



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.

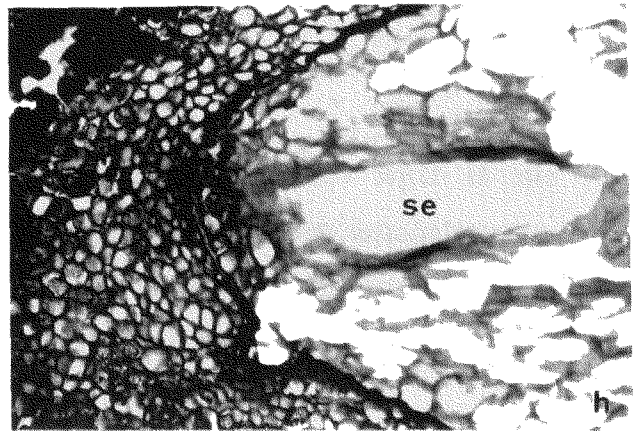
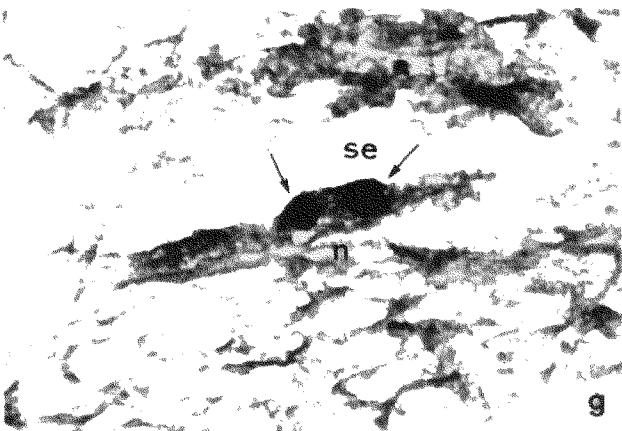
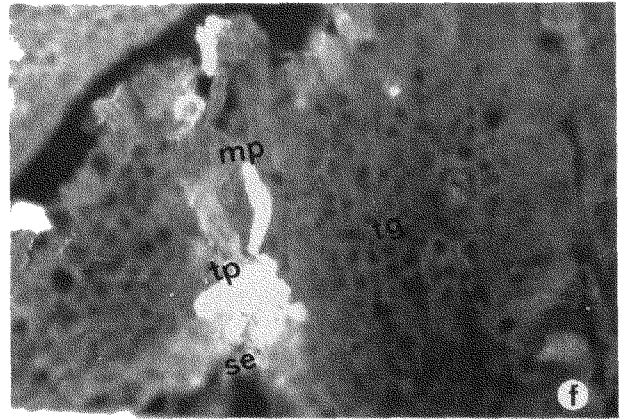
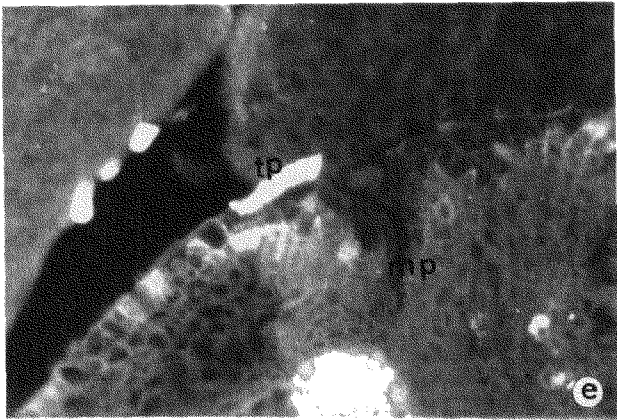
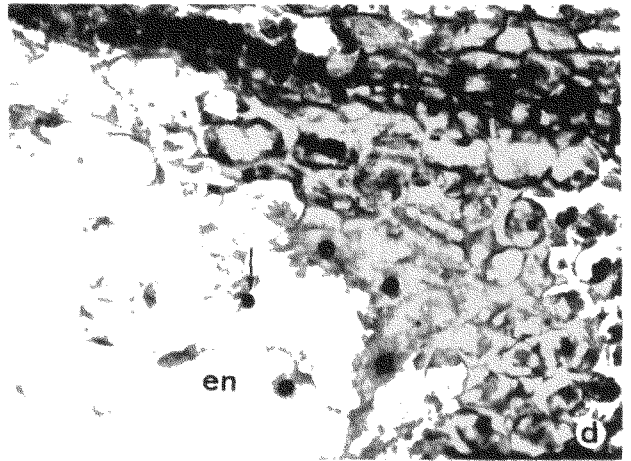
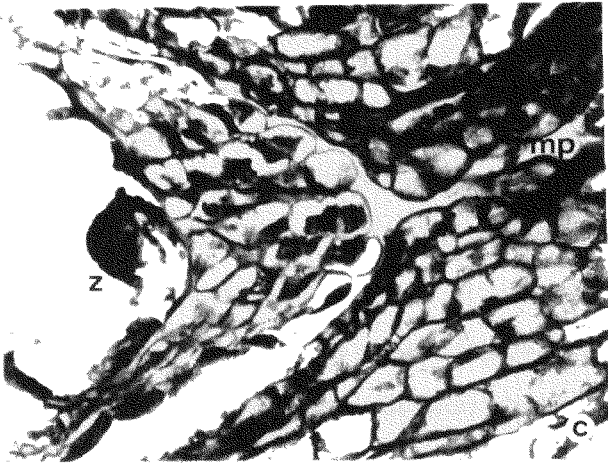
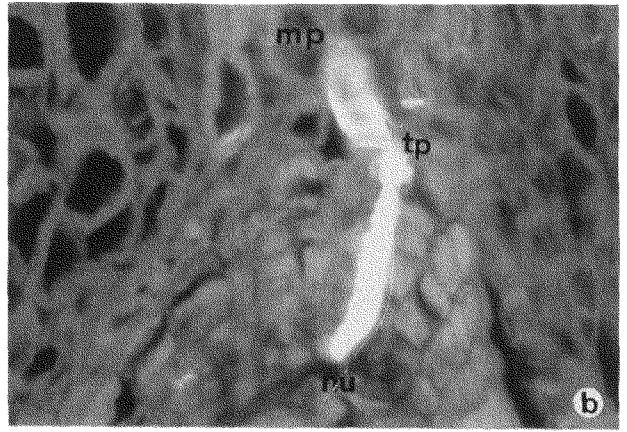
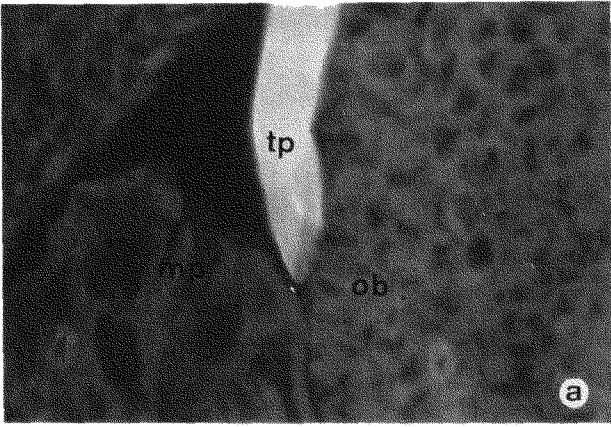
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados 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



2.4. DISCUSIÓN.

2.4.1. Desarrollo del saco embrionario.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Es de señalar que este tipo de estudios han sido en ciruelos europeos y no en

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

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

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

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

interespecífico IV compatible, en el que no se han manifestado barreras a nivel prezigótico. De esta forma el megagametofito necesitaría el estímulo de los tubos polínicos par aposeguir su desarrollo (PIMIENTA y POLITO, 1983).

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

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

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

3.1. INTRODUCCION.

3.1.1. Desarrollo normal de la semilla.

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

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

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

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

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

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

más alargado y cotiledonario, manteniendo siempre la misma polaridad.

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

3.1.2. Anormalidades en el desarrollo de la semilla híbrida.

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

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

3.1.3. Barreras de postfecundación.

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.3.3. Reguladores de crecimiento y medios de cultivo.

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

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

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

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

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

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

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

3.2. MATERIAL Y METODOS.

3.2.1. Cruzamientos estudiados.

3.2.1.1. Cruzamientos intraespecíficos:

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

3.2.1.2. Cruzamientos interespecíficos.

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

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

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

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

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

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

3.2.2.1. Ovulos incluidos en parafina y microscopía de fluorescencia.

De los 15 óvulos que se fijaron en el día del cultivo para cada cruzamiento realizado, 5 de ellos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 10 μ al microtomo, según el proceso descrito en el apartado 2.2.2.2. En estos cortes se realizó la tinción con calcofluor, para la tinción de celulosa de la pared celular (apartado 2.2.2.4.2.). De esta forma se puede apreciar el estado del endospermo, nuclear o celular, y del suspensor, así como la presencia o no de cigoto y las divisiones del embrión en los primeros estados de desarrollo. La observación se realizó bajo iluminación fluorescente con filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460).

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

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

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

Muchas veces el proceso de fijación se ve acompañado por un pardeamiento del material debido a la presencia de fenoles y taninos, o productos de oxidación, que interfieren con las tinciones y dificultan la observación del tejido al microscopio (HERR, 1992). El proceso requiere pasar los óvulos de F.A.A. a alcohol de 70% y después a agua (HERR, 1971). A continuación se da a los óvulos un pretratamiento con la solución de Stockwell (JOHANSEN, 1940; HERR, 1992) para eliminar los fenoles y taninos. La solución se compone de 1 g de ácido crómico, 10 ml de ácido acético glacial, y 1g de dicromato potásico en 90 ml de agua (HERR, 1992). Los tiempos recomendados de 20 a 30 horas fueron adaptados para el material en estudio. A continuación se aclaran tres veces con agua destilada para eliminar la solución. La técnica de STELLY *et al.* (1984) para el estudio de la megasporogénesis fue modificada para el estudio del desarrollo temprano del embrión. El fluido utilizado para aclarar los tejidos es uno de los que se mencionan en la bibliografía, que corresponde al descrito por YOUNG *et al.* (1979), en sustitución del fluido original (4 y 1/2) recomendado por HERR (1971) y algunas modificaciones de este (HERR, 1972, 1974, 1982; LEVIEIL y HUYGUE, 1985), siguiendo el protocolo siguiente:

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

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

3.2.2.3. Estudio de la degeneración del óvulo.

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

Para esta observación se tomaron 10 ovarios por cada uno de los cruzamientos realizados en el campo en 1992, el día de la fecha del cultivo "in vitro" indicado como DCO. Se extrajeron los óvulos del ovario y se fijaron en F.A.A. (apartado 1.2.2.1.). A continuación se lavaron durante una hora y se colocaron en frascos de cristal con la solución de azul de anilina al 0,1% en una solución 0,1 N de $PO_4 K_3$ (MARTIN, 1959) durante toda la noche. A los óvulos se les hizo unas incisiones laterales en el tegumento para facilitar la penetración del azul de anilina. Para la observación al microscopio se abrieron longitudinalmente y se observaron con iluminación fluorescente, filtro D (Filtro excitador BP 355-425, filtro bloqueador LP 460).

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

3.2.2.4. Estudio de la translocación en el óvulo.

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

3.2.3. Cultivo "in vitro" de óvulos.

3.2.3.1. Establecimiento del cultivo.

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

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

-Alcohol del 70% durante 1 minuto.

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

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

3.2.3.2. Medio de cultivo para óvulos.

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

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

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

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

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

3.2.3.3. Medio de cultivo para embriones.

Cuando el embrión, después de ser cultivado dentro del óvulo, ha crecido lo suficiente, se disecta dentro de la cámara de cultivo y se transfiere a un medio sólido para el cultivo del embrión aislado. Se ensayaron dos medios para el cultivo de embriones, el medio básico de MURASHIGE y SKOOG (1962), con 585 mg/l de L-glutamina y 1240 mg/l de K-succinato; y el medio denominado C₂ D, que es una modificación en las concentraciones de sales del MS (CHÉE y POOL, 1987). A ambos se les añade 3% de sacarosa y agar (Difco-Bacto agar), 6,5 g/l al MS y 7,5 g/l al C₂ D. Los medios de cultivo también se preparan a partir de soluciones stock concentradas descritas a continuación. Se añade la concentración deseada de sacarosa como se ha descrito anteriormente, se completa con agua hasta 1 litro y se ajusta el pH a 5,7 con KOH o HCl. La disolución del agar se realiza con un termoagitador magnético. El cultivo se realiza en tubos de ensayo, en los que se distribuye el medio (10 ml cada uno). La esterilización tiene lugar en autoclave a 120° C durante 20 minutos. Después se dejan enfriar.

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

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

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

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

3.2.3.4. Diseño del experimento.

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

- SH + 6% sacarosa (SH6%)
- SH + 6% sacarosa + hormonas (SHH6%)
- SH + 10% sacarosa (SH10%)
- SH + 10 %sacarosa +hormonas (SHH10%)

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

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

3.2.3.5. Toma de datos.

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

3.3.RESULTADOS.

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

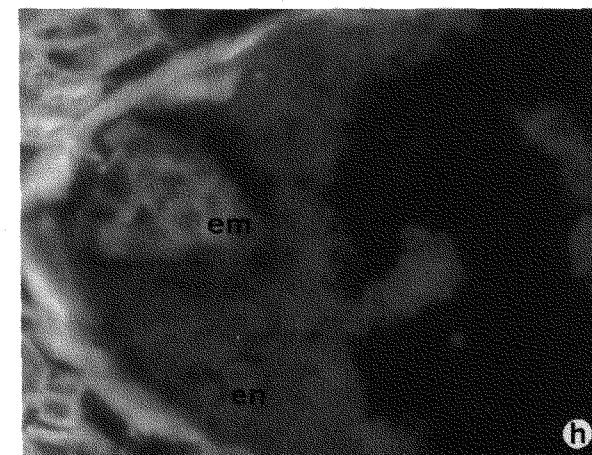
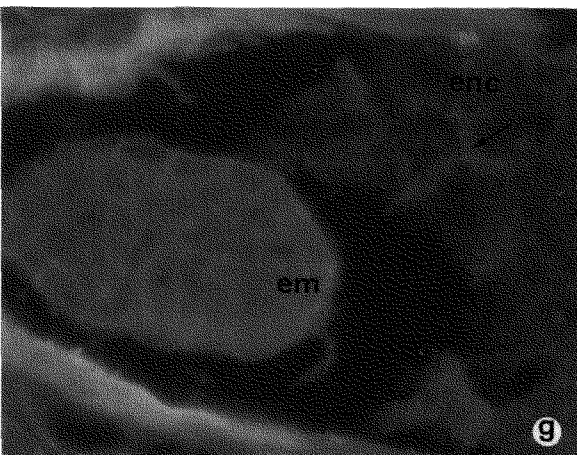
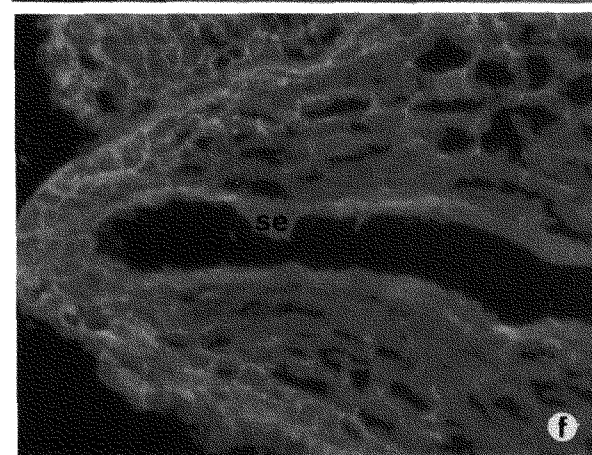
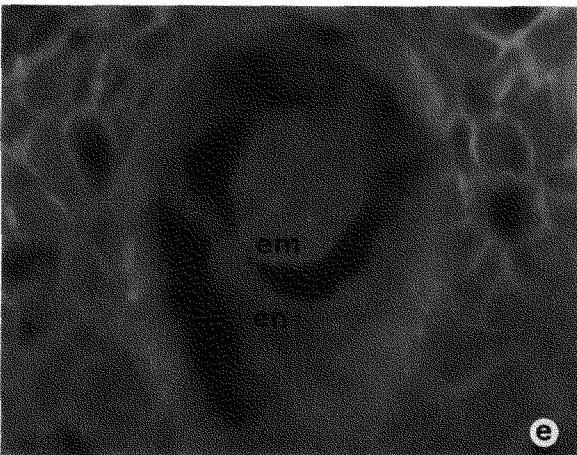
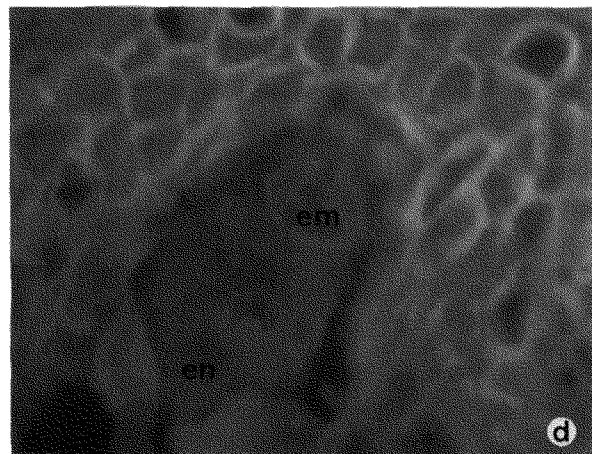
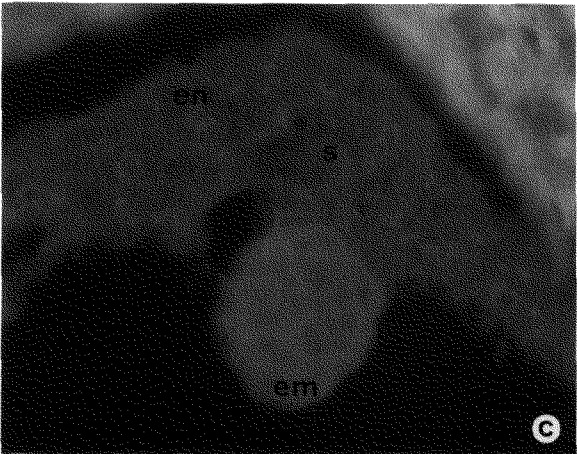
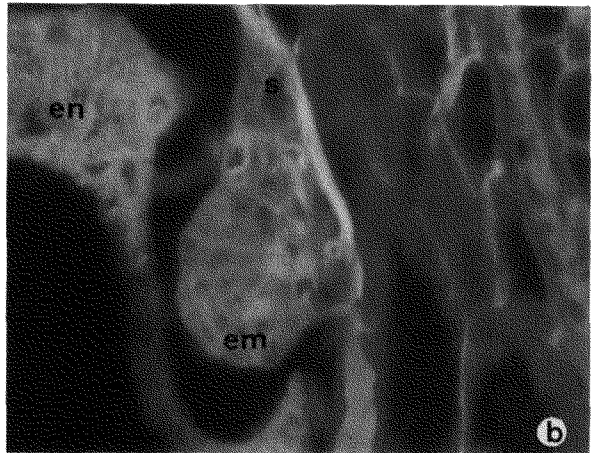
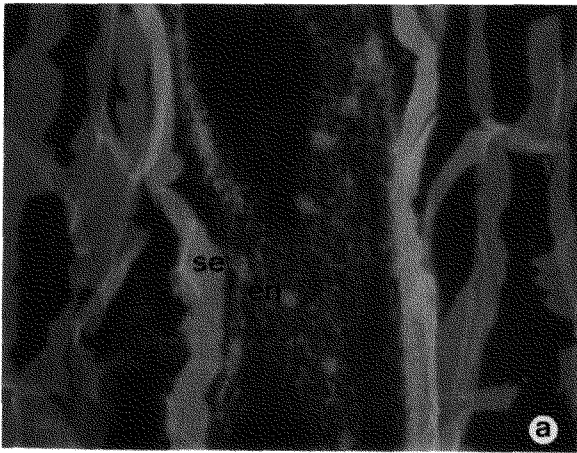
3.3.1.1. Presencia de embrión y endospermo en los diferentes cruzamientos.

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

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

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

- FOTO 3.1.a. Núcleos de endospermo (en) dentro del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico VII a los 30 días de la antesis. Tinción de calcofluor (549 X).
- FOTO 3.1.b. Embrión (em) en estado globular en el cruzamiento intraespecífico VII a los 30 días de la antesis Tinción de calcofluor (549 X).
- FOTO 3.1.c. Embrión (em) en estado globular y suspensor en el extremo micropilar del saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico IV el día de cultivo "in vitro" Tinción de calcofluor (549 X).
- FOTO 3.1.d. Saco embrionario con embrión (em) globular en el cruzamiento intraespecífico II a la 5ª semana después de la antesis (549 X). Tinción de calcofluor
- FOTO 3.1.e. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico III a la 5ª semana después de la antesis Tinción de calcofluor (549 X).
- FOTO 3.1.f. Saco embrionario (se) sin embrión en el cruzamiento interespecífico incompatible VI a la 5ª semana después de la plinización Tinción de calcofluor (206X).
- FOTO 3.1.g. Embrión (em) e inicios de paredes celulares del endospermo (enc) en el cruzamiento intraespecífico IX a la 5ª semana y medía después de la antesis Tinción de calcofluor (549 X).
- FOTO 3.1.h. Embrión (em) y endospermo (en) nuclear en el cruzamiento interespecífico X a la 5ª semanas y medía después de la antesis Tinción de calcofluor (549 X).



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

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

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

^z++ Endospermo nuclear ++* Endospermo celular -- Sin núcleos de endospermo

^y++ Suspensor con más de 5 células + Suspensor de 2 células -- Sin suspensor

3.3.1.2. Porcentaje de fecundación de los diferentes cruzamientos.

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

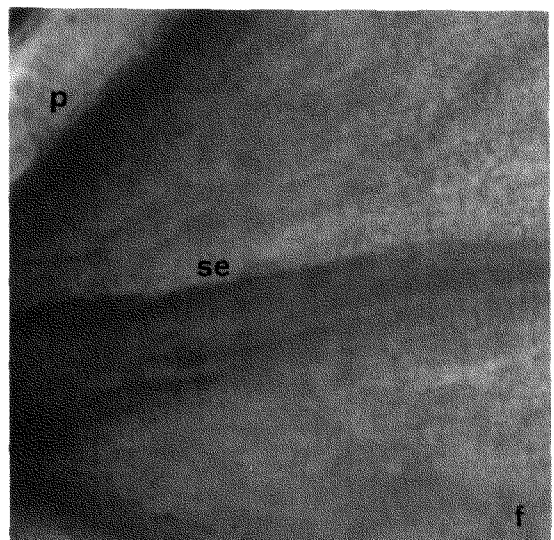
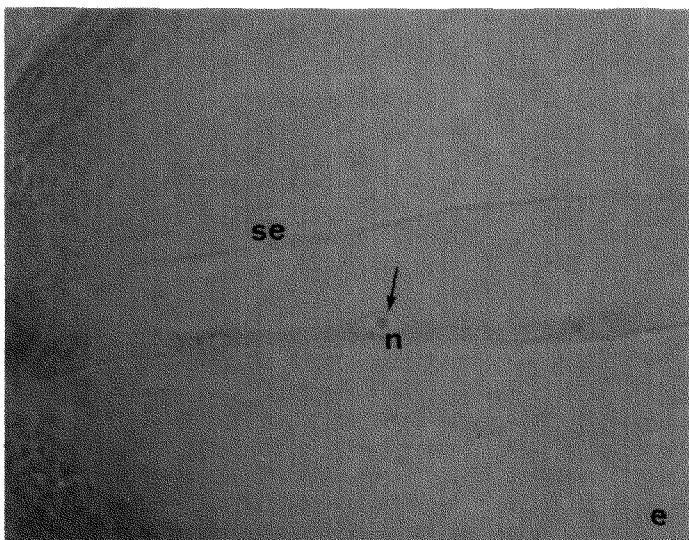
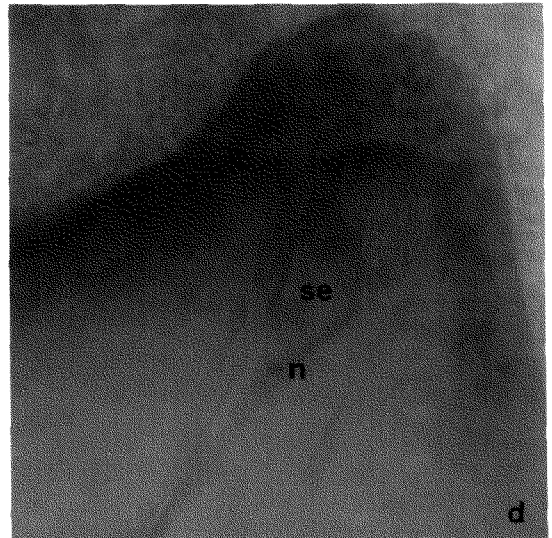
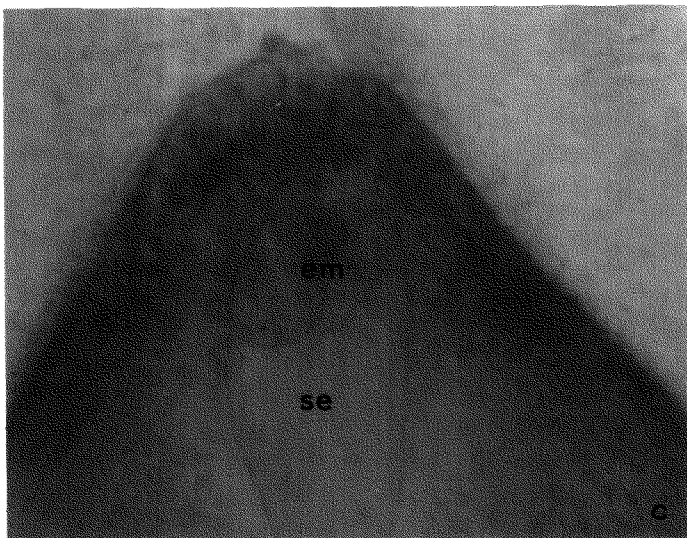
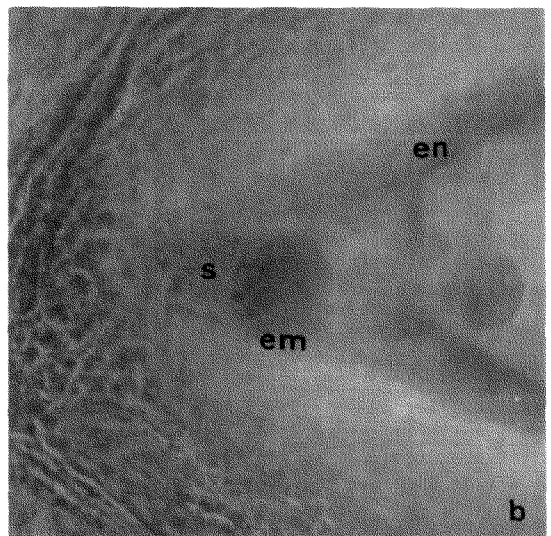
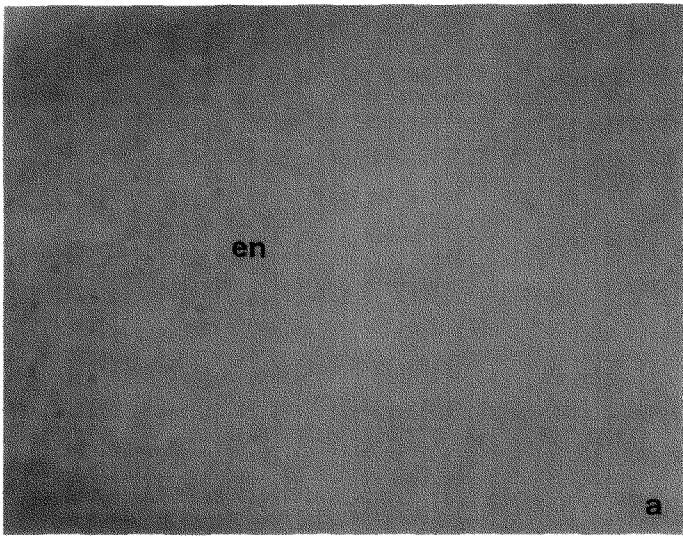
En el cruzamiento I el saco llega hasta el extremo de la calaza formado por un endospermo nuclear que ocupa toda la longitud del saco embrionario (Foto 3.2.a) y por un embrión globular en el extremo del micropilo (Foto 3.2.b). En ninguno de los óvulos observados se presentaban pliegues o malformaciones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

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

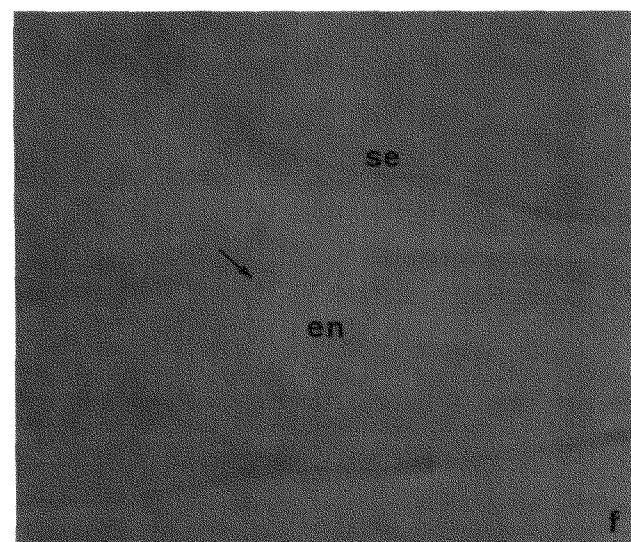
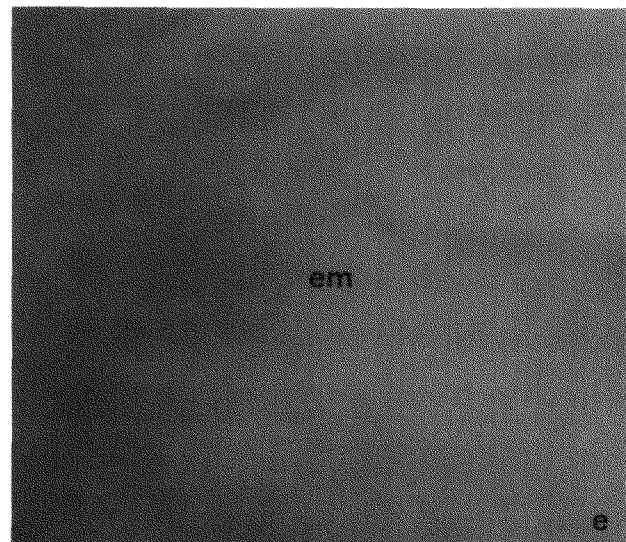
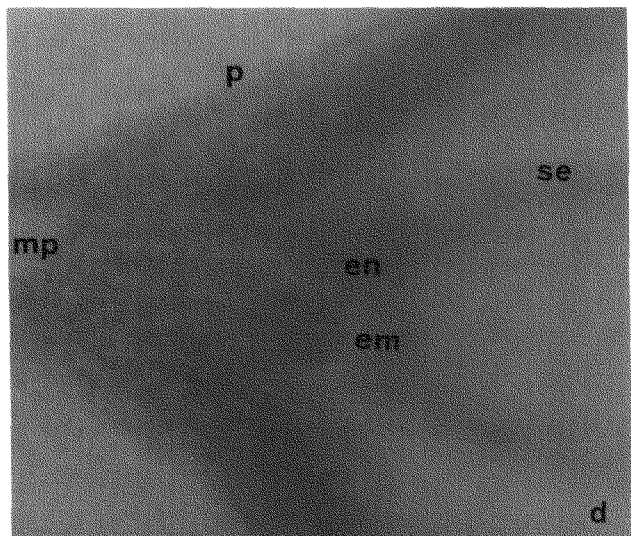
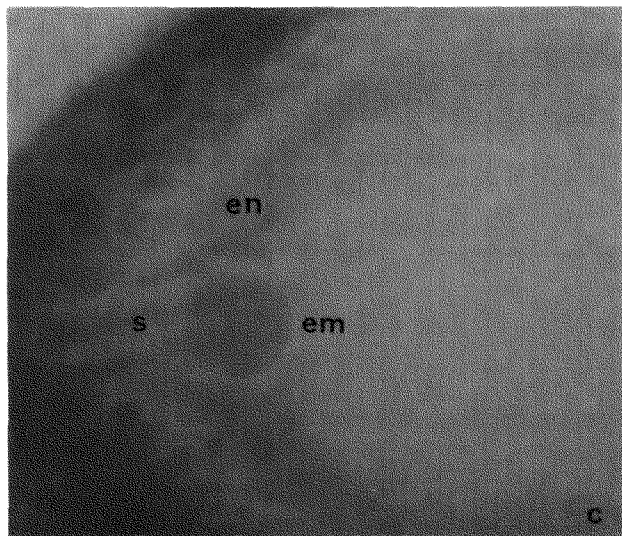
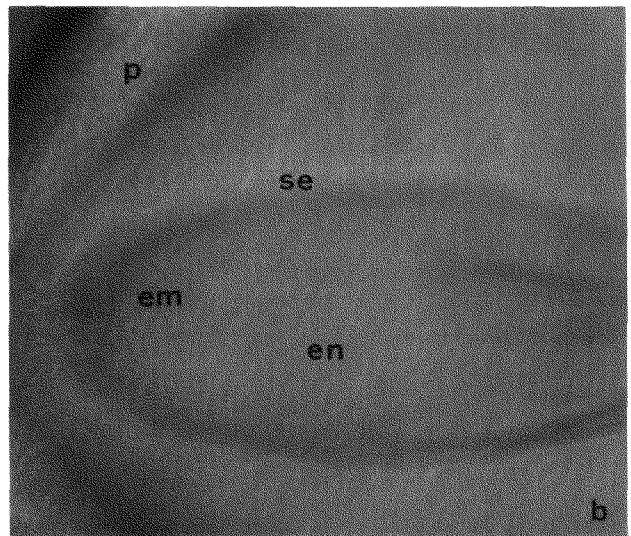
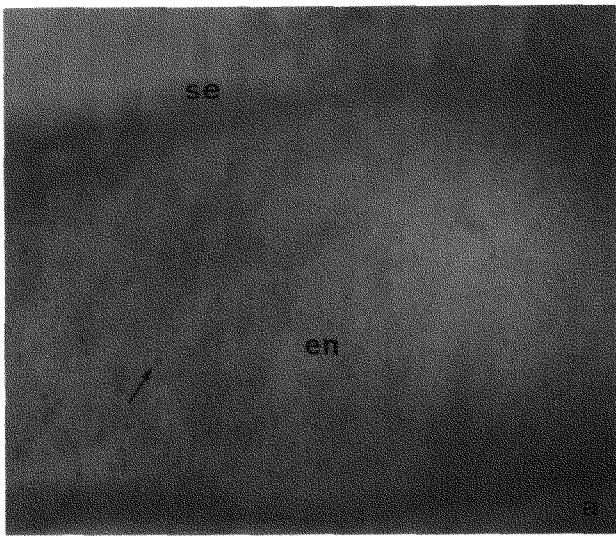
En el cruzamiento VIII, del híbrido 'GF-31' (*P.cerasifera* x *P.salicina*), todos los óvulos tenían el saco embrionario en mal estado, observándose en todos ellos pliegues a lo largo de la longitud del óvulo (Foto 3.2.f). En ninguno de ellos se pudieron distinguir núcleos de endospermo ni de embrión.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

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

- FOTO 3.2.a. Nucleos de endospermo (en) dentro del saco embrionario en el cruzamiento intraespecífico I a la 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (560 X).
- FOTO 3.2.b. Embrión (em) en estado globular, endospermo (en), suspensor (s) en el cruzamiento intraespecífico I a la semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350X).
- FOTO 3.2.c. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico III y embrión (em) a la 5ª semana después de la antesis con el embrión (em) globular. Tinción de hematoxilina (350 X).
- FOTO 3.2.d. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico III a la 5ª semana después de la antesis con núcleos (n) sin diferenciar. Tinción de hematoxilina (350X).
- FOTO 3.2.e. Saco embrionario (se) con núcleos en la pared en el cruzamiento interespecífico incompatible VI a la 5ª semana después de la antesis Tinción de hematoxilina (350 X).
- FOTO 3.2.f. Saco embrionario (se) con pliegues en el saco embrionario en el cruzamiento interespecífico incompatible VIII a la 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (140X).



- FOTO 3.3.a. Núcleos de endospermo (en) dentro del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico VII a la 4ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).
- FOTO 3.3.b. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico IV a la 5ª semana después de la antesis con el embrión globular (em) y nucleos de endospermo (en). Tinción de hematoxilina (140 X).
- FOTO 3.3.c. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico IV a la 5ª semana después de la antesis con el embrión globular (em), endospermo (en) y suspensor (s). (560 X).
- FOTO 3.3.d. Nucleos de endospermo (en) y embrión (em) globular en el extremo micropilar (mp) del saco embrionario (se) en el cruzamiento intraespecífico IX a la 5ª semana de la antesis. Tinción de hematoxilina (350 X).
- FOTO 3.3.e. Embrión (em) en estado globular en el cruzamiento interespecífico X a la 5ª semana de la antesis (560 X).
- FOTO 3.3.f. Saco embrionario (se) en el cruzamiento interespecífico X a la 5ª semana después de la antesis con nucleos de endospermo (en) (560 X).



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

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

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

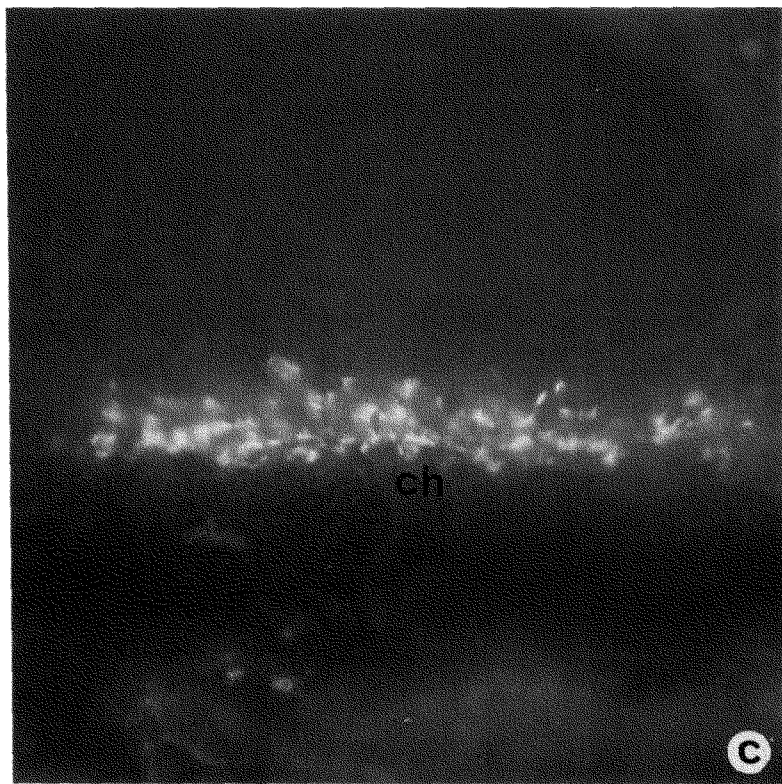
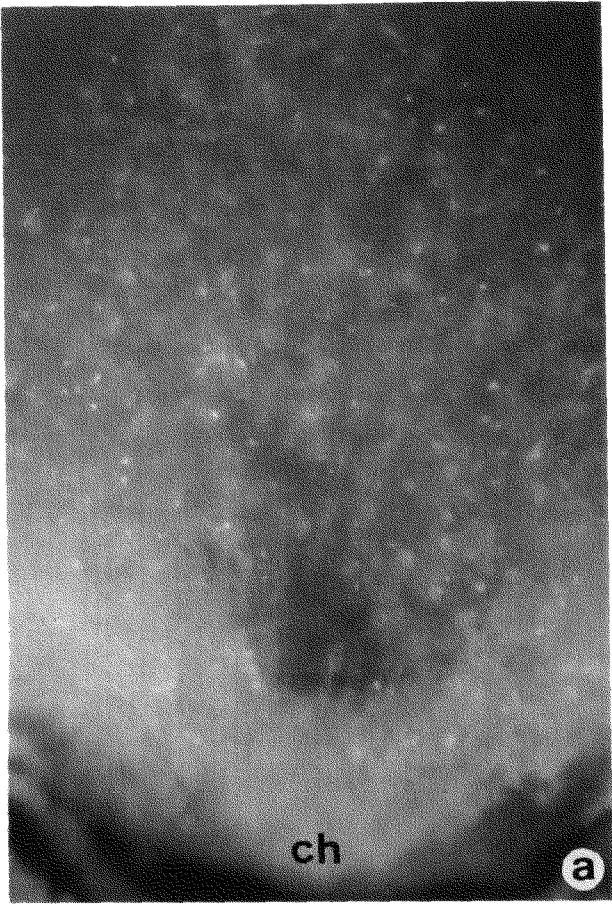
En los cruzamientos en los que se ha hecho el seguimiento desde la antesis hasta la fecundación se ha determinado que ésta tiene lugar a los 15-20 días después de la polinización. El estudio del óvulo primario entre la 4^a y 5^a semana después de la polinización refleja que los ovarios o presentan un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

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

FOTO 3.4.a. Callosa en la calaza (ch) del saco embrionario del híbrido 'Cachirulo' a la 5ª semana de la antesis. Tinción de azul de anilina (124 X).

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

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



cruzamientos de 'Cachirulo', II y III, en los que es de 80% y 90% respectivamente.

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

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

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

3.3.2. Crecimiento en cultivo "in vitro".

3.3.2.1. Embrión.

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

3.3.2.2. Endospermo.

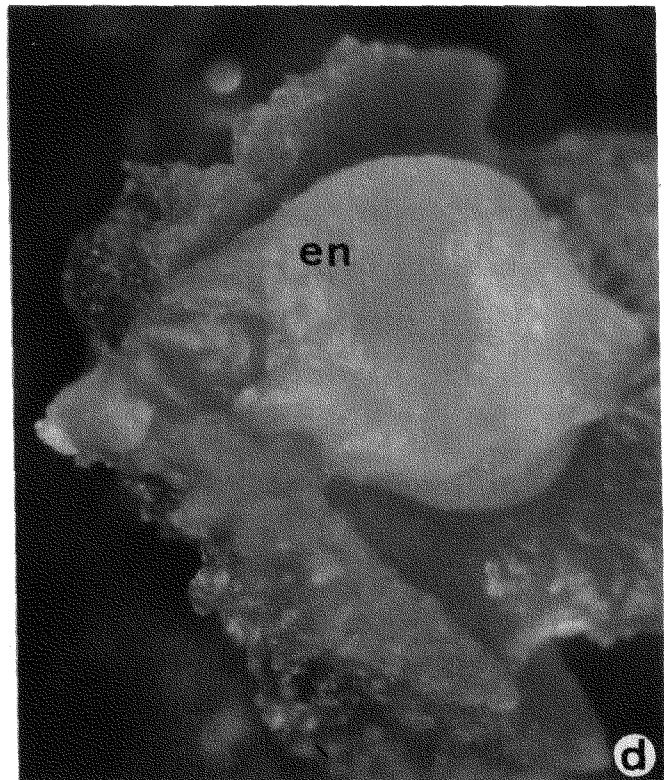
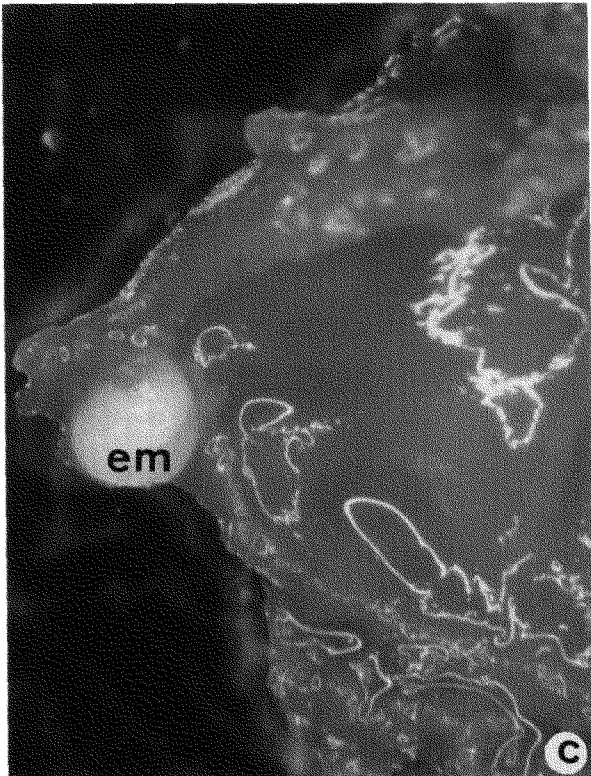
El crecimiento del endospermo se pudo observar en tres de los cruzamientos interespecíficos: en el I ('Moniquí' x 'Canino'), con los porcentajes más altos en los dos medios con 10% de sacarosa, con y sin hormonas; en el VII ('Mirobolán 605' x 'Mirobolán B') donde los mayores porcentajes fueron en los dos tratamientos sin hormonas con 6 y 10 % de sacarosa (Fig. 3.3.2.a) y en el IX ('Puebla de Soto' x 'Montizo') en el que la respuesta fue muy parecida en todos los tratamientos (Fig. 3.3.5.a). En los cuatro cruzamientos interespecíficos, en el IV ('Mirobolán B' x 'Moniquí') presentan endospermo el 40% de los óvulos en los dos tratamientos con 6% de sacarosa independiente del tratamiento con hormonas y un menor crecimiento se observa en el tratamiento con 10% de sacarosa (Fig. 3.3.2.b). En el cruzamiento X se observa un 50% de óvulos con crecimiento de endospermo en los dos tratamientos con 6% de sacarosa (Fig. 3.3.5.b). En los cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo', se observó endospermo en el cruzamiento II con 'Balones' (Fig. 3.3.3.a) en los dos medios con 6 y 10% de sacarosa pero sin hormonas; y en el cruzamiento III sólo en el medio con 6% de sacarosa y sin hormonas (Fig. 3.3.3.b) (Foto 3.5.d).

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

FOTO 3.5.b. Cultivo del embrión aislado en un medio de cultivo para embriones del cruzamiento VII.

FOTO 3.5.c. Embrión del cruzamiento interespecífico IV después de 6 semanas en cultivo "in vitro"(14.5 X).

FOTO 3.5.d. Endospermo del cruzamiento interespecífico III después de 5 semanas en cultivo "in vitro" (6.4 X).



3.3.2.3. Callo.

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

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

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

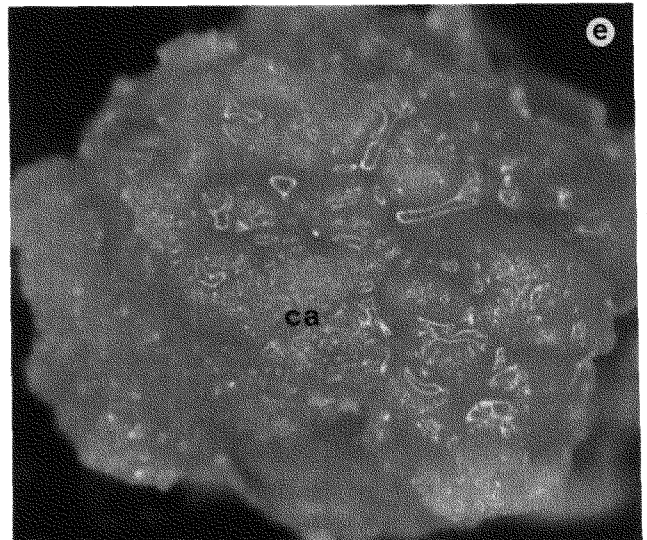
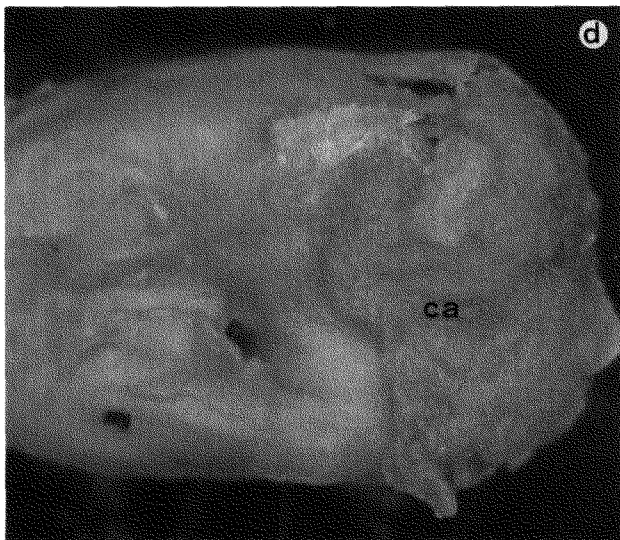
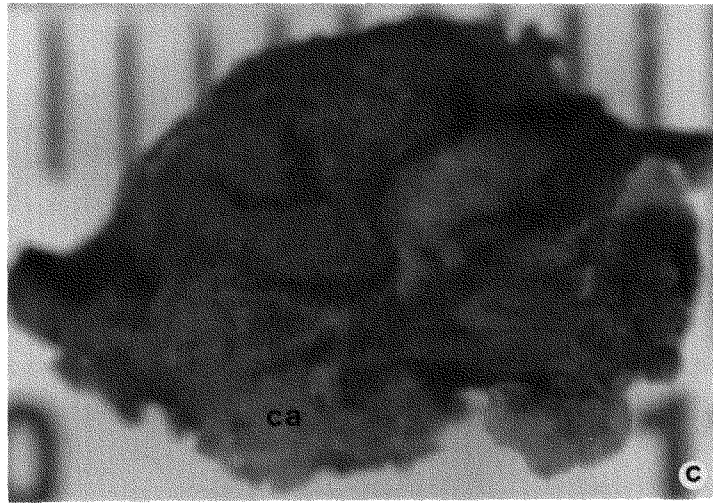
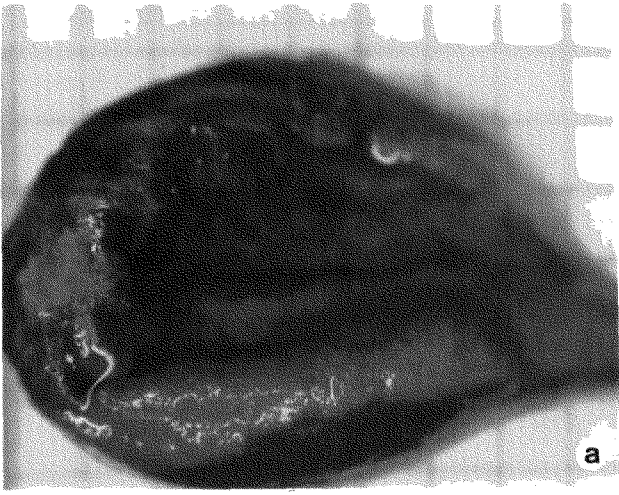
FOTO 3.6.a. Ovulo de 'Moniquí' sin callo después de 5 semanas en cultivo "in vitro"
(6.7 X).

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

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

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

FOTO 3.6.e. Ovulo de 'Puebla de Soto 101' con mucho callo (ca) en toda la longitud del óvulo
en el cruzamiento interespecífico X después de 6 semanas en cultivo "in vitro"
(10 X).



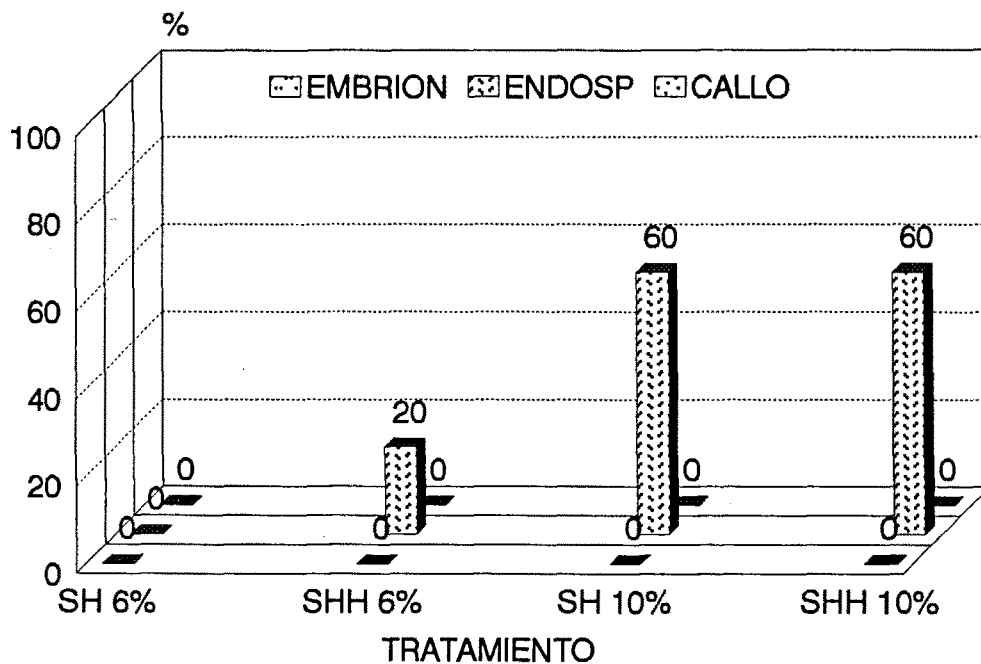


Figura 3.3.1. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico I: MONIQUI x CANINO

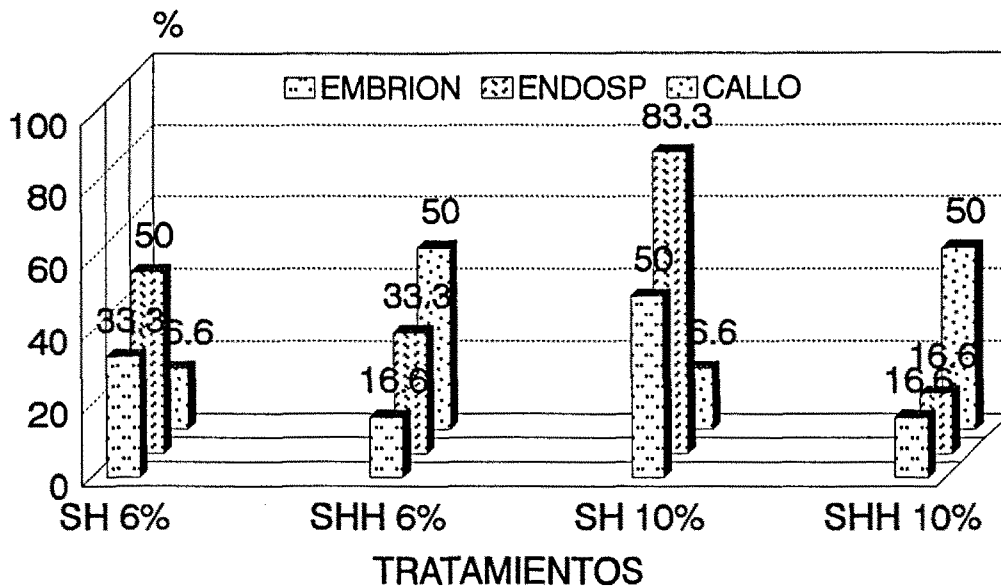


Figura 3.3.2.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico VII: MIROBOLAN 605 x MIROBOLAN B

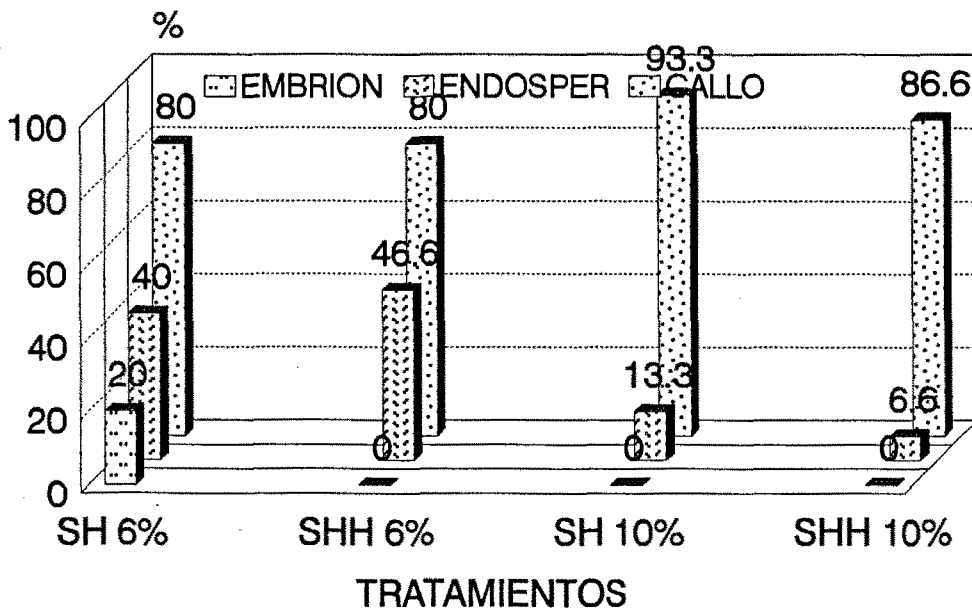


Figura 3.3.2.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico IV: MIROBOLAN B x MONIQUI

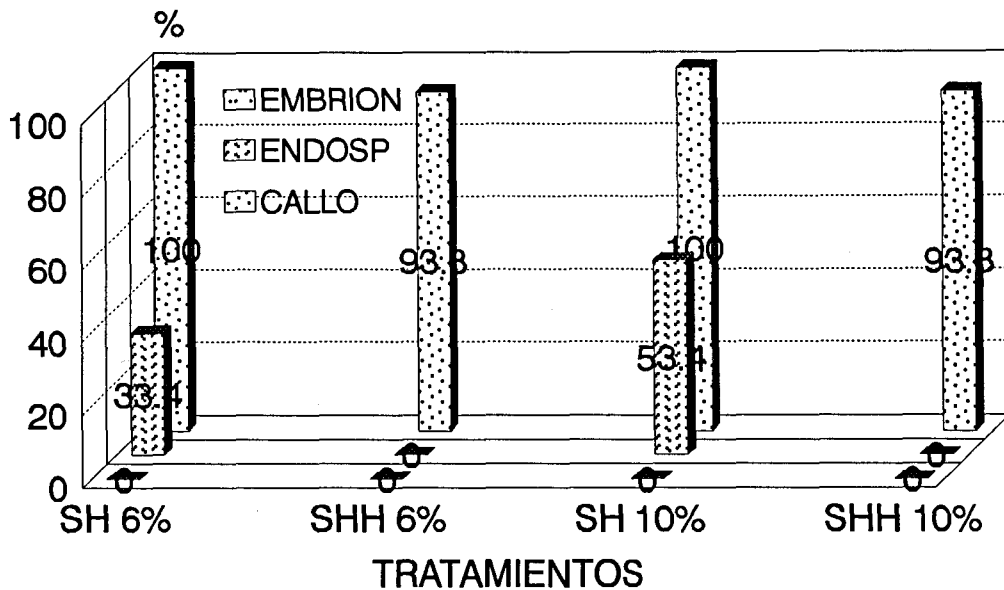


Figura 3.3.3..a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecifico II: CACHIRULO X BALONES

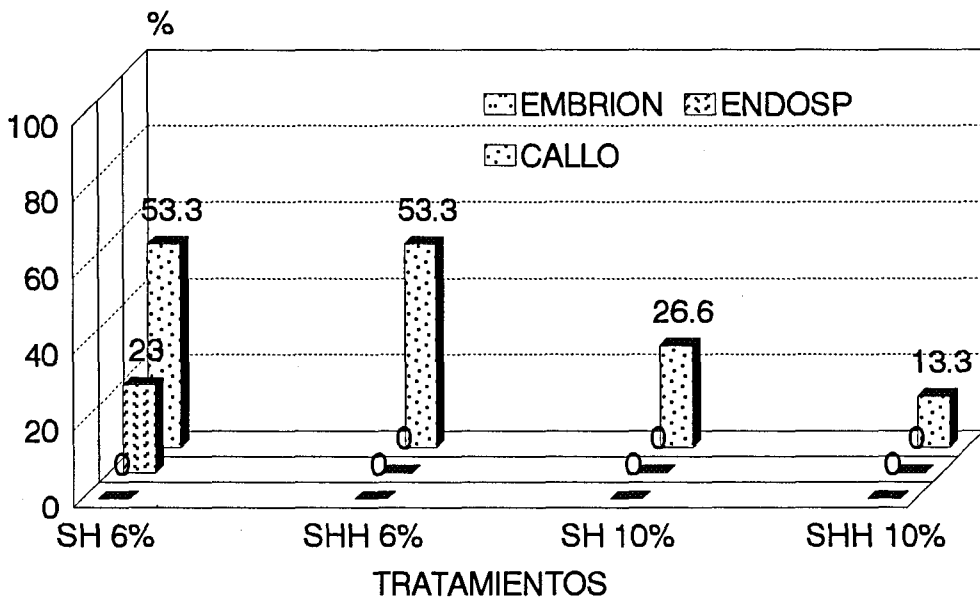


Figura 3.3.3.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecifico III: CACHIRULO X TOMENTOSA

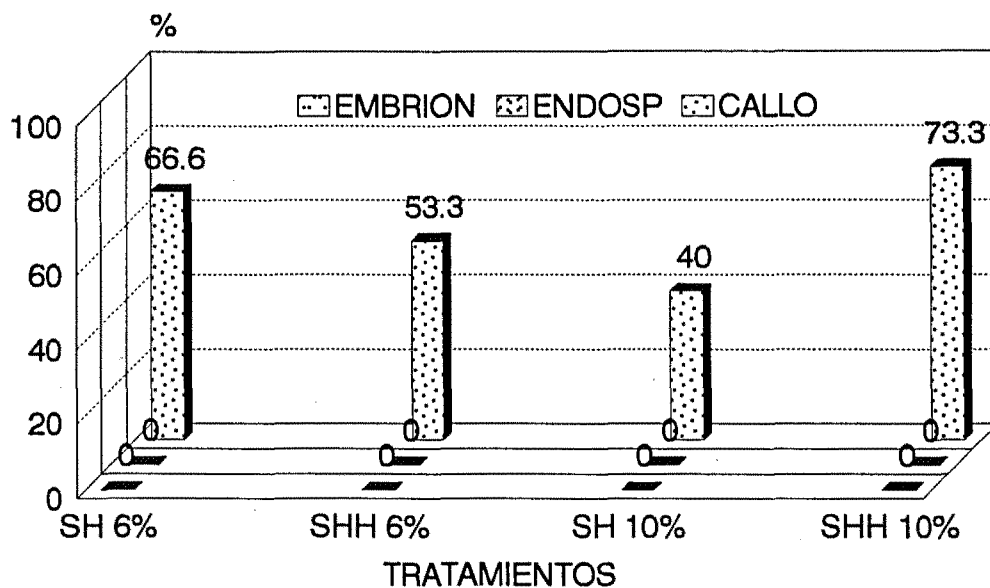


Figura 3.3.4.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico V: CACHIRULO X MIROBOLAN 605

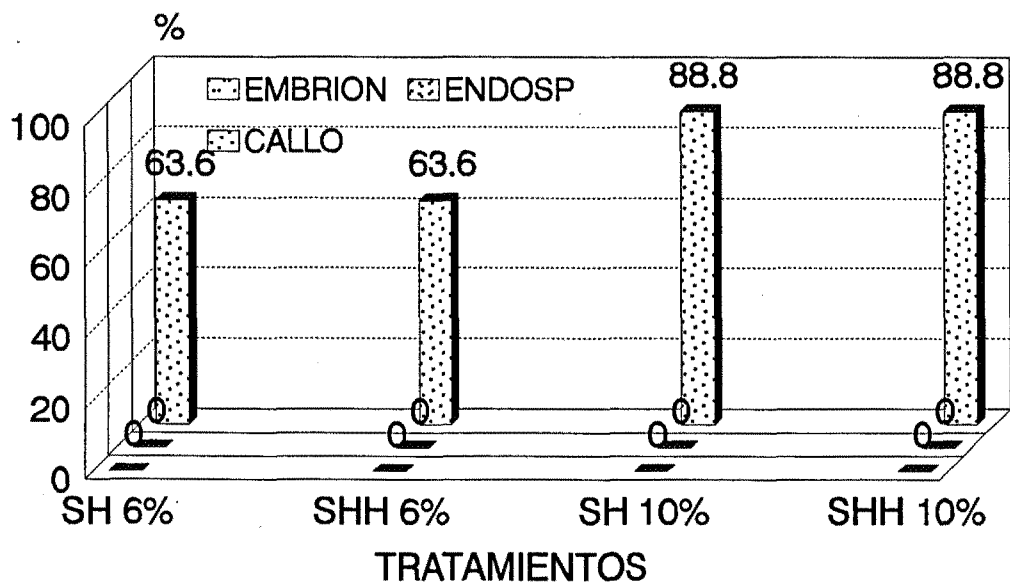


Figura 3.3.4.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico VI: CACHIRULO X MIRANDIER 617

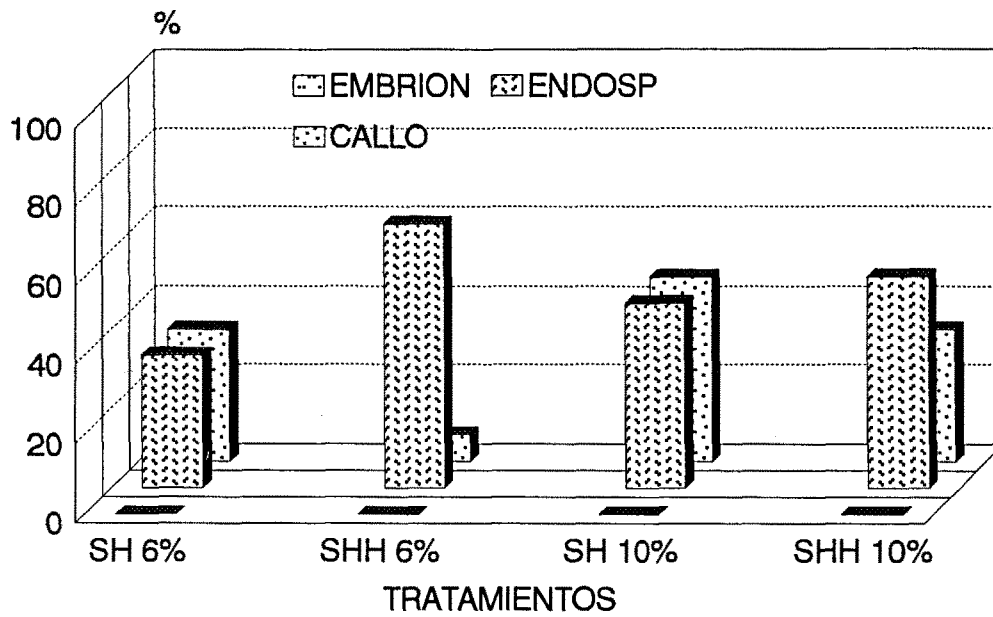


Figura 3.3.5.a. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento intraespecífico IX: PUEBLA DE SOTO X MONTIZO

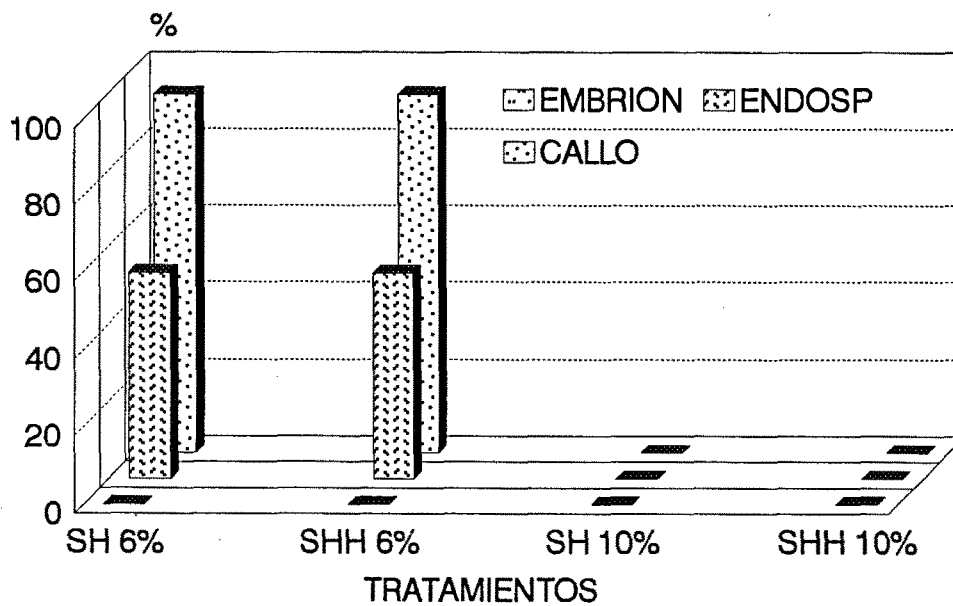


Figura 3.3.5.b. Formación de callo, endospermo y embrión en el cruzamiento interespecífico X: REINA CLAUDIA X MONTIZO