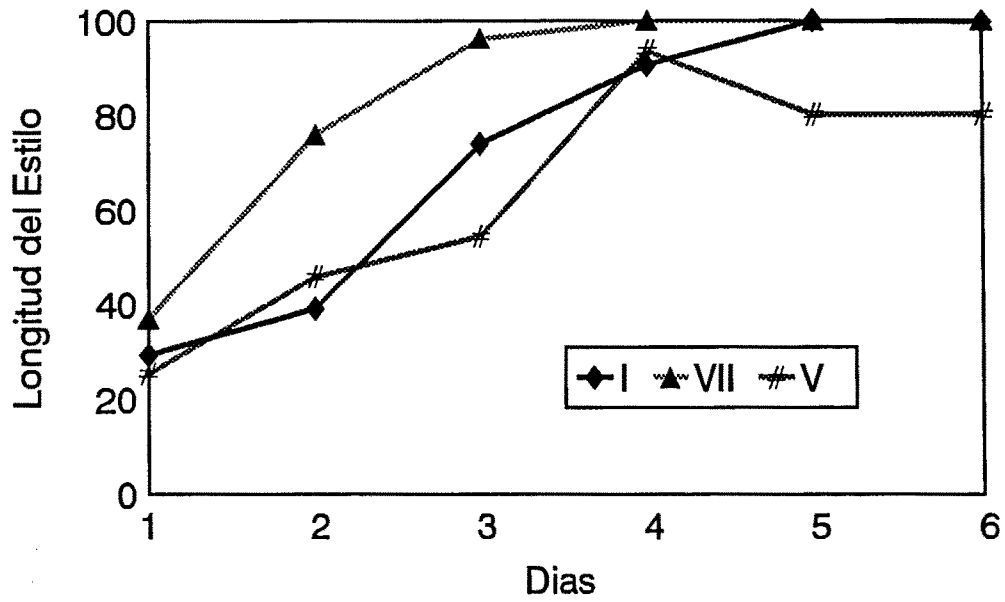


Figura 1.3.1.2.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en el subgenero Prunophora: albaricoquero y mirobolanes.

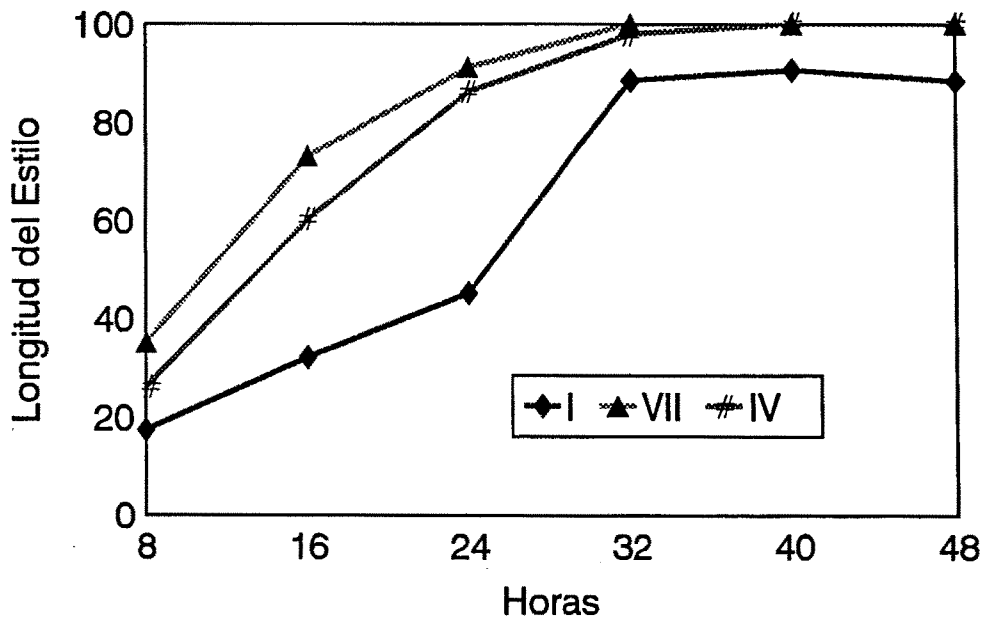


Figura 1.3.1.2.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en el subgenero Prunophora: albaricoquero y mirobolanes.

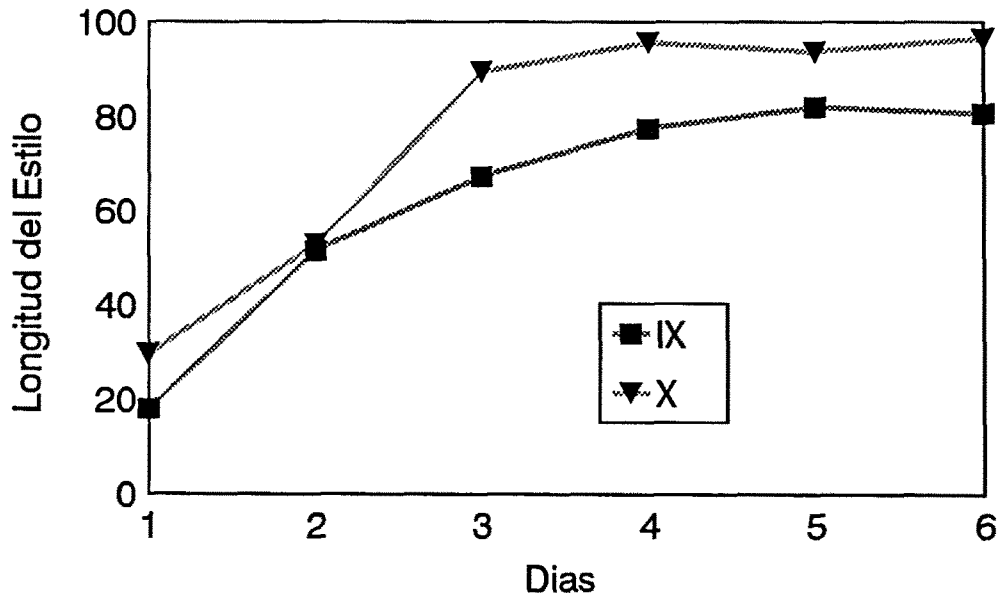


Figura 1.3.1.3.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C en los ciruelos hexaploides.

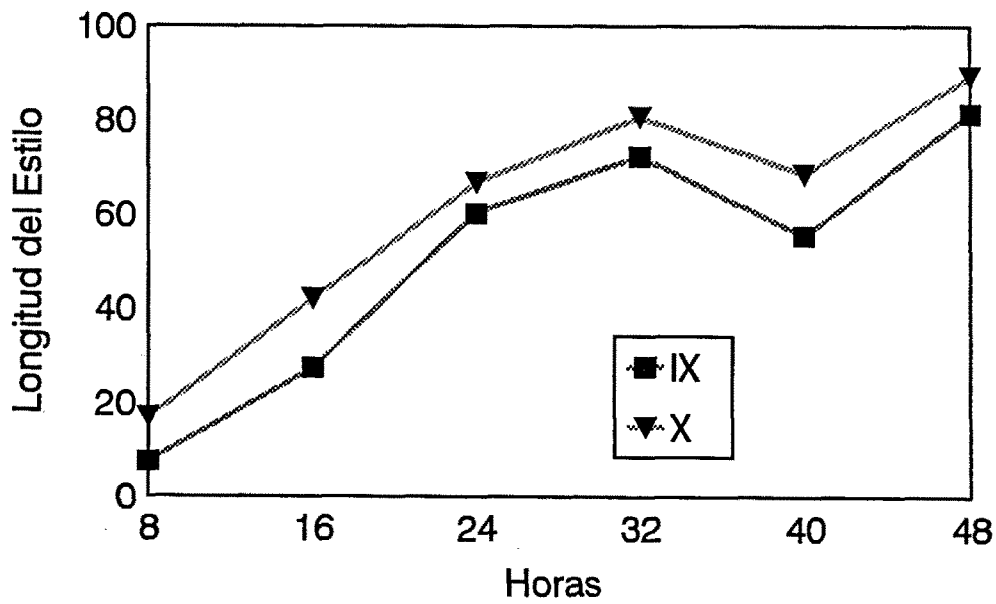


Figura 1.3.1.3.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C en los ciruelos hexaploides.

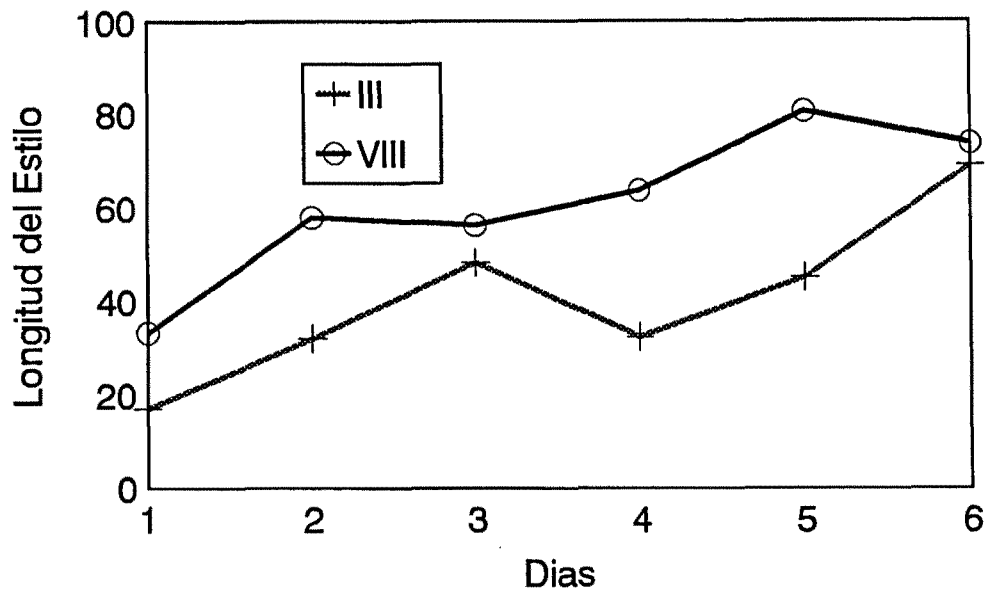


Figura 1.3.1.4.a. Crecimiento de los tubos polínicos a 12° C de *P. tomentosa* en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31

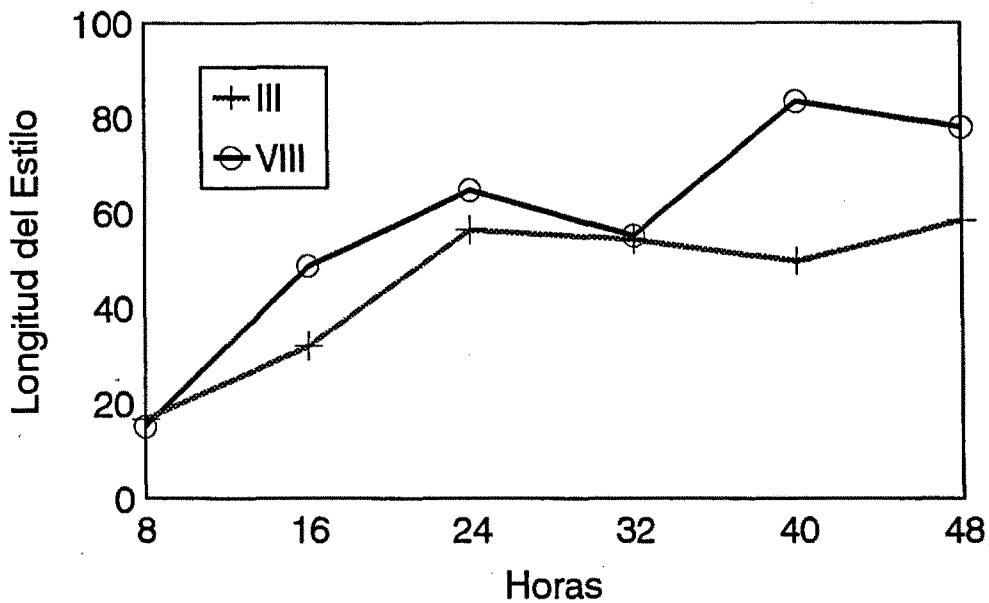


Figura 1.3.1.4.b. Crecimiento de los tubos polínicos a 22° C de *P. tomentosa* en los híbridos 'Cachirulo' y GF-31

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

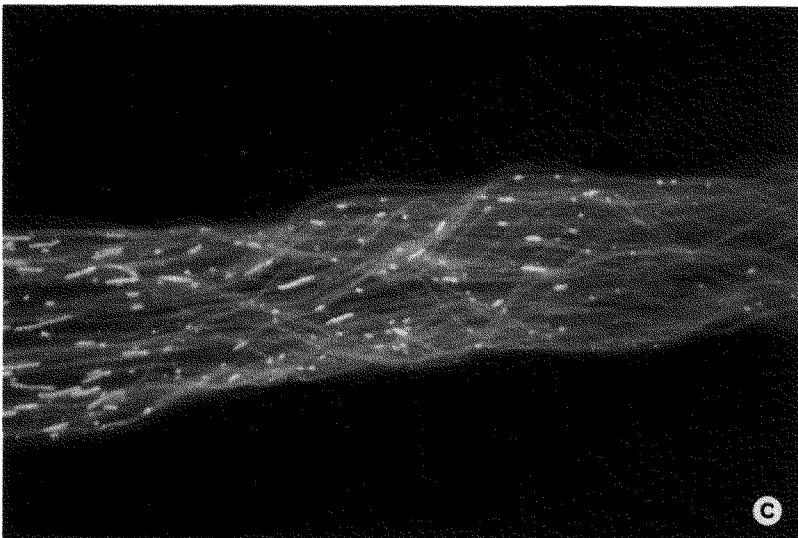
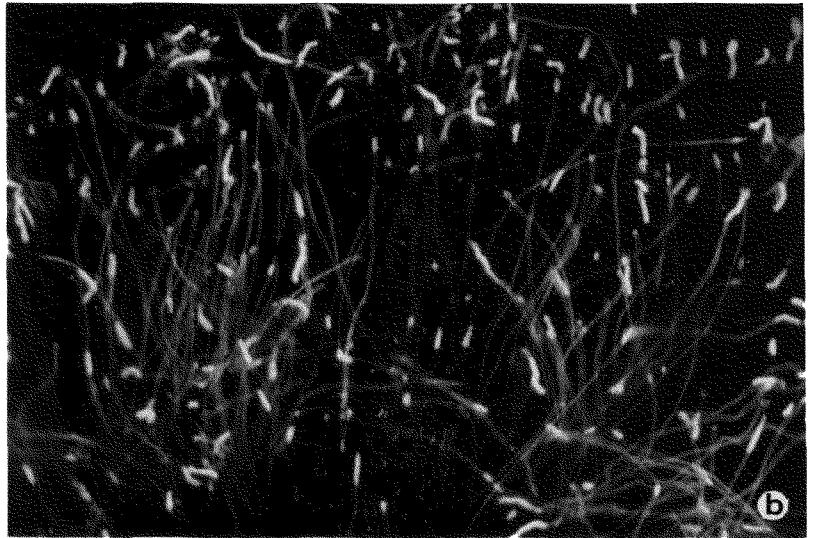
CUADRO 1.3.2.1.3.: Tasa de crecimiento del tubo polínico "in vitro" mm/día a 12°C y 22°C respectivamente.

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

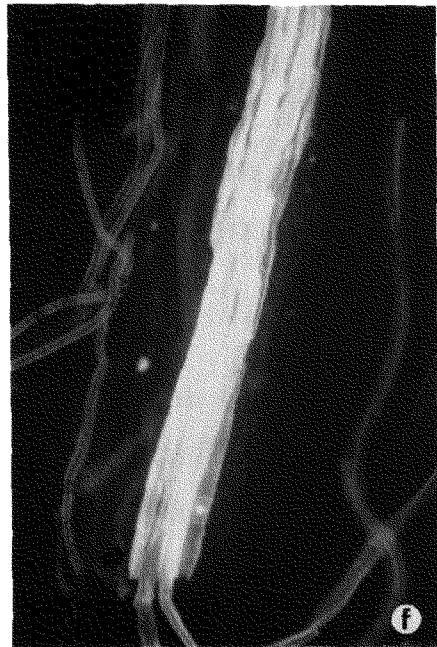
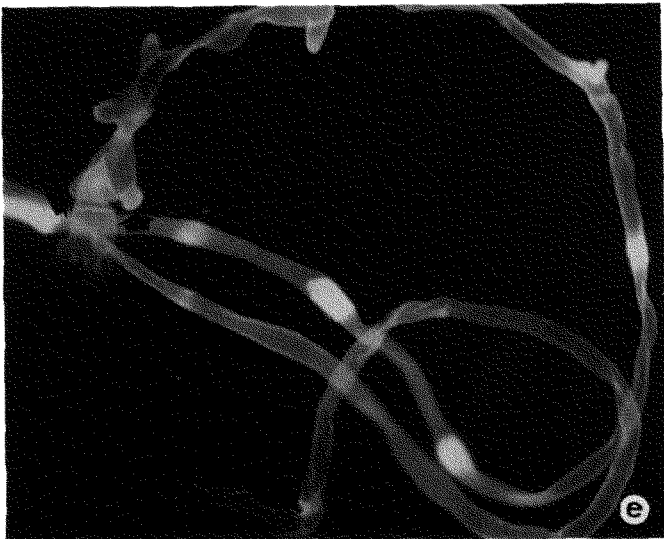
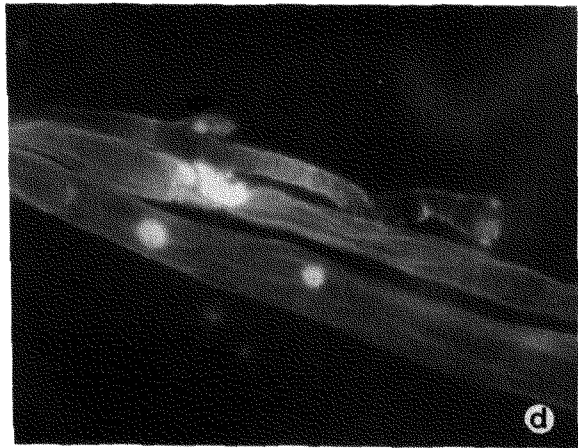
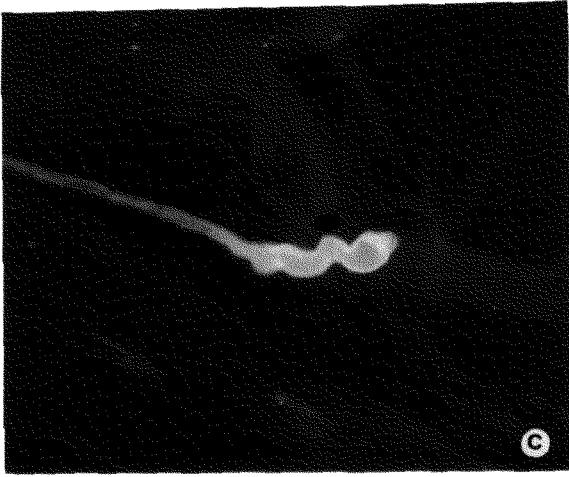
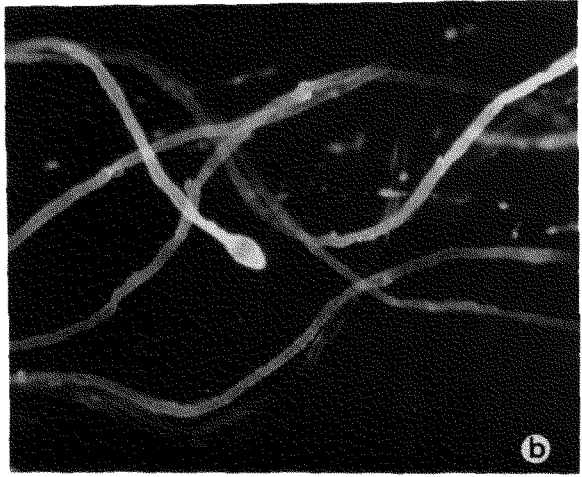
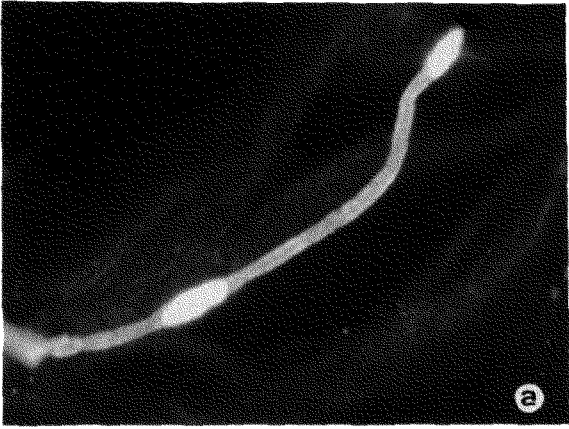
FOTO 1.1.a. Germinación del polen de 'Moniquí' en el estigma de 'Mirobolán B' con los colpus (flechas) y la placa de callosa (flecha) a las 8 h después de la polinización Tinción de azul de anilina (219X).

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

FOTO 1.1.c. Tubos polínicos creciendo en el estilo con las placas de callosa a lo largo del tejido transmisor y después de la zona de acumulación de callosa (flecha) Tinción de azul de anilina (86.5X).



- FOTO 1.2.a. Tubo polínico de *P. tomentosa* parado en el estilo de 'Cachirulo' con la placa de callosa en el extremo del tubo Tinción de azul de anilina (flecha) (219X).
- FOTO 1.2.b. Tubo polínico de *P. tomentosa* parado en el estilo de 'GF-31' con forma de balón (flecha) a las 40 h después de la polinización Tinción de azul de anilina (219X).
- FOTO 1.2.c. Tubo polínico de *P. tomentosa* en el estilo de GF-31' con forma de espiral (flecha) a las 48 h después de la polinización Tinción de azul de anilina(219X).
- FOTO 1.2.d. Tubos polínicos de 'Moniqui' detenidos en el estilo de 'Mirobolán B' con arrugamientos en la pared (flecha) a los 3 días después de la polinización Tinción de azul de anilina (548X).
- FOTO 1.2.e. Tubos polínicos del 'Mirandier 617' detenidos cerca de la base del estilo de Cachirulo' con ligeros hinchamientos en la pared del tubo cerca del extremo (flecha) al 6° día después de la polinización Tinción de azul de anilina(219X).
- FOTO 1.2.f. Tubos polínicos de 'Moniqui' en la base del estilo de 'Mirobolán B' al 6° día después de la polinización Tinción de azul de anilina (219X).



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

1.3.2.2. Velocidad de crecimiento a lo largo del pistilo.

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

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

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

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

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

CUADRO 1.3.2.2.1. Velocidad media (μ /h) en los 10 cruzamientos a dos temperaturas T₁ (12°C) y T₂ (22°C).

Cruce	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
T ₁	113.83	108.22	55.54	44.24	62.92	111.54	85.42	62.19	78.63	92.49
T ₂	248.66	301.20	181.41	170.54	279.75	239.89	191.88	163.18	178.43	214.87

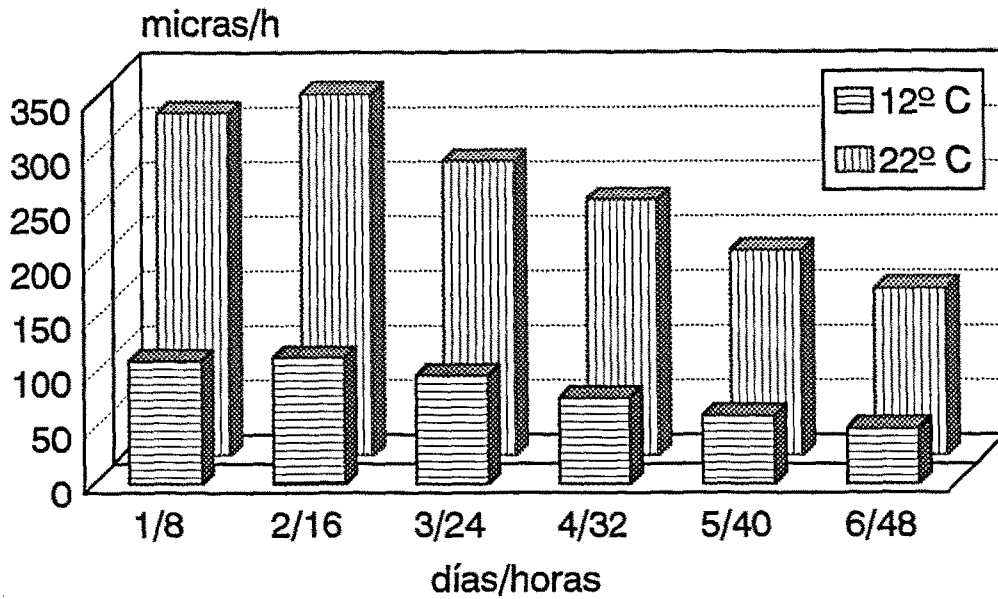


Figura 1.3.2.1.a. Velocidad de los tubos polínicos del cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolan 605 x Mirobolan B

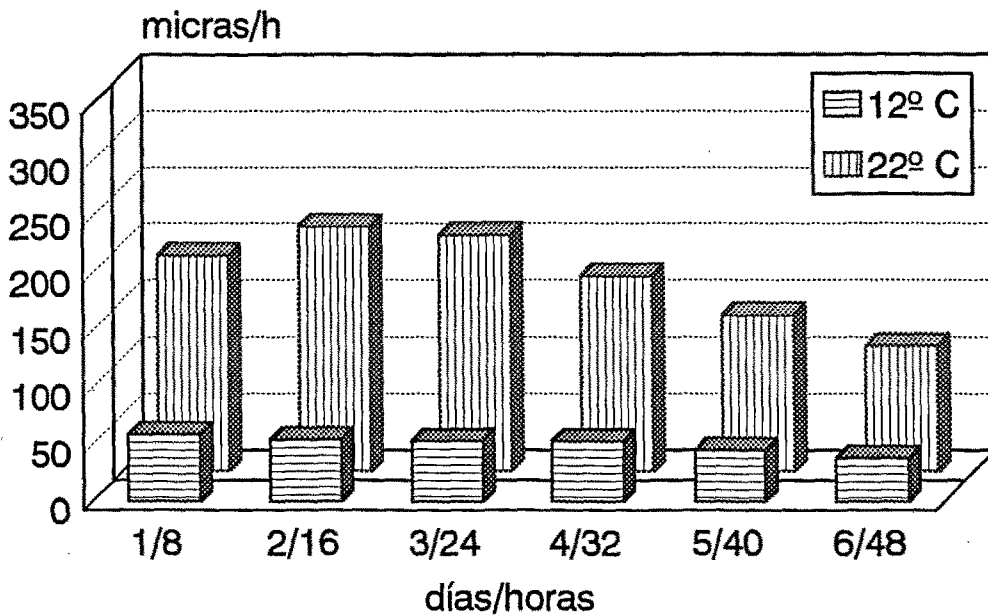


Figura 1.3.2.1.b. Velocidad de los tubos polínicos del cruzamiento interespecífico IV: Mirobolan B x Moniquí

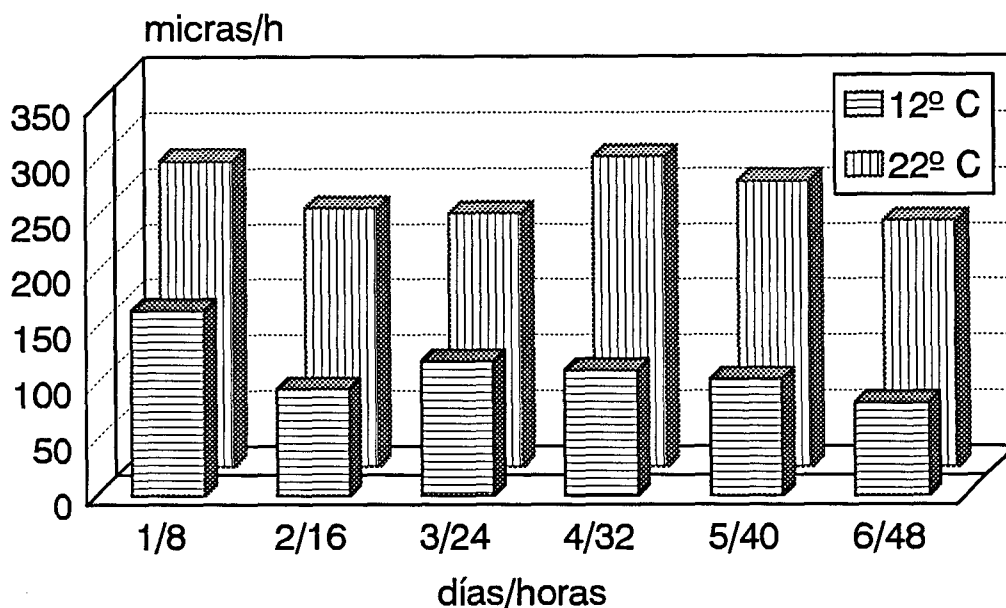


Figura 1.3.2.2.a. Velocidad de los tubos polínicos del cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino

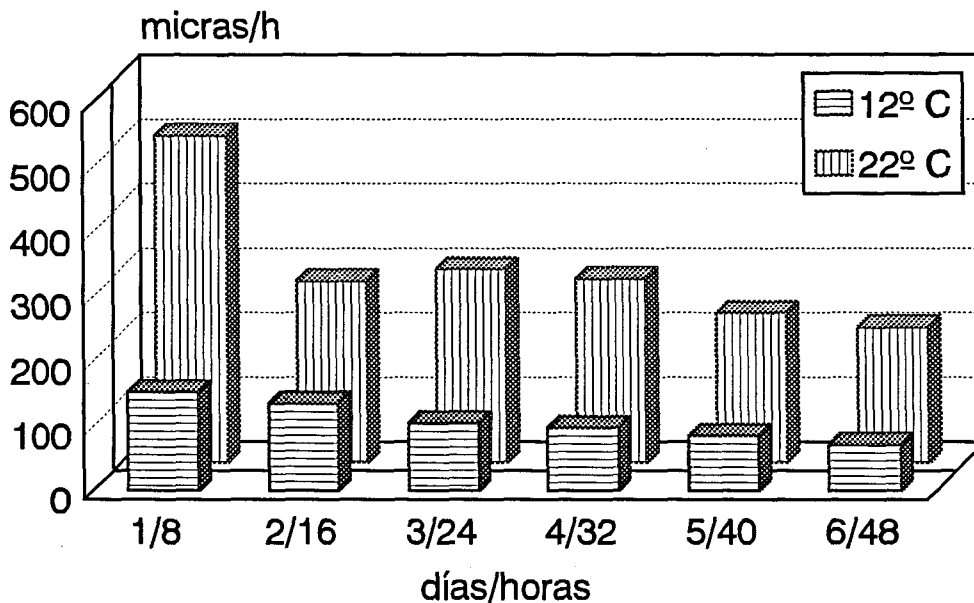


Figura 1.3.2.2.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones

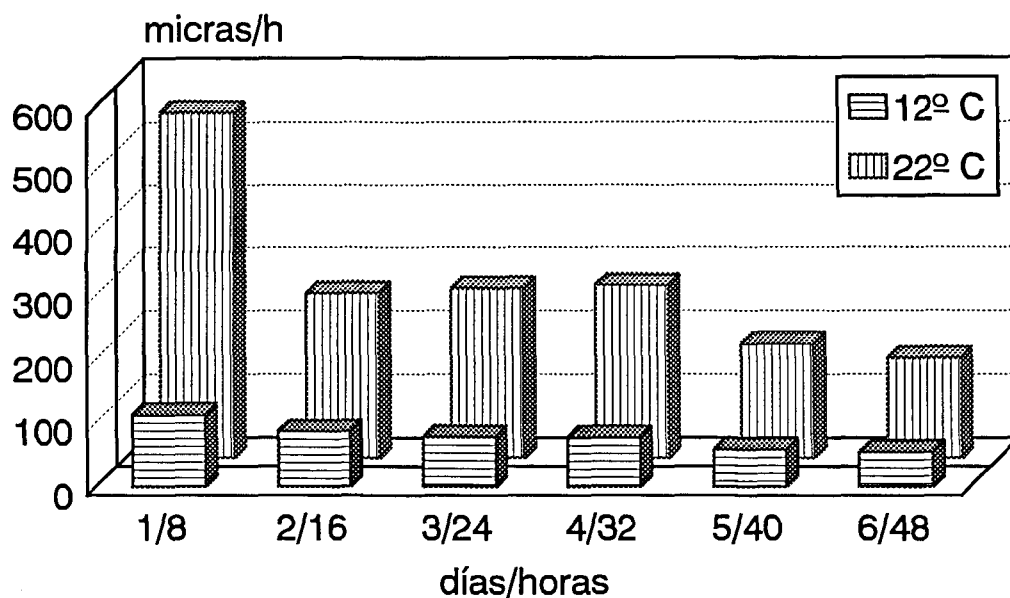


Figura 1.3.2.3.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico V: Cahirulo x Mirololan 605

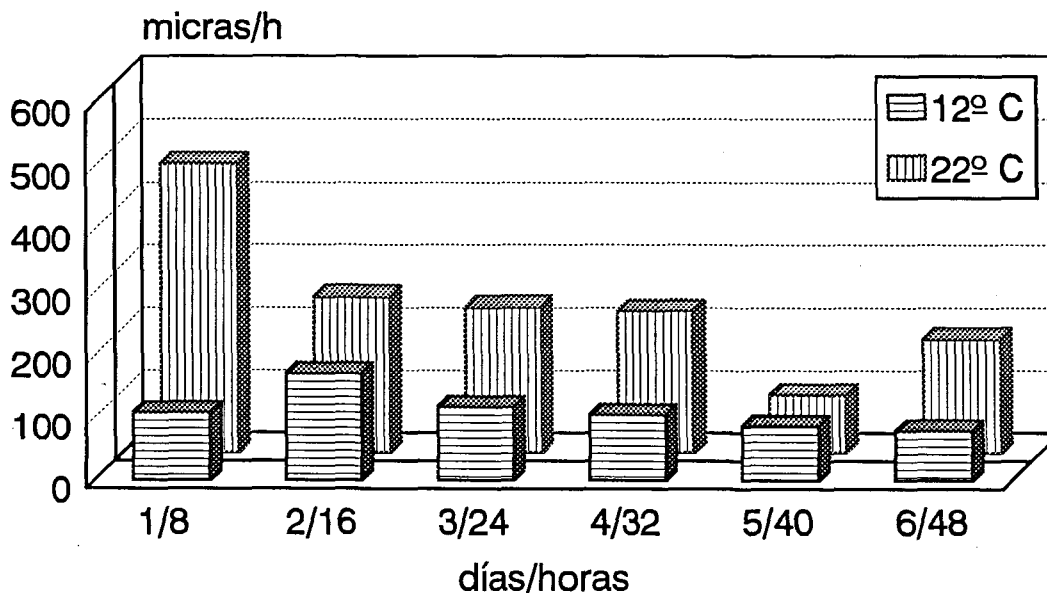


Figura 1.3.2.3.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VI: Cahirulo x Mirandier 617

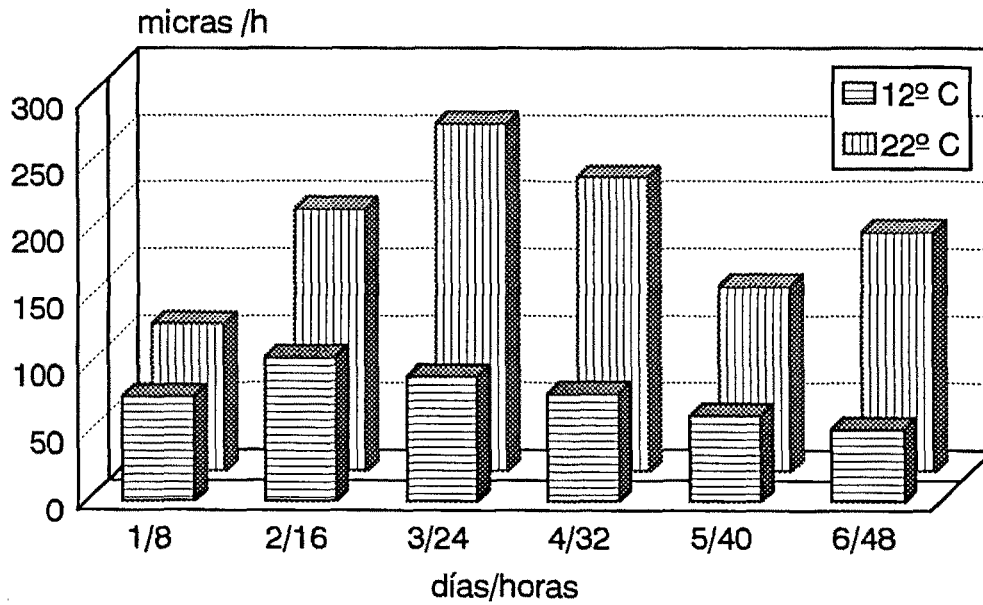


Figura 1.3.2.4.a. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento intraespecífico IX: Puebla de Soto x Montizo

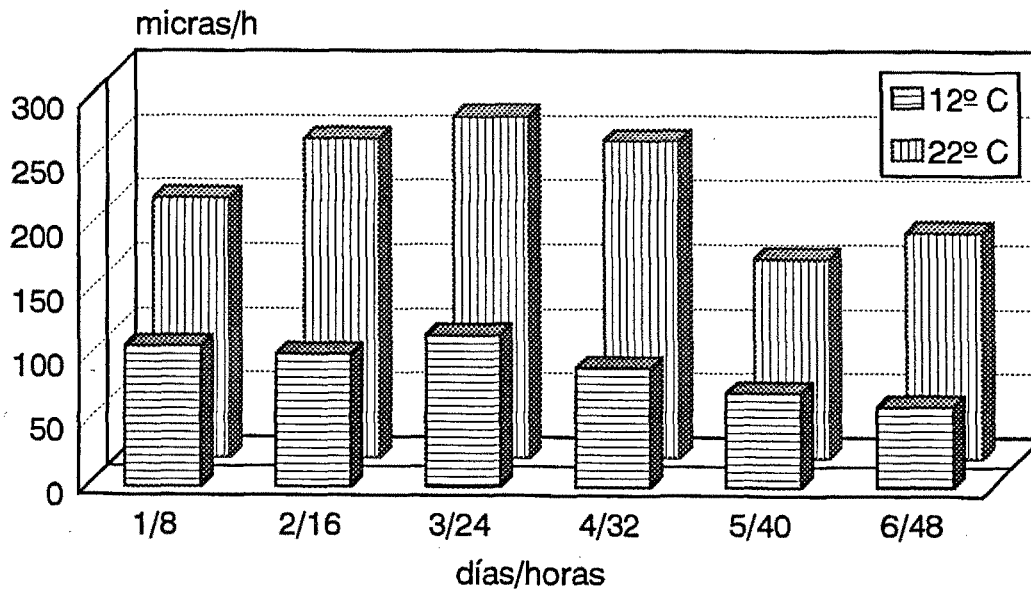


Figura 1.3.2.4.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo

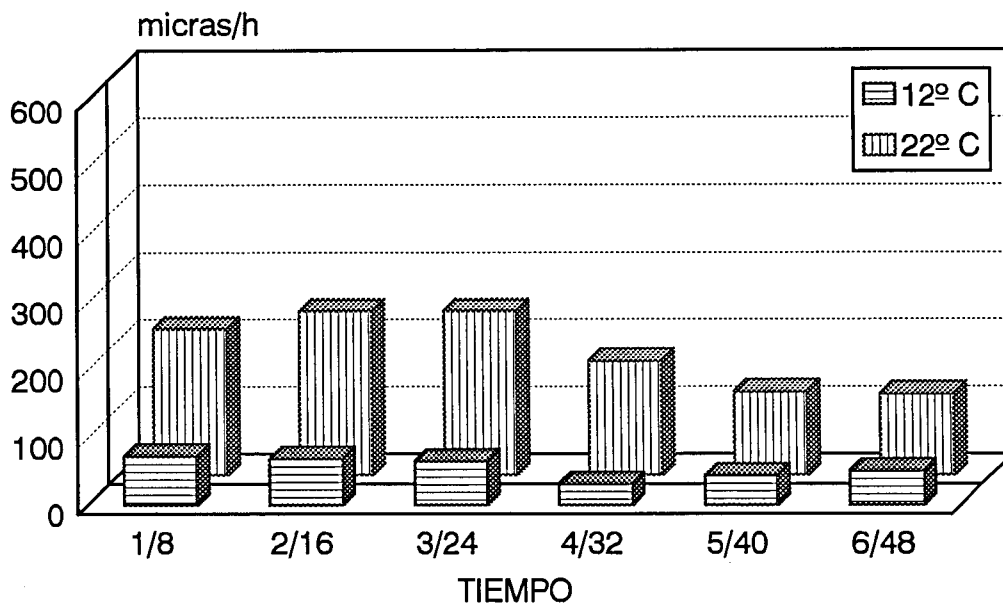


Figura 1.3.2.5.a Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico III: Cahirulo x *P. tomentosa*

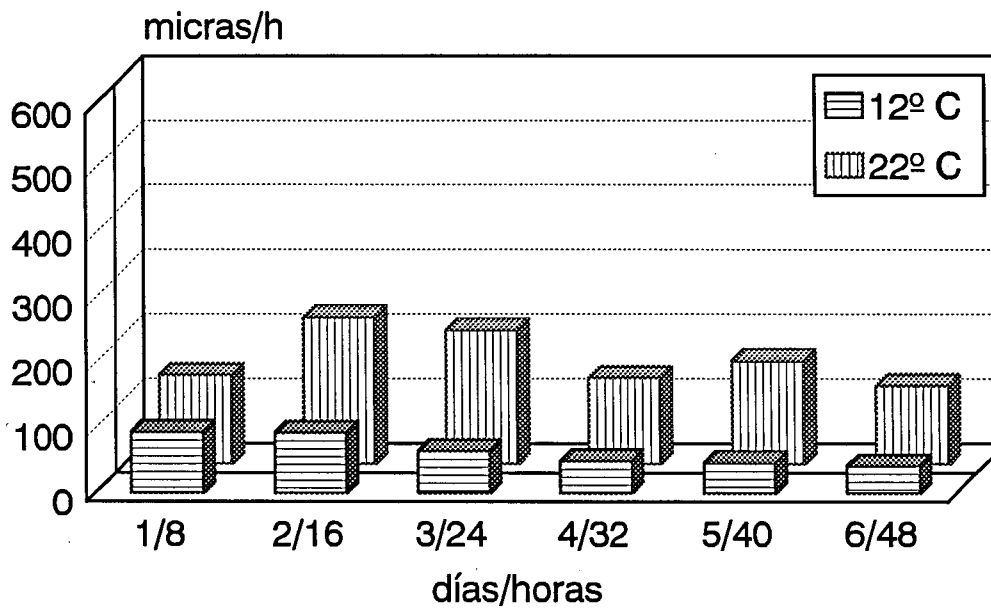


Figura 1.3.2.5.b. Velocidad de los tubos polínicos en el cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x *P. tomentosa*

1.3.2.3. Cinética de crecimiento de los tubos polínicos.

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

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

CUADRO 1.3.2.3.1. Resultado del análisis de varianza para cada uno de los 10 cruzamientos para los factores temperatura y tiempo.

Cruzamiento (I) : 'Moniquí' x 'Canino'

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* = Nivel de significación $P < 0,05$

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

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

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

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

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

Cruzamiento (I) : 'Moniquí' x 'Canino'

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	2334.17	0.0003**
Lineal T ₁	1	30373.59	0.0001**
Lineal T ₂	1	156.23	0.3314
Cuadrática T ₁	1	1974.58	0.0009**
Cuadrática T ₂	1	28919.18	0.0001**
Cúbica T ₁	1	808.17	0.0292 *
Cúbica T ₂	1	4625.11	0.0001**

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

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	1627.83	0.0033**
Lineal T ₁	1	18549.40	0.0001**
Lineal T ₂	1	196.35	0.2955
Cuadrática T ₁	1	3105.93	0.0001**
Cuadrática T ₂	1	14621.16	0.0001**
Cúbica T ₁	1	105.24	0.4430
Cúbica T ₂	1	1361.64	0.0069**

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

Fuente	G L	C M	Significación
Temperatura	1	538.58	0.2479
Lineal T ₁	1	8824.35	0.0001**
Lineal T ₂	1	647.68	0.2055
Cuadrática T ₁	1	224.05	0.4551
Cuadrática T ₂	1	7960.92	0.0001**
Cúbica T ₁	1	2715.08	0.0107**
Cúbica T ₂	1	225.03	0.4541

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

* = Nivel de significación P < 0,05

** = Nivel de significación P < 0,01

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

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

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

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

** = Nivel de significación P < 0,01

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

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

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

1.4. DISCUSIÓN.

1.4.1. Germinación de polen.

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

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

realización del ensayo, puede ser debida a que éste se llevo a cabo polen congelado y posteriormente hidratado. Aunque en general se ha indicado que el polen no pierde viabilidad con este tipo de conservación (STANLEY y LINSKENS, 1974), sí se ha observado esta baja viabilidad con polen mantenido congelado en especies de *Prunus* (COYLE, 1982; LAYNE y SHERMAN, 1986). Es de señalar que la viabilidad en el momento en que el polen fue utilizado debía de ser mucho mayor que la obtenida, como lo indica el cuajado obtenido en varios de los cruzamientos (apartado 4.1). Este es un factor que habra que tener en cuenta para la realización de hibridaciones con polen conservado durante un largo tiempo, en particular de un año para otro, y que el tipo y el tiempo de la hidratación previa a la siembra pueden tener su repercusión en el porcentaje de germinación.

1.4.2. Crecimiento de tubos polínicos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Llamó la atención el comportamiento curioso del polen de 'Montizo' en el estigma del otro clon de pollizo, pues se observa un retraso mucho mayor en la germinación del polen en el cruzamiento intraespecífico que en el interespecífico, aunque posteriormente el crecimiento

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

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

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

2. ESTUDIO DEL ÓVULO Y FECUNDACION

2.1. INTRODUCCION.

2.1.1 Descripción del proceso de fecundación.

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

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

La embriogenesis del género *Prunus* es del tipo *Polygonum* (MAHESHWARI, 1950),

con un saco embrionario que contiene 8 núcleos haploides en 7 células. Estas 7 células son: las dos sinérgidas que junto con la célula huevo forma el aparato huevo; la célula central que contiene dos núcleos llamados núcleos polares; y las tres células antípodas situadas en posición opuesta al aparato huevo. Un espermatozoide se fusiona con la célula huevo para dar lugar a un embrión; el otro espermatozoide se fusiona con los dos núcleos polares de la célula central para dar lugar al endospermo, que dado este origen es triploide.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4. Fecundación en las distintas especies.

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

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

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

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

cálido (DORSEY, 1919b).

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

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

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

2.1.5. Técnicas para superar fracasos en la fertilización.

La fecundación ha fracasado en muchos cruzamientos interespecíficos en los que el tubo polínico alcanza el ovario pero no penetra en el óvulo, como ocurre en *Vicia faba* x *V. narbonensis*, (PICKERGILL, 1991), porque los tubos pueden detener su crecimiento dentro del ovario (SAMIMY, 1991), o porque los tubos de polen entra en el saco pero no descargan las células espermáticas como ocurre en *Rhododendron* (WILLIAMS *et al.*, 1982). Estas barreras

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

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

La polinización "in vitro" ha resultado ser una técnica útil para superar barreras en los cruzamientos interespecíficos. Una amplia revisión del uso de esta técnica ha sido hecha por ZENKTELER (1991). Ha sido un método utilizado especialmente en *Gramineas*, donde se presenta también una autoincompatibilidad gametofítica. Sin embargo, los factores que se manifiestan "in vivo" pueden activarse también "in vitro" y pueden deberse a la presión de selección que actúa a nivel prezigótico por lo que los óvulos más cercanos a la base del estilo son los que tienen más probabilidad para ser fecundados (LEDUC *et al.*, 1990).

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

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

1983). La polinización "in vitro" directamente en la cavidad placental para la producción de híbridos interespecíficos ha dado buenos resultados en *Primula*, donde se obtuvieron embriones de forma globular (SHEHATA y ZENKTELER, 1991).

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

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

2.2. MATERIAL Y METODOS.

2.2.1. Cruzamientos intra e interespecíficos analizados.

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

Cruzamientos intraespecíficos:

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

Cruzamientos interespecíficos:

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

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

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

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

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

2.2.2. Preparación del material para su observación al microscopio.

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

2.2.2.1. Fijación del material.

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

2.2.2.2. Inclusión y cortes del material en parafina.

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

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

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

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

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

2.2.2.3. Observacion microscópica con luz normal.

2.2.2.3.1. Tinción Gerlach.

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

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

-Montar el cubre con resina DPX (DIFCO).

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

2.2.2.3.2. Tinción de almidón.

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

2.2.2.4. Observación microscópica con luz ultravioleta.

2.2.2.4.1. Tinción de callosa.

Los cortes hidratados hasta agua se tiñeron con una solución de azul de anilina al 0,1% en PO_4K_3 0,1 N (LINSKENS y ESSER, 1957; MARTIN, 1959) durante 1 hora. Las observaciones se realizaron directamente sobre el cubre con una gota de tinción, en el microscopio con iluminación ultravioleta con filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460). Esta tinción sirve para ver la callosa que se deposita en los tejidos degenerados. Aunque ha sido discutida la especificidad de este método (apartado 1.2.2.2.), sigue siendo el método aceptado para ver callosa (HESLOP-HARRISON y HESLOP-HARRISON, 1981; DUMAS y KNOX, 1983).

2.3.RESULTADOS.

2.3.1. Estado de los ovarios en antesis.

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

2.3.2. Desarrollo de los óvulos y el megagametofito.

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

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

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

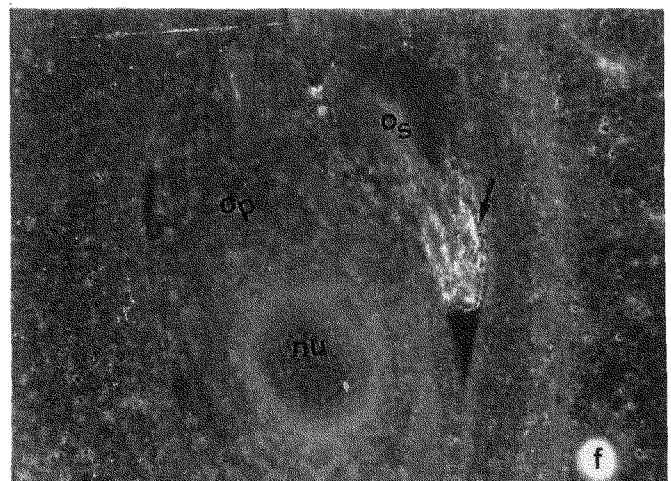
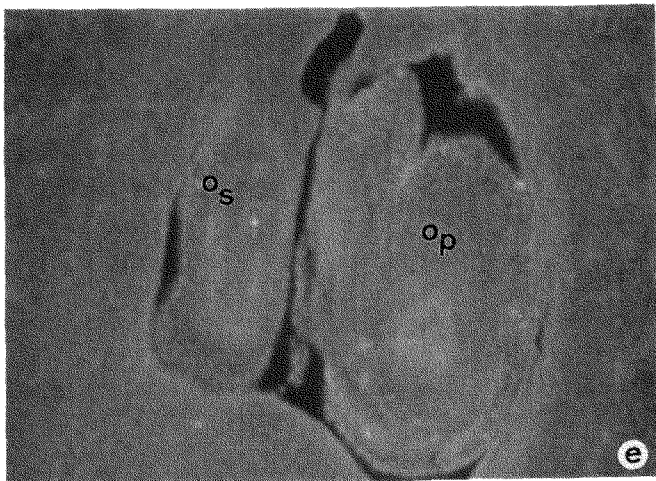
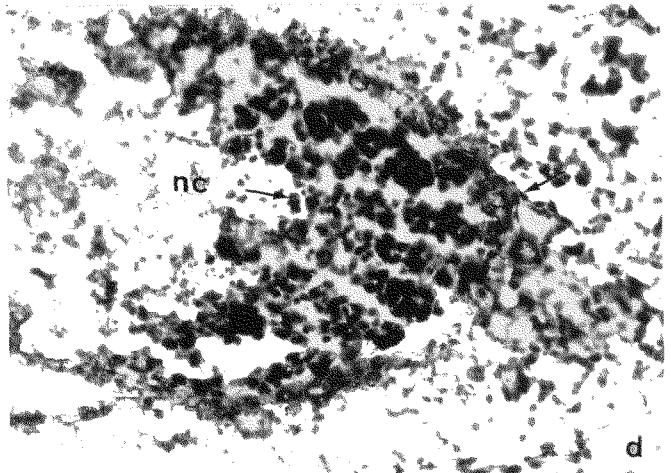
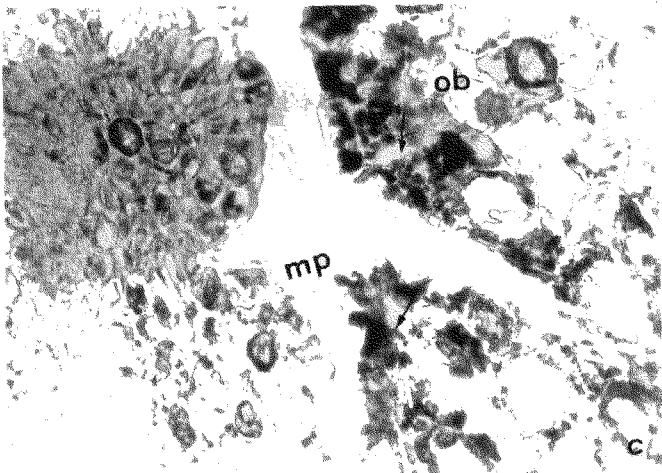
FOTO 2.1.b. Extremo micropilar (mp) de la nucela con células diferenciadas de la nucela (nu) donde se formará el saco embrionario Tinción de azul de anilina (548X).

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

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

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

FOTO 2.1.f. Ovulo secundario (os) degenerado con acumulación de callosa en el tegumento (flecha) y con la nucela degenerada, 20 días después de la antesis. Tinción de azul de anilina (86.45 X).



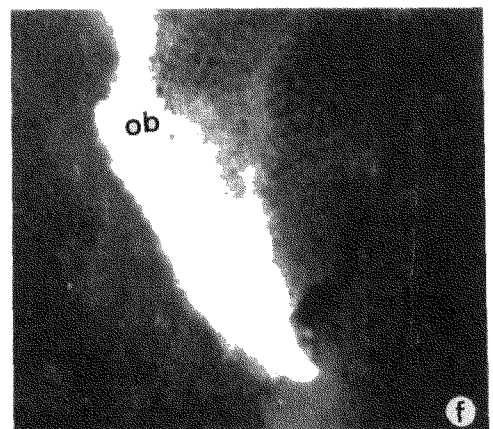
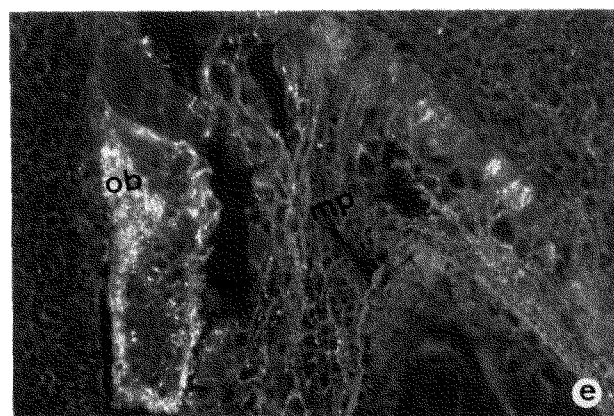
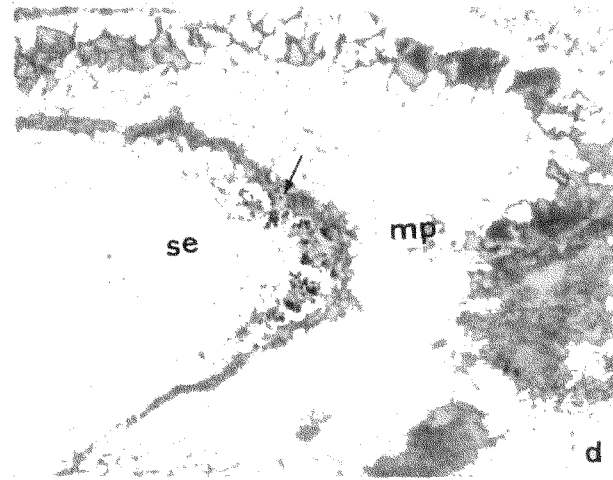
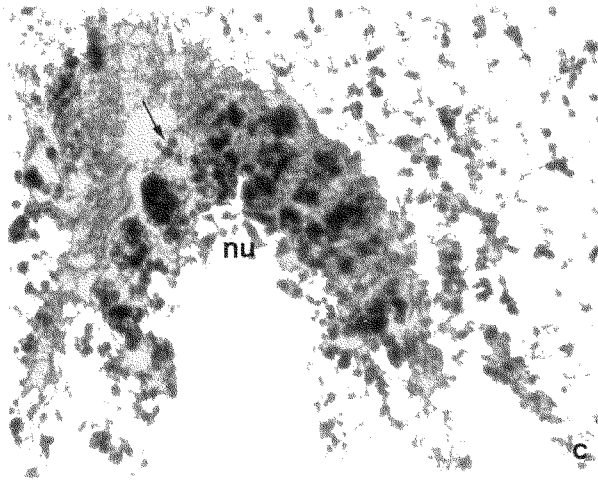
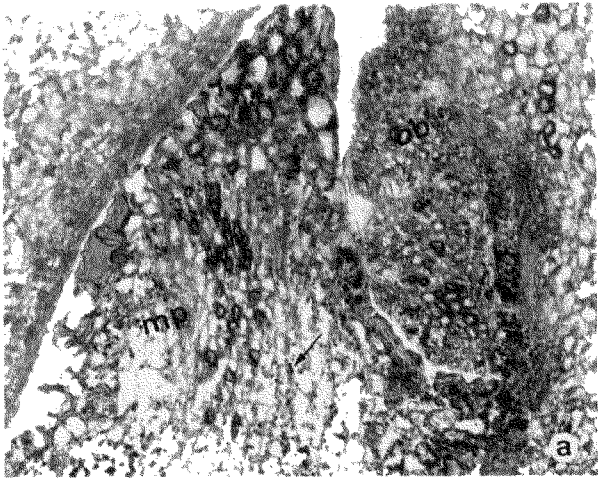
óvulo en los cuatro clones estudiados. A los 15 días el saco se ha alargado y se observa que ocupa alrededor de 2/3 de la extensión de óvulo en 'Moniquí' y en los dos mirobolanes, 'Mirobolán AD 605' y 'Mirobolán B', pero no ha aumentado en el híbrido 'GF-31'. Este a los 20 días se encuentra en el mismo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

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

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

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

- FOTO 2.2.a. Obturador (ob) y micropilo (mp) con granulos de almidón en las células a los 10 días después de la antesis, antes del paso del tubo polínico Tinción de IKI (179X).
- FOTO 2.2.b. Obturador (ob) y micropilo (mp) sin granulos de almidón en las células a los 15 días después de la antesis, después del paso del tubo del tubo polínico Tinción de IKI (179 X).
- FOTO 2.2.c. Células alrededor del saco embrionario (se) con almidón a los días 10 después de la antesis. Tinción de IKI (448 X).
- FOTO 2.2.d. Células alrededor del saco embrionario con menos acumulación de almidón después del alargamiento del saco embrionario (se) 15 días después de la antesis Tinción de IKI (179 X).
- FOTO 2.2.e. Obturador (ob) con las acumulaciones de callosa en el extremo como síntoma de degeneración, 15 después de la antesis. Tinción de azul de anilina. (219 X).
- FOTO 2.2.f. Obturador (ob) con gran acumulación de callosa en todas las células, 20 días después de la antesis. Tinción de azul de anilina (219 X).



2.3.4. Fecundación.

2.3.3.1. Fecundación en Cruzamientos Intraespecíficos.

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

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

2.3.3.2. Fecundación en Cruzamientos Interespecíficos.

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

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

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

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

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

FOTO 2.3.b. Tubo polínico (tp) al final del micropilo próximo a la nucela (nu) en el cruzamiento intraespecífico VII ('Mirobolan 605' x 'Mirobolan B') 15 días después de la polinización. Tinción de azul de anilina (549 X).

FOTO 2.3.c. Zigoto (z) en el extremo micropilar y núcleos de endospermo (en) en el cruzamiento I ('Moniquif' x 'Canino'), a los 15 días después de la polinización. Tinción de Gerlach (448 X).

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

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

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

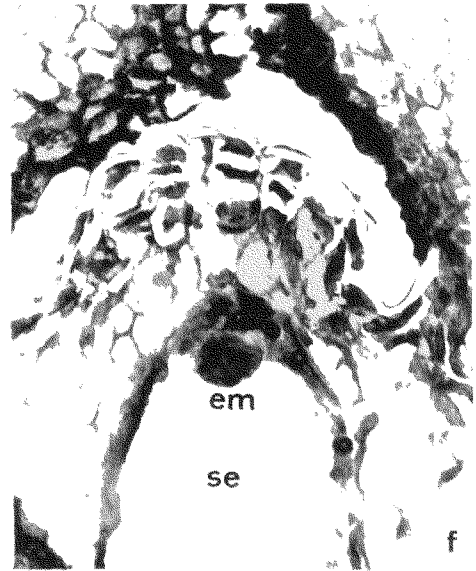
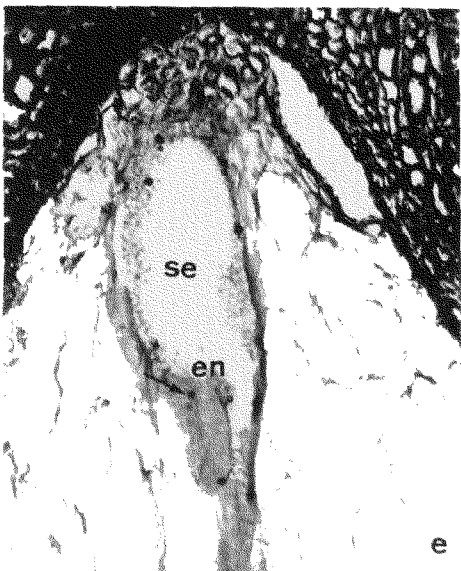
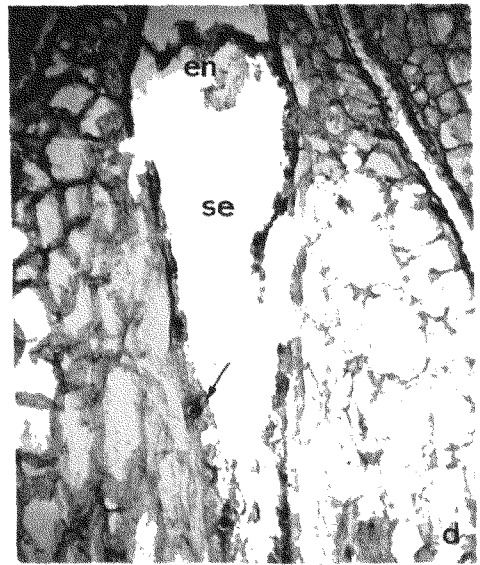
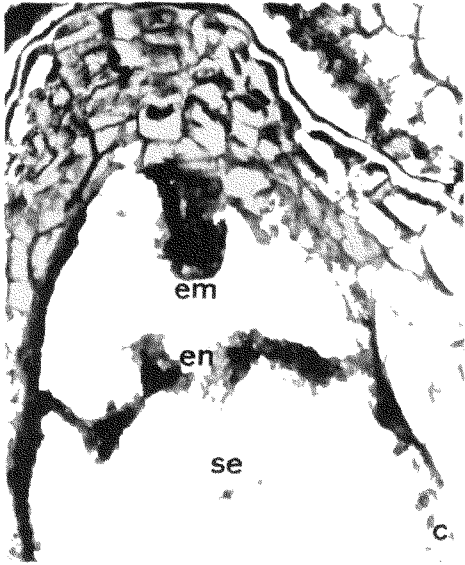
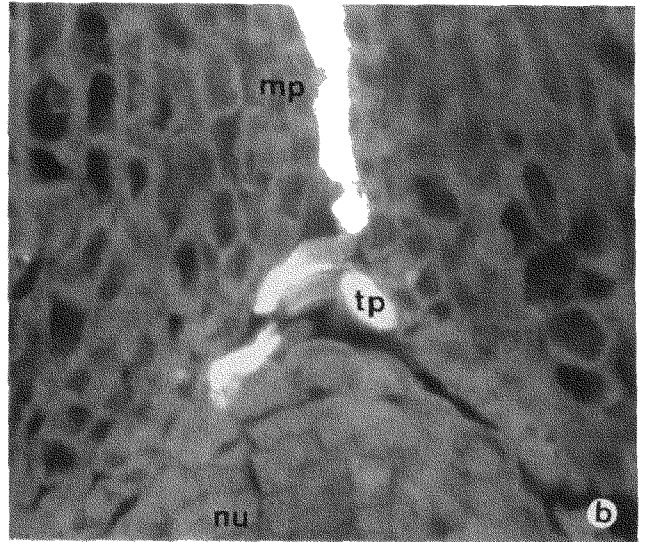
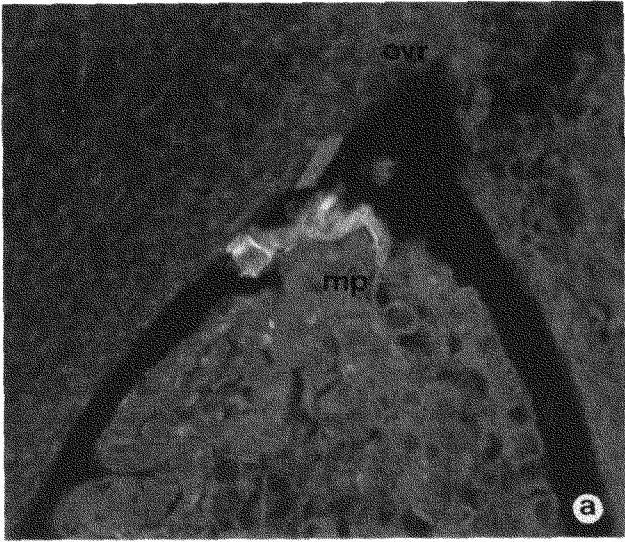


FOTO 2.4.a. Tubo polínico (tp) a su paso por el obturador (ob) y cercano al micropilo (mp) en el cruzamiento interespecífico IV a los 10 días de la polinización. Tinción de azul de anilina (549 X).

FOTO 2.4.b. Tubo polínico (tp) entrando en la nucela (nu) a los 15 días de la polinización en el cruzamiento interespecífico IV Tinción de azul de anilina (549 X).

FOTO 2.4.c. Zigoto (z) en el extremo del micropilo en el cruzamiento interespecífico IV a los 15 días después de la polinización Tinción de Gerlach (448 X).

FOTO 2.4.d. Núcleos de endospermo (en) en el saco embrionario del cruzamiento interespecífico IV a los 20 días de la polinización Tinción de Gerlach(448 X).

FOTO 2.4.e. Tubo polínico (tp) cerca del micropilo (mp) a los 15 días de la polinización en el cruzamiento VIII Tinción de azul de anilina (153 X).

FOTO 2.4.f. Tubo polínico en la pared del óvulo sin entrar en la nucela (nu) y después del micropilo en el cruzamiento VIII, a los 20 días de la polinización. Tinción de azul de anilina. (153 X).

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

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