



Universitat de Lleida

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

**M<sup>a</sup> 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](http://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](http://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](http://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<sup>a</sup> JOSE RUBIO CABETAS**

**UNIVERSIDAD DE LLEIDA**

### 3.4. DISCUSION.

#### 3.4.1. Estado de los óvulos.

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

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

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

La fecundación depende de la viabilidad de los óvulos en el momento de la fecundación. Se ha podido observar por la tinción de la callosa (ANVARI y STOSSER, 1978) que la viabilidad de los óvulos, como se ha descrito para muchas especies de *Prunus*, puede variar según la especie y el cultivar y que flores en el mismo estado de desarrollo pueden tener sacos con diferentes grados de maduración (EATON y JAMONT, 1964; STÖSSER y ANVARI, 1983; PIMIENTA y POLITO, 1983). La fecundación es mayor en el cruzamiento intraespecífico de *P.cerasifera* ('Mirobolán B' x 'Mirobolán 605') que en el interespecífico *P.cerasifera* x *P.armeniaca* ('Mirobolán B' x 'Moniquí'), a pesar de que el primero presente un mayor porcentaje de óvulos degenerados. Según STÖSSER y ANVARI (1982) en estos óvulos nunca entran tubos de polen. En el cruzamiento VII es posible que ocurra una degeneración, incluso después de la fecundación (MOGENSEN, 1980), bien por falta de translocación de nutrientes o por una competencia mayor en las plantas con mayor número de flores como son los mirobolanes.

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

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

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

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

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

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

#### 3.4.2. Técnicas empleadas para el estudio.

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

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

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

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

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

### 3.4.3. Cultivo "in vitro".

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

La respuesta más clara al cultivo "in vitro" ha sido la formación de callo en el tegumento. Esta respuesta ha sido distinta dependiendo de las especies y dentro de los cultivares y parece estar más asociada a la especie utilizada como planta polinizada que al polen. Mientras que en los dos cruzamientos con los dos mirbolanes, tanto el cruzamiento VII, intraespecífico, como el IV, interespecífico, se ha obtenido un alto porcentaje de formación de callo, en el cruzamiento I éste ha sido nulo. Igualmente ocurre en los cruzamientos IX y X de los ciruelos hexaploides, especies muy relacionadas. Por último los óvulos del híbrido 'Cachirulo' responden a la formación de callo en todos los cruzamientos, aunque se observa una mayor respuesta en los medios con hormonas. Todo ello indica que el cultivo o respuesta es independiente del cruzamiento intra o interespecífico, lo cual es lógico ya que es una respuesta del tejido materno. Esta variabilidad ha sido señalada en muchos cultivos "in vitro", bien sea de cruzamientos intra como interespecíficos (STEWART y HSU, 1978; RANGAN, 1980; RAGHAVAN, 1989; BRUUN, 1991a).

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

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

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

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

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



(BRUUN, 1990b). Por ello como se ha señalado para cruzamientos interespecíficos, no siempre es suficiente el cultivo de óvulos para superar las barreras de postfertilización (BINO *et al.*, 1988).

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

En algunos casos se ha observado que el suspensor es necesario para el crecimiento "in vitro" (RANGAN, 1984), aunque no se ha establecido con seguridad su papel en la translocación de nutrientes hacia el embrión. Se ha observado, en todo caso, que el suspensor degenera antes en los cruzamientos interespecíficos (BRUUN, 1991b), aunque este proceso puede ser general, haciendo al embrión mas autónomo (BRUUN, 1991a), dentro de los diferentes niveles de respuesta. La placenta también puede ser un medio de aporte de nutrientes (OCHATT *et al.*, 1985), pero sólo en los casos en los que está en contacto con el medio, por lo que las diferencias que se han observado dentro de cada repetición pueden ser debidas a ello. Las modificaciones estructurales del óvulo parecen radicar principalmente en las modificaciones en el esporofito y en el tegumento, que se atrofia formando arrugas, pero no en el embrión ni en el endospermo (BRUUN, 1991a), ya que solamente se pueden diferenciar los casos en los que el endospermo crece más deprisa (BRUUN, 1991b) o más lentamente (JOSHI y JOHRI, 1972).

A excepción del cruzamiento I, en el que el día de la puesta en cultivo ya se habían detectado taninos en el tegumento, en todos los otros cruzamientos se han desarrollado taninos después de 5 semanas en cultivo, al contrario de lo observado en los cruzamientos interespecíficos en remolacha, en los que al parecer los embriones en cultivo "in vitro" germinan antes y poseen una pared más débil (BRUUN, 1992a). Solamente en el cruzamiento VII se consiguió recuperar el embrión y hacerlo germinar en medio C<sub>2</sub>D, pero después de un período de latencia para germinar (RAMMING, *et al.*, 1985; RUBIO *et al.*, 1992). En el resto

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

El medio suplementado con hormonas no ha sido suficiente para recuperar embriones en este estado globular. En melocotonero se ha indicado que no se necesitan hormonas cuando el embrión alcanza un estado de desarrollo autótrofo (RAGHAVAN, 1966). Sin embargo, los niveles adecuados de hormonas en los medios de cultivo se encuentran todavía a un nivel empírico de estudio por lo que no se pueden definir (PICKERSGILL, 1991, PINTO *et al.*, 1990). Los niveles de hormonas recomendados en este experimento han dado resultados, aunque no muy satisfactorios, en cultivares de maduración temprana de melocotonero (PINTO *et al.*, 1991), pero el tamaño del embrión no es comparable en uno y otro caso, pues a un tamaño de 50  $\mu$  el embrión seguramente no ha alcanzado el estado autótrofo señalado por RAGHAVAN, (1966) y todavía depende de los nutrientes aportados por el suspensor y por el endospermo. El pequeño tamaño del embrión, en el estado globular, seguramente requiere unos nutrientes más específicos que los de los medios utilizados (RAMMING, comunicación personal), aunque hayan sido útiles para el crecimiento del embrión de diversas especies de *Prunus*, (RAMMING, 1982, 1990, RAMMING y TANNER, 1983, 1987).

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

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

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

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

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

#### 4. CUAJADO FINAL EN CAMPO.

##### 4.1. INTRODUCCIÓN.

###### 4.1.1. Desarrollo del fruto.

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

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

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

#### 4.1.2. Caída de frutos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RALLO y FERNANDEZ-ESCOBAR, 1985).

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

#### 4.1.3. Identificación de los híbridos interespecíficos.

Antes de la utilización de los híbridos interespecíficos se deben identificar para evitar confusiones, ya que las semillas procedentes de cruzamientos interespecíficos pueden dar lugar a plantas que no son los híbridos esperados. Los híbridos pueden ser identificados por su morfología intermedia o por la presencia de caracteres marcadores procedentes de ambos padres. Los marcadores moleculares han resultado muy útiles para ello, aunque en general consisten en técnicas que requieren una sofisticación mayor que la simple descripción morfológica. En el género *Prunus* los más utilizados han sido los marcadores isoenzimáticos para la identificación de híbridos F<sub>1</sub> de almendro x melocotonero y ciruelo x albaricoquero (BYRNE y LITTLETON, 1988, 1989; CHAPARRO *et al.*, 1987; FRIEND, 1989; MOWREY, *et al.*, 1989). Los marcadores moleculares han servido también para el estudio de la filogenia de este género (KANEKO *et al.*, 1986; MOWREY y WERNER, 1990). Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) de genes ribosomales han sido utilizados también para la relación filogenética de tres especies del subgénero *Prunophora* (REYNDERS y SALESSES, 1990) y pueden ser aplicables para la identificación de los híbridos interespecíficos. Otras técnicas moleculares se están desarrollando para la identificación de híbridos, como es la reacción en cadena de la polimerasa PCR (WILLIAMS *et al.*, 1990).



## 4.2. MATERIAL Y METODOS.

### 4.2.1. Polinizaciones en campo.

#### 4.2.2.1. Cruzamientos intraespecíficos:

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

#### 4.2.2.2. Cruzamientos interespecíficos.

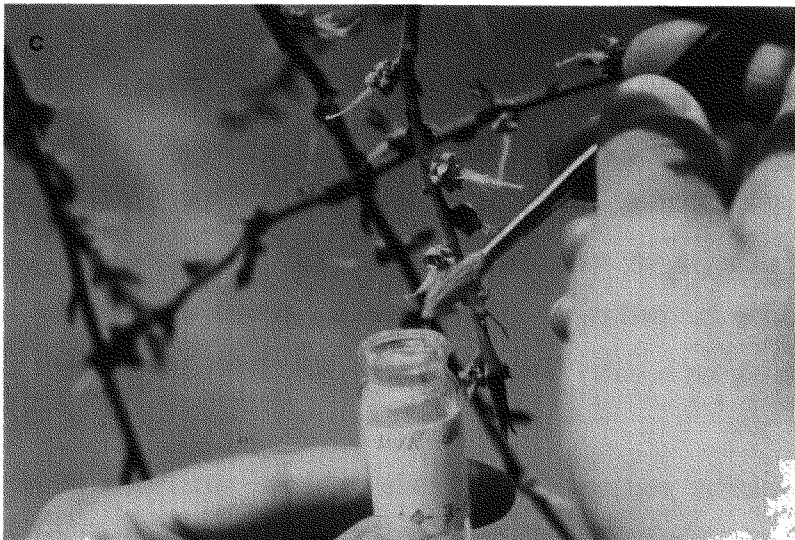
- III. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X (*P. tomentosa*)
- IV. 'Mirobolán B' (*P. cerasifera*) X 'Moniquí' (*P. armeniaca*)
- V. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X 'Mirobolán AD 605' (*P. cerasifera*)
- VI. 'Cachirulo' (*P. amygdalus x P. persica*) X 'Myrandier 617' (*P. amygdalus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

Los cruzamientos dirigidos en campo se realizaron polinizando manualmente las flores. Las ramas fueron emasculadas en campo en el estado D (BAGGIOLINI, 1984), (Foto 4.1a), para evitar su autopolinización, así como un posterior acercamiento de insectos polinizadores que pudieran aportar cualquier polen ajeno al ensayo. Trascorridos 2 días se polinizaron manualmente mediante el uso de un pequeño pincel impregnado de polen con el que se roza el estigma (Foto 4.2.b). Una parte de las flores emasculadas se dejaron sin polinizar en todos los cruzamientos en el año 1992 para observar la caída en flores vírgenes.

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

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

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



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

**CUADRO 4.1.** Día de la antesis en los diferentes años en que se han realizado los cruzamientos.

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

#### 4.2.2. Determinación de los niveles de caída y cuajado.

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

Los ensayos se realizaron los dos años en los mismos árboles, excepto en los

cruzamientos IV y VII de los dos mirobolanes que en el año 1991 se realizaron en árboles más viejos y no sometidos a poda. La fructificación se midió aproximadamente 13 semanas después de la polinización como representación del cuajado final en campo.

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

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

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

### 4.3 RESULTADOS.

#### 4.3.1. Cuajado inicial.

En la tabla 4.3.1. se presentan los porcentajes medios de cuajado en los años 1991 y 1992, obtenidos a la 5ª semana, en el momento que se realizó el cultivo de óvulos "in vitro" (apartado 3.2.1.2.). En el año 1990 no se expresan los porcentajes de cuajado ya que todos ellos se vieron afectados por una helada. En el apéndice 4.2. quedan reflejadas las temperaturas del mes previo a la floración y de los dos siguientes. En todos los clones la floración en 1990 fue más temprana que en los dos años posteriores, 1991 y 1992, debido a las altas temperaturas del mes de Febrero y el posterior descenso en el mes de Marzo. La temperatura media en el mes de Febrero fue de 11,6 siendo de 10,96 y 12,4 en los meses de Marzo y Abril. En los días siguientes a las polinizaciones las temperaturas mínimas fueron inferior a cero durante varios días.

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

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

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

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

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

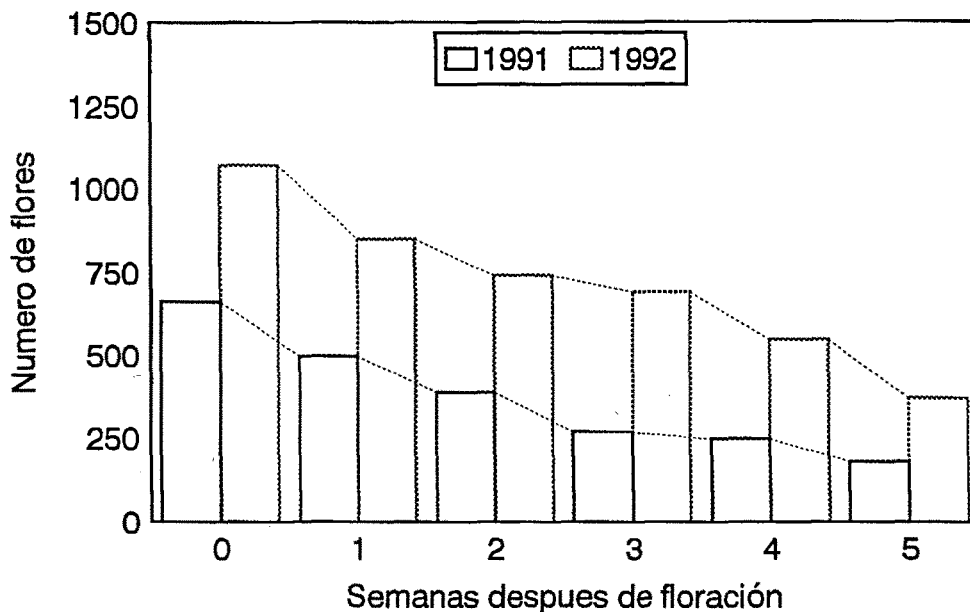


Figura 4.3.1.1.a: Cruzamiento intraespecífico:  
I: Moniquí x Canino

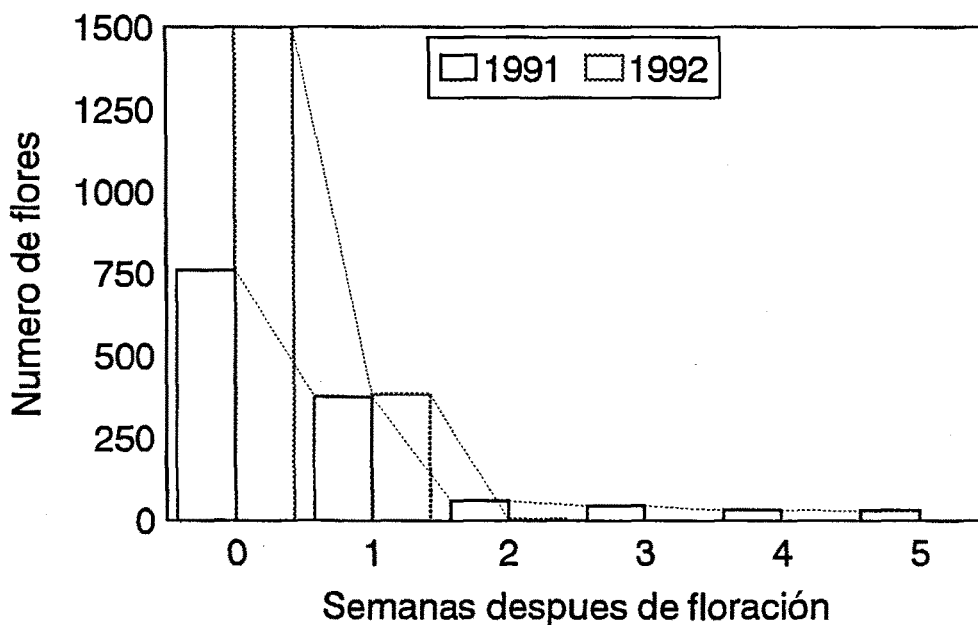


Figura 4.3.1.1.b: Cruzamiento intraespecífico:  
VII: Mirololán 605 x Mirololán B



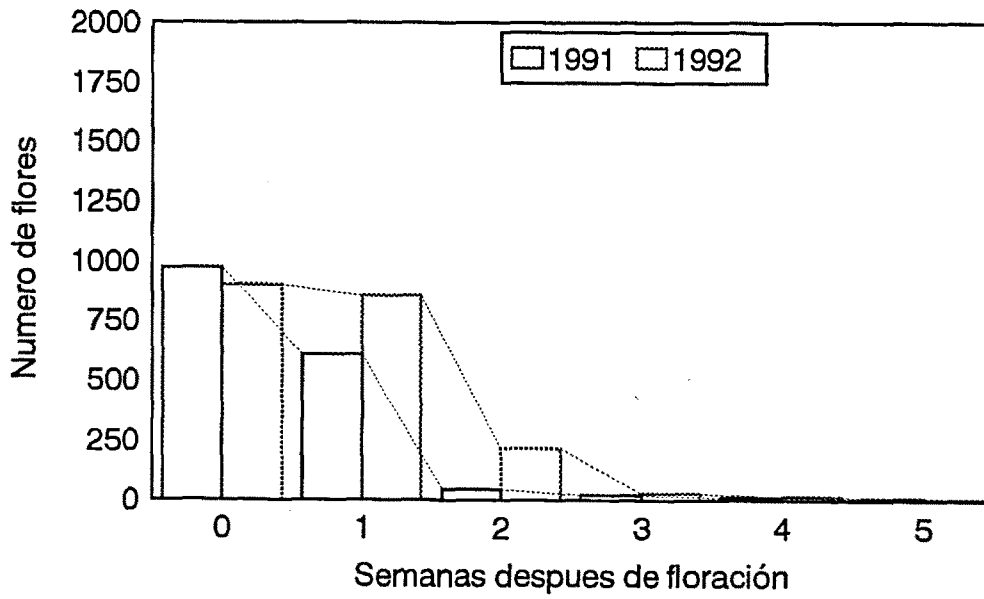


Figura 4.3.1.2.a: Cruzamiento interespecífico VIII: 'GF-31' x *P.tomentosa*

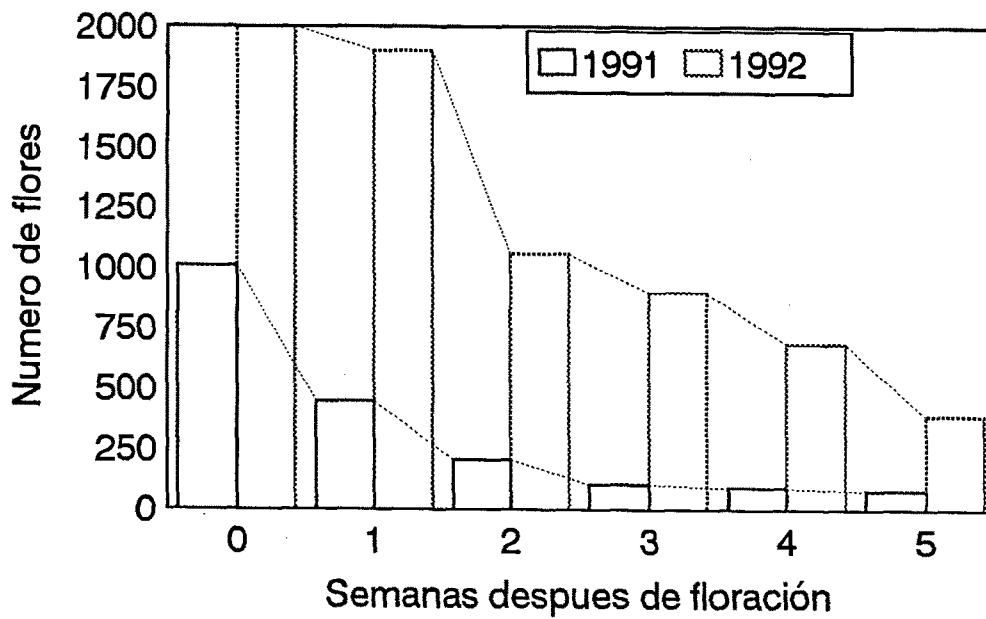


Figura 4.3.1.2.b: Cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.

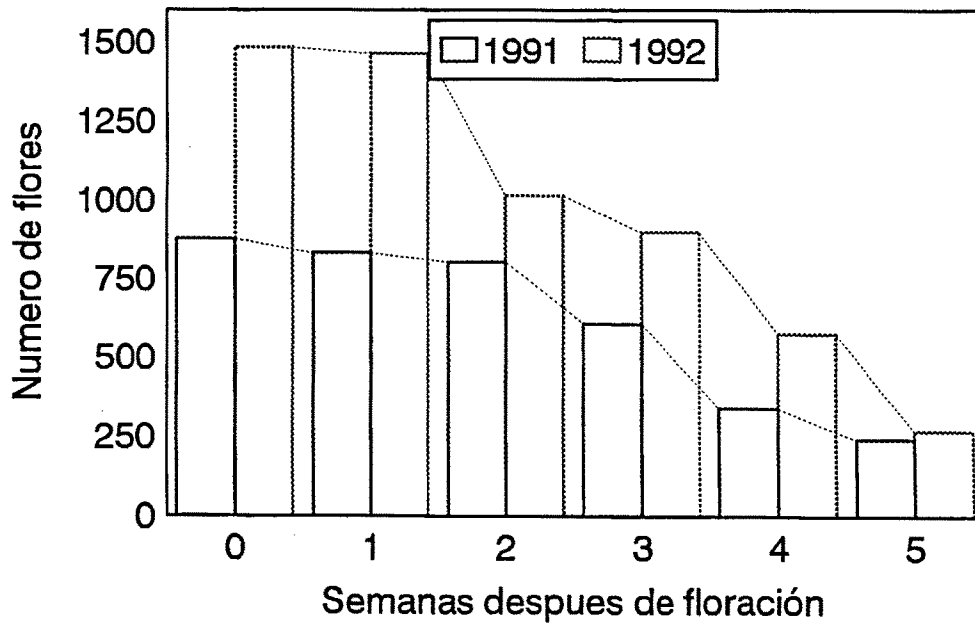


Figura 4.3.1.3.a: Cruzamiento intraespecífico:  
II: Cachirulo x Balones.

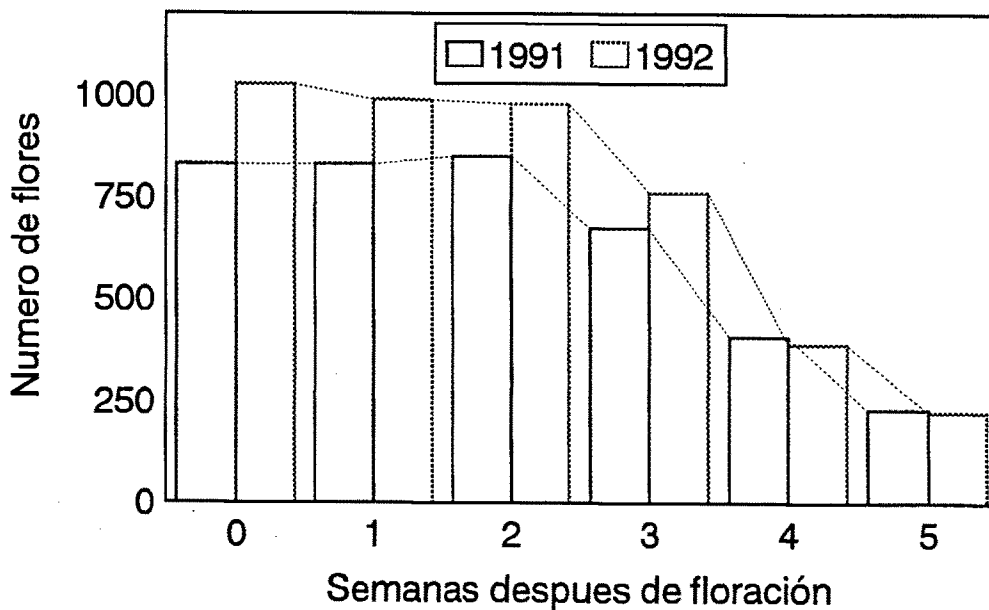


Figura 4.3.1.3.b: Cruzamiento interespecífico:  
III: Cachirulo x *P.tomentosa*

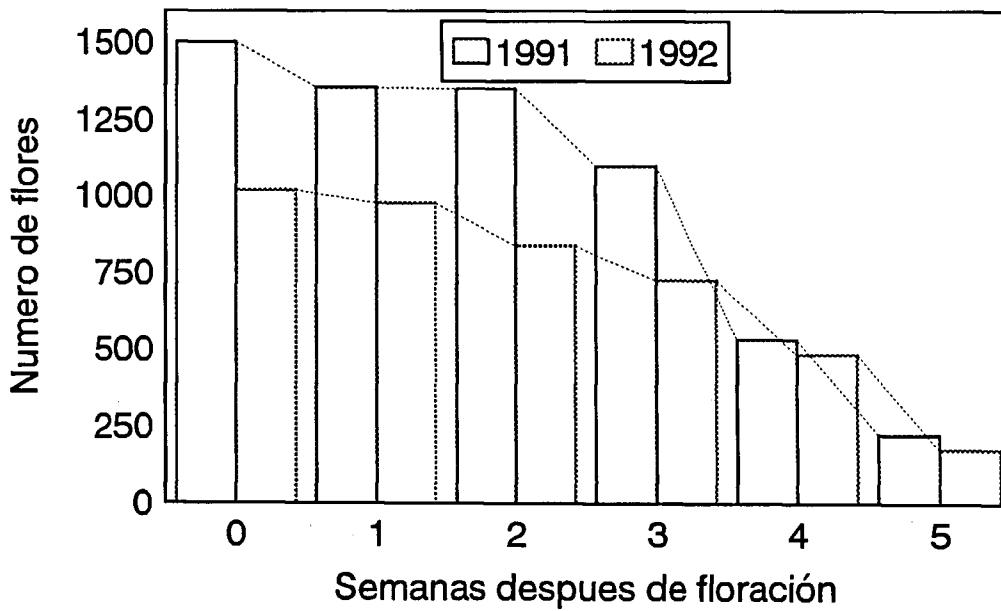


Figura 4.3.1.4.a: Cruzamiento interespecífico:  
V: Cachirulo x Mirobolán 605.

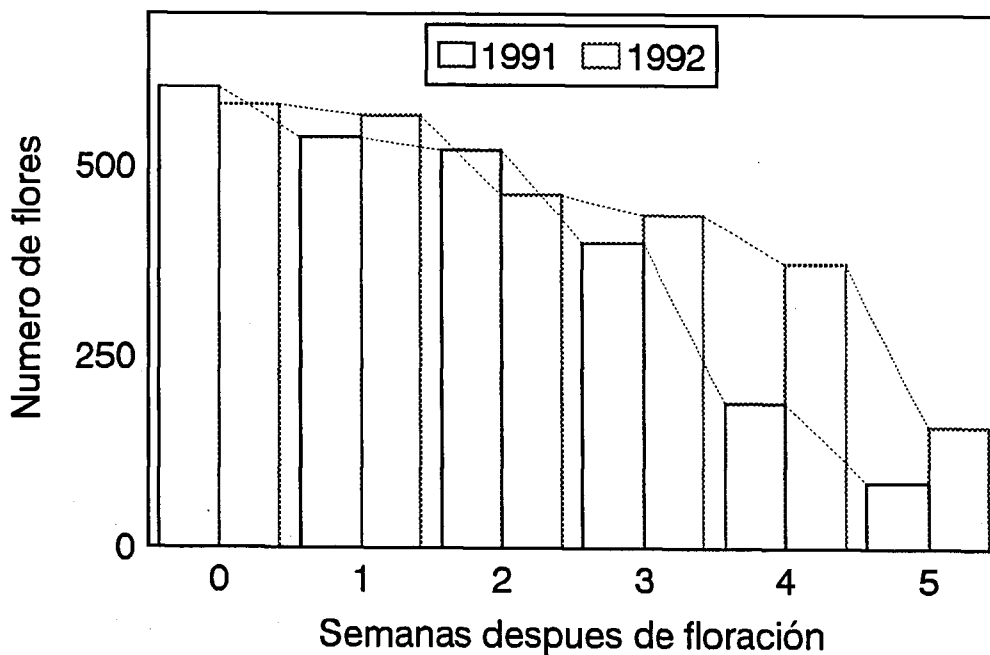


Figura 4.3.1.4.b: Cruzamiento interespecífico:  
VI: Cachirulo x Mirandier 617

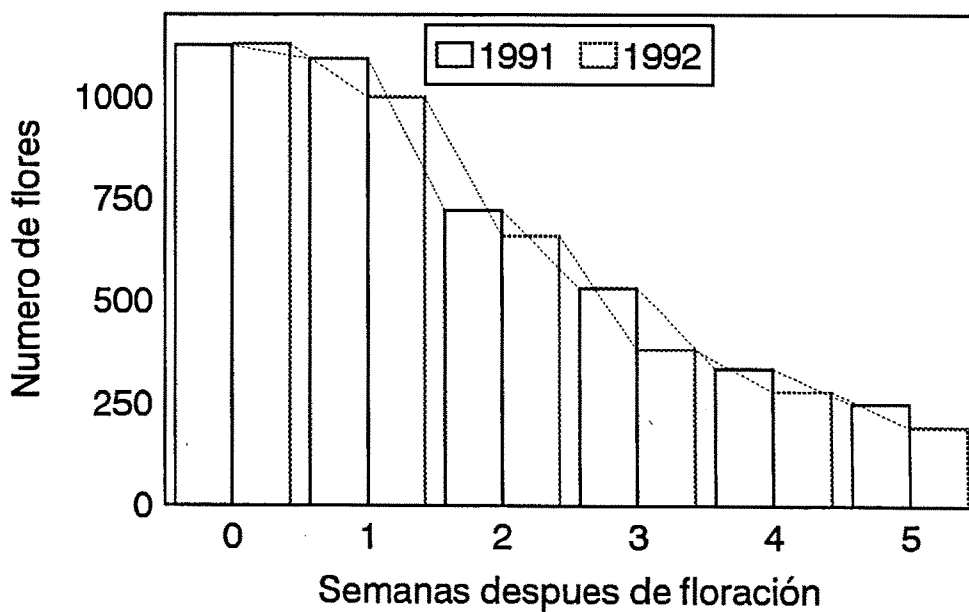


Figura 4.3.1.5.a: Cruzamiento intraespecífico:  
IX: Puebla de Soto x Montizo

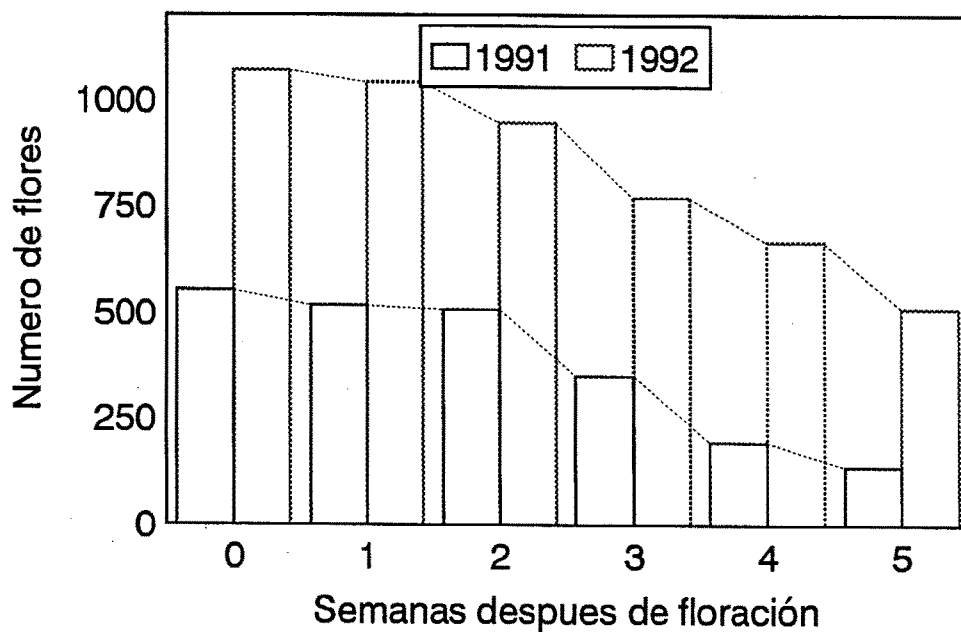


Figura 4.3.1.5.b: Cruzamiento interespecífico:  
X: Reina Claudia x Montizo

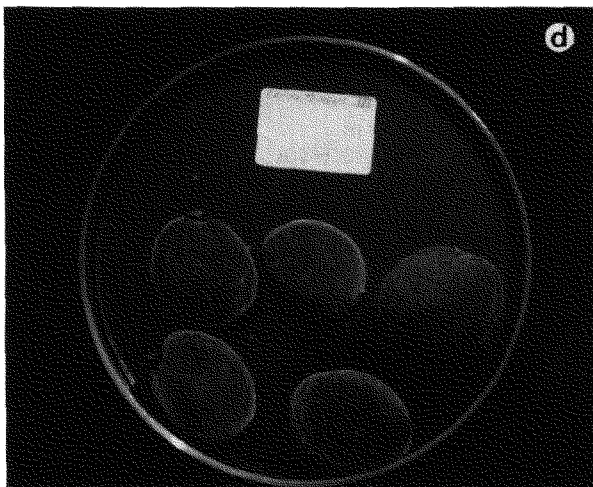
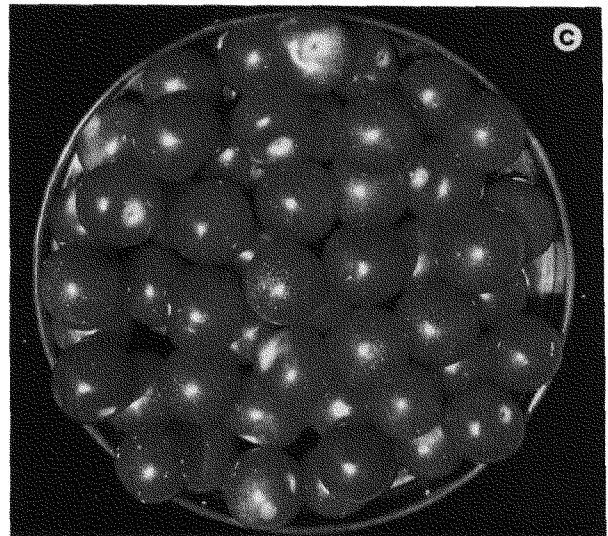
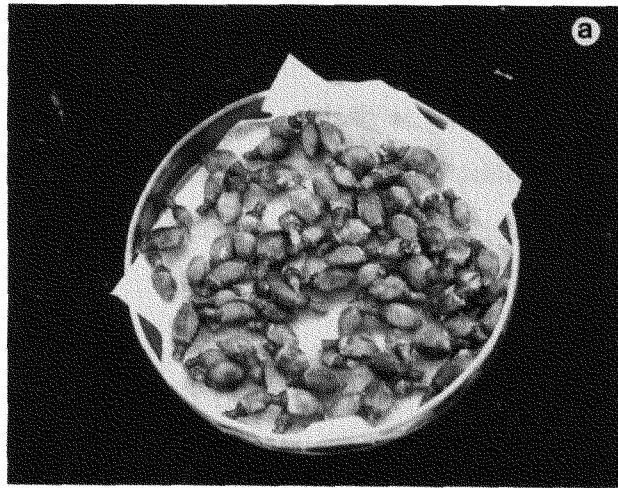
FOTO 4.1.a. Frutos híbridos del cruzamiento intraespecífico 'Cachirulo' x 'Balones' a la 5ª semana de la polinización cuando se llevo a cabo el cultivo "in vitro".

FOTO 4.1.b. Frutos híbridos del cruzamiento interespecífico 'Mirobolan B' x 'Moniqui' a las 12 semanas de la polinización todavía sin madurar.

FOTO 4.1.c. Frutos híbridos del cruzamiento interespecífico 'Mirobolan B' x 'Moniqui' a las 14 semanas de la polinización ya maduros.

FOTO 4.1.d. Frutos híbridos del cruzamiento interespecífico 'Cachirulo' x *P.tomentosa* a las 13 semanas de la polinización.

FOTO 4.1.e. Frutos híbridos del cruzamiento intraespecífico 'Cachirulo' x 'Balones' a las 13 semanas de la polinización.



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

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

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

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

Como puede observarse en el cuadro 4.3.2. el mayor cuajado se obtuvo en el cruzamiento interespecífico IV (Fig. 4.3.2.2.a; Foto 4.1.b.c), mayor que en dos de los cruzamientos intraespecíficos (I, VII; Fig.4.3.2.1.a.b). De los cruzamientos con el híbrido 'Cachirulo' sólo dos produjeron un cuajado: el cruzamiento intraespecífico II (Foto 4.1.d), seguido por el cruzamiento interespecífico III (Foto 4.1.e; Fig. 4.3.2.3.a.b). En este último el porcentaje fue similar al cruzamiento intraespecífico IX (Fig. 4.3.2.5.a), en el cual es inferior al 1%, que a su vez es menor que en el cruzamiento interespecífico X que es del orden del 2% (Fig. 4.3.2.5.b).

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

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

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



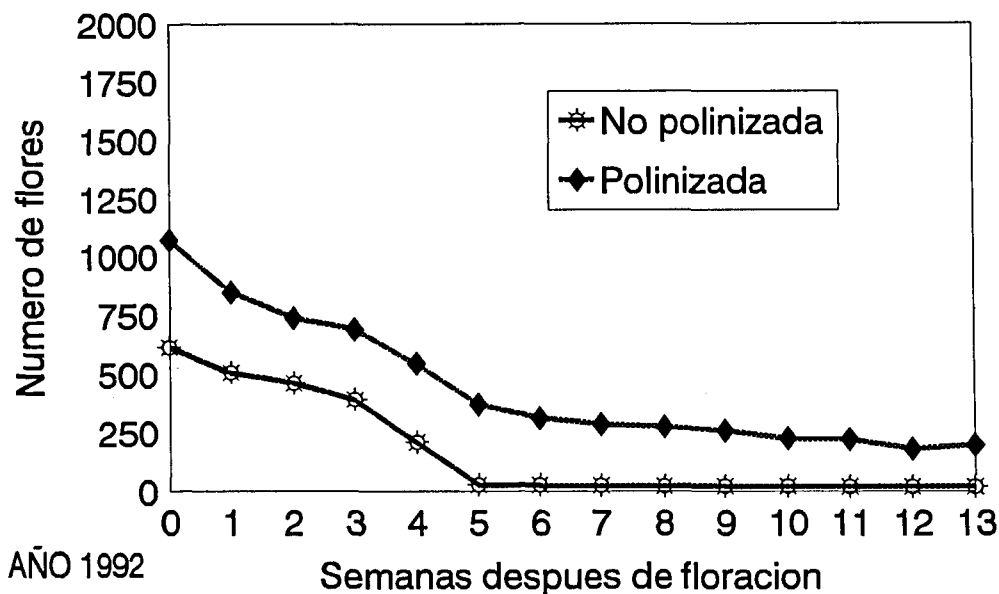


Figura 4.3.2.1.a. Cruzamiento intraespecífico I: Moniquí x Canino

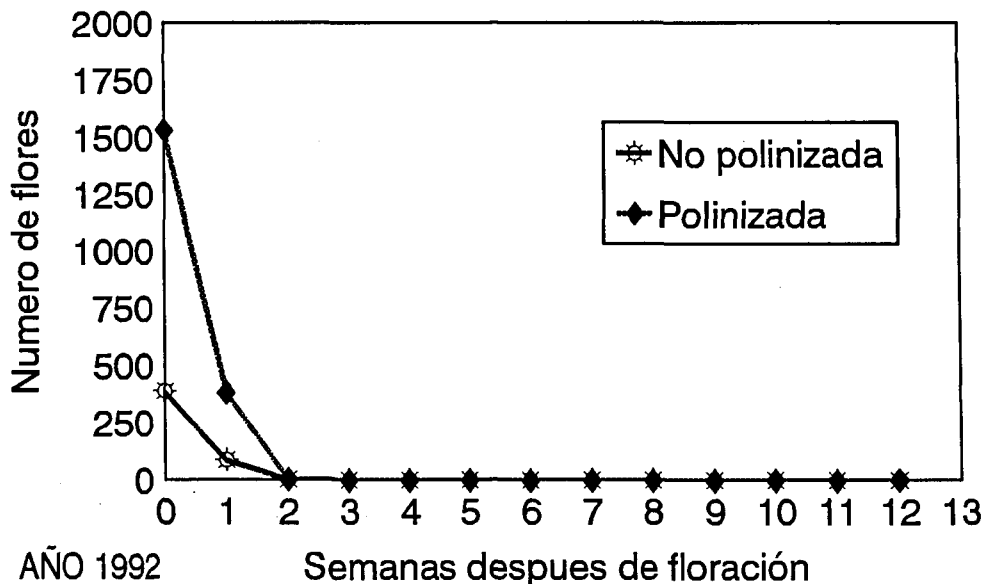


Figura 4.3.2.1.b. Cruzamiento intraespecífico VII: Mirobolán 605 x Mirobolán B

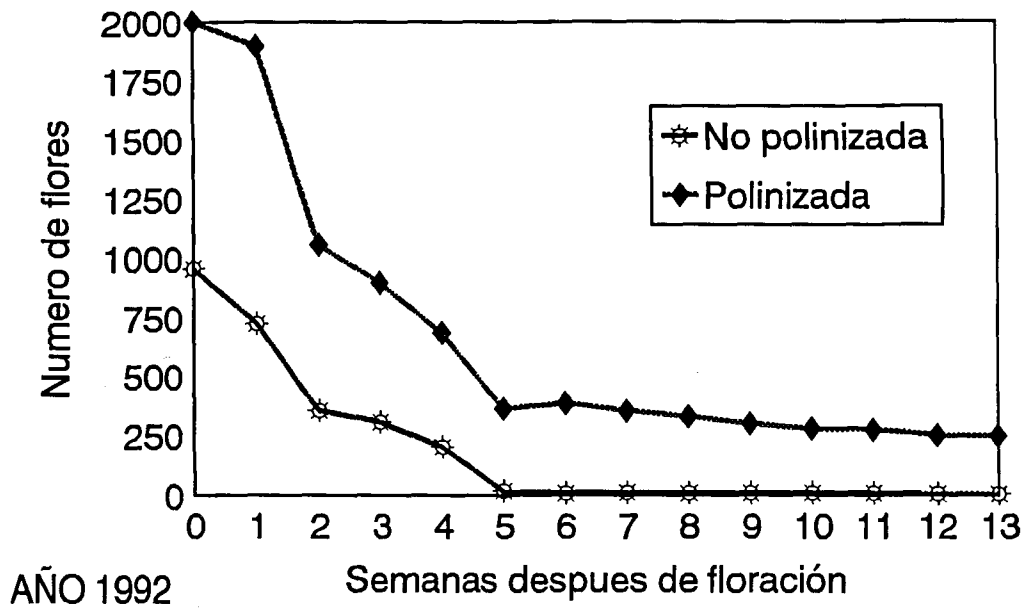


Figura 4.3.2.2.a. Cruzamiento interespecífico IV: Mirobolán B x Moniquí.

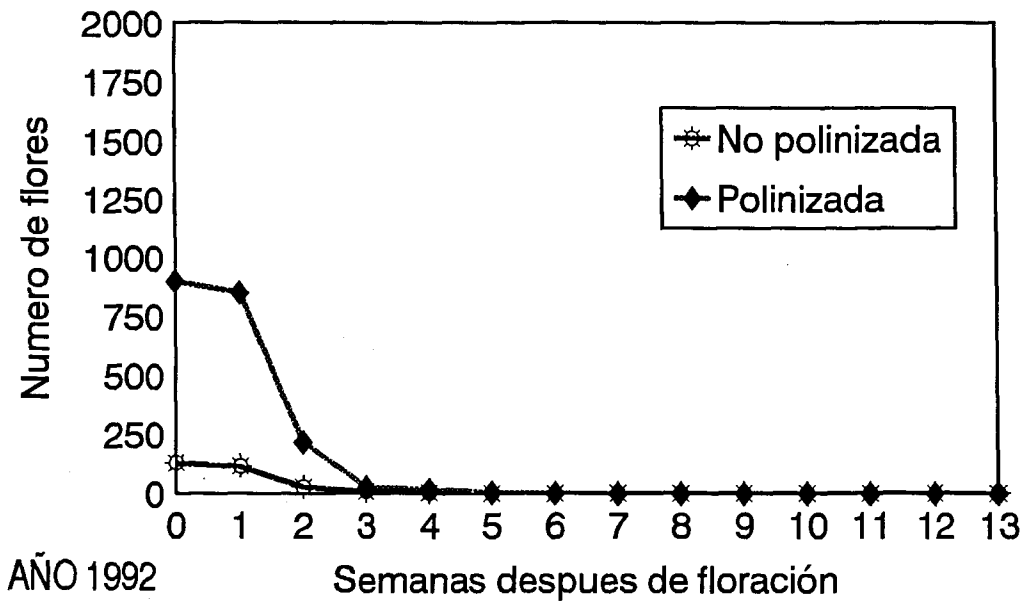


Figura 4.3.2.2.b. Cruzamiento interespecífico VIII: GF-31 x *P.tomentosa*

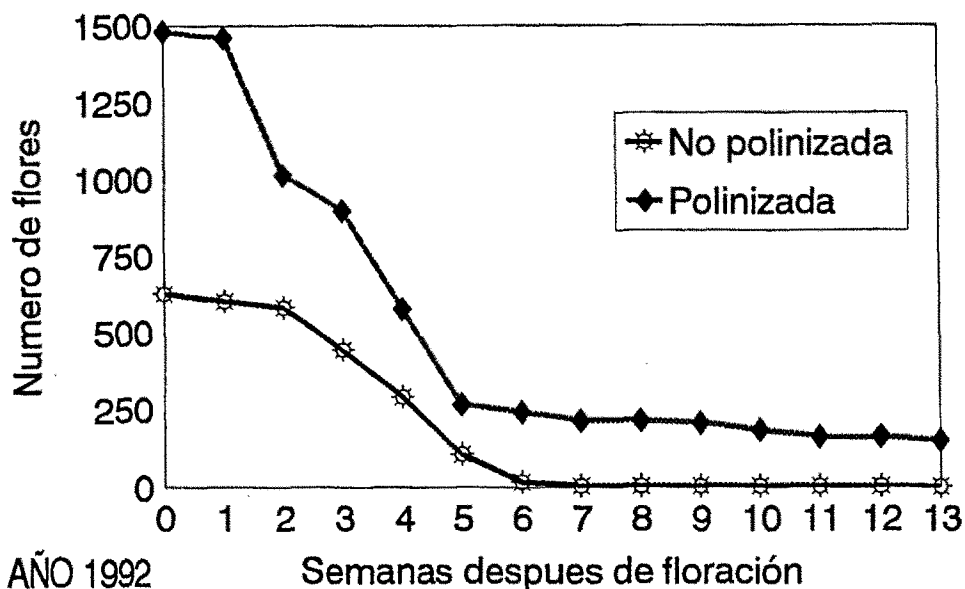


Figura 4.3.2.3.a. Cruzamiento intraespecífico II: Cachirulo x Balones.

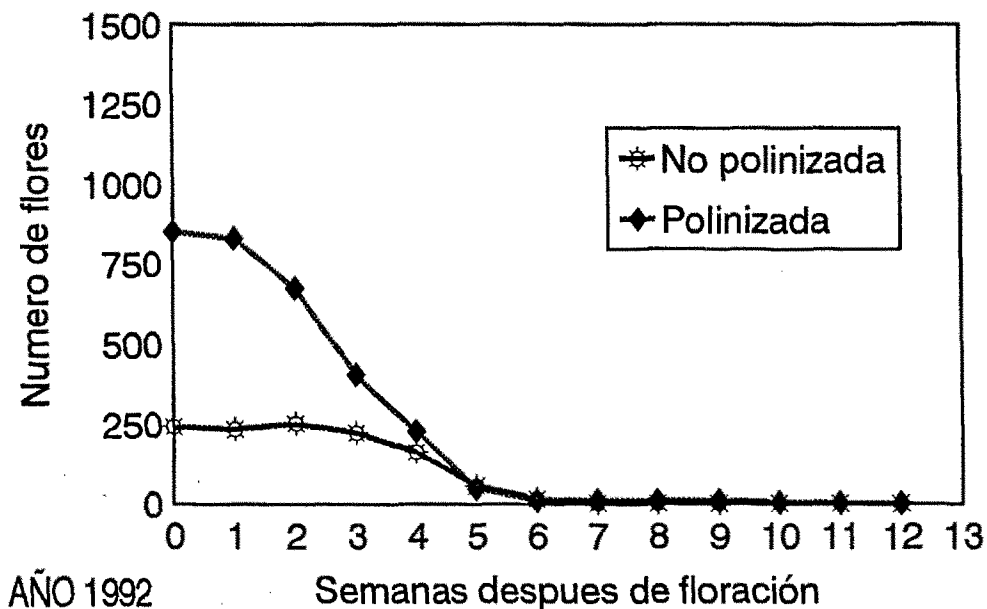


Figura 4.3.2.3.b. Cruzamiento interspecífico III: Cachirulo x *P.tomentosa*

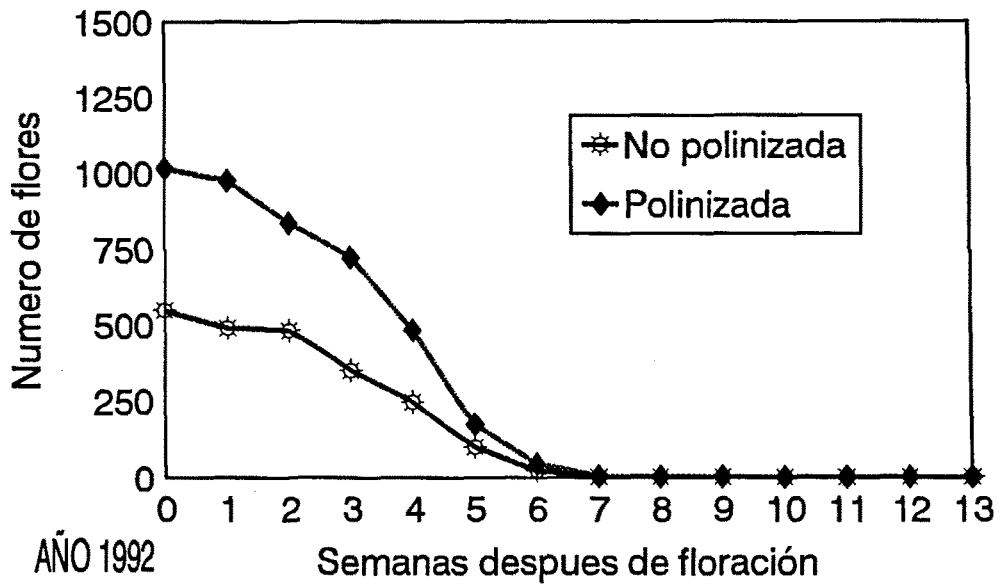


Figura 4.3.2.4.a. Cruzamiento interespecífico V: Cachirulo x Mirololán 605

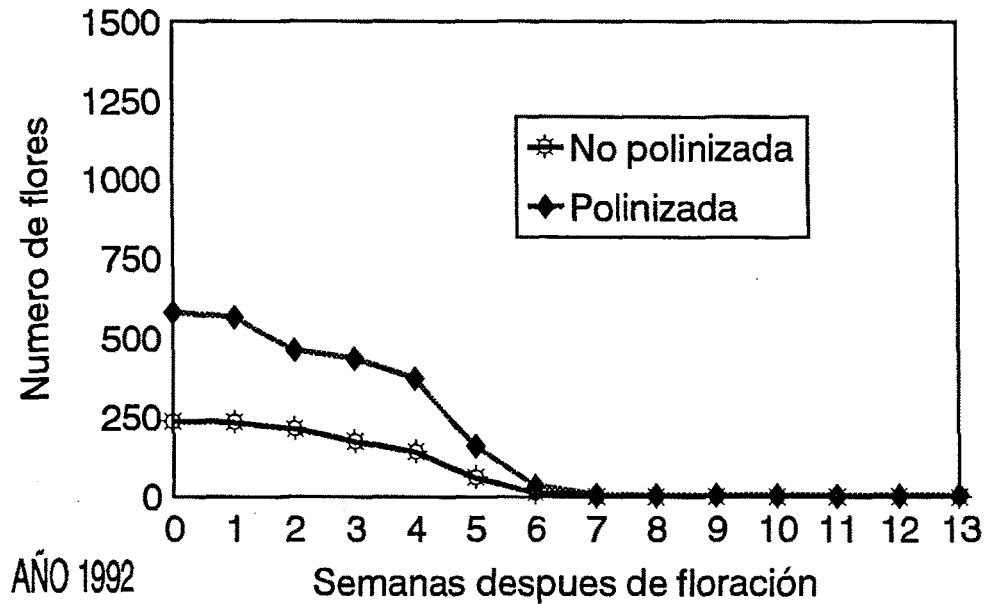


Figura 4.3.2.4.b. Cruzamiento interespecífico VI: Cachirulo x Mirandier 617

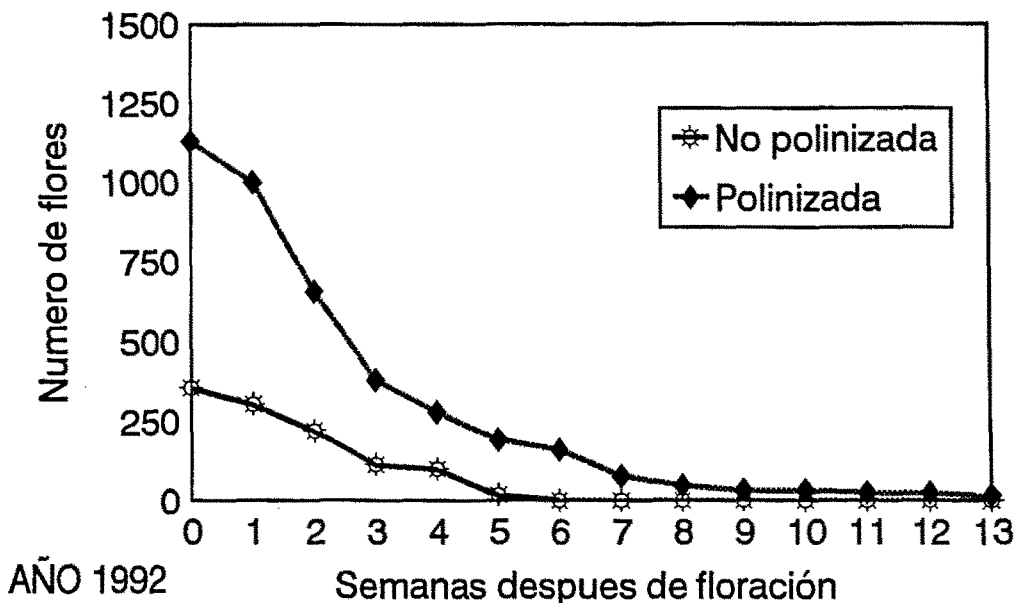


Figura 4.3.2.5.a. Cruzamiento intraespecífico IX : Puebla de Soto x Montizo

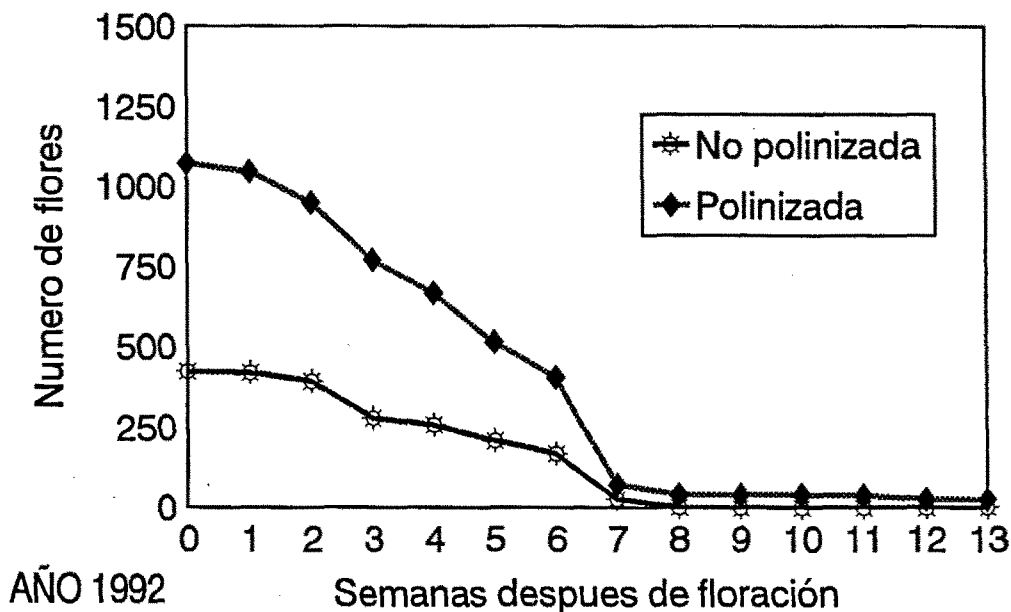


Figura 4.3.2.5.b. Cruzamiento interespecífico X: Reina Claudia x Montizo

FOTO 4.2.a. Frutos de 'Mirobolan 605' a la 3ª semana de la polinización cuando se han caído varios frutos y el cuajado ha descendido considerablemente.

FOTO 4.2.b. Frutos de 'Mirobolan B' a la 3ª semana de la polinización cuando ya se puede ver varios frutos y el cuajado.

FOTO 4.2.c. Frutos híbridos del cruzamiento intraespecífico 'Cachirulo' x 'Balones' a la 5ª semana de la polinización.

FOTO 4.2.d. Frutos híbridos de 'Puebla de Soto' x 'Montizo' en el campo.



#### 4.4. DISCUSION.

##### 4.4.1. Desarrollo del fruto y cuajado inicial.

El desarrollo del fruto en los distintos cruzamientos en los que se ha conseguido un cuajado ha sido el general de todas las drupáceas siguiendo un crecimiento de doble curva sigmoide con tres fases diferenciadas, detallado para diferentes especies de este género, como el albaricoquero (JACKSON y COOMBE; 1966), el ciruelo europeo (JEFFERIES, 1975), el cerezo (TUKEY, 1929, 1933) y el melocotonero (HARROLD, 1935; LILIEN-KIPNIS y LAEVEE, 1971), con la excepción del almendro, en el que la tercera fase no existe (HAWKER y BUTTROSE, 1980). Sin embargo, en variedades de maduración temprana de cerezo y melocotonero, se ha señalado una diferencia con respecto al período II, que en estas variedades es más corto (TUKEY, 1936). Estos mismos resultados se han observado para el ciruelo europeo en variedades de maduración temprana relacionando además este desarrollo del fruto con la abscisión, ya que en el período I se observan tres fases, a,b,c y en la segunda fase b se produce una caída de frutos mayor (JEFFERIES, 1975). Teniendo en cuenta que la maduración del mirabolán es muy temprana (primeros de junio), la excesiva caída producida en las dos primeras semanas, tanto en el cruzamiento IV (intraespecífico) como en el VII (interespecífico), podría relacionarse con este período específico de desarrollo, ya que se asemeja más al ciruelo que al albaricoquero, incluso desde el punto de vista botánico, por lo que la diferencia con el albaricoquero en el momento del desarrollo del fruto radica en este período de desarrollo lento.

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



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

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

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

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

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

#### 4.4.2. Caída en los diferentes cruzamientos.

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

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

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

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

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

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

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

## VI. DISCUSION GENERAL

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

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

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

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

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

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

## **2. Incompatibilidad en el ovario. Estudio del óvulo.**

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

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

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

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

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

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



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

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

### **3. Cultivo "in vitro".**

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

## Discusión General

El cultivo "in vitro" de óvulos ha sido efectivo en unos pocos casos, en particular en gramíneas (WILLIAMS y DE LAUTOUR, 1980). Los mejores resultados se han obtenido por medio del cultivo del embrión aislado (MOK *et al.*, 1978; SHII *et al.*, 1982). El momento más común de aborto del embrión corresponde a su estado globular, fenómeno que se ha observado en muchas especies y que casi siempre es atribuible a una falta de desarrollo del endospermo, ya que deja de nutrir al embrión y se produce el aborto (WHITE y WILLIAMS, 1976; WILLIAMS y WHITE, 1976). Por ello en todos los cruzamientos se mantuvo el tejido materno como sugieren muchos autores (WILLIAMS y DE LATOUR, 1980). Sin embargo, el cultivo "in vitro" de los óvulos en estas condiciones ha fallado en muchas otras especies a pesar de que se encuentra tejido materno, por lo que también se ha atribuido a un desarreglo en la nutrición y a un mal funcionamiento de los tejidos maternos (GRITTON y WIERZBICKA, 1975; RAMSAY y PICKERSGILL, 1986; BINO *et al.*, 1989). Las mayores modificaciones en tejidos cultivados "in vitro" se han descrito para el tejido materno, lo que atribuye una importancia mayor a éste que al tejido diploide del suspensor o el embrión, y al papel que desempeñan en la nutrición. Este tipo de modificaciones se han obtenido en la mayoría de los cruzamientos donde se ha observado la respuesta al medio con la formación de callo (BRUUN, 1991a, 1991b).

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

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

#### 4. Curvas de caída.

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

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

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

## Discusión General

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

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

## VII. CONCLUSIONES

1. El crecimiento del tubo polínico ha mostrado la compatibilidad de la polinización en todos los cruzamientos. En los casos de incompatibilidad interespecífica esta no parece deberse a efectos del locus S sino probablemente a la incongruencia entre especies distintas. La mayor afinidad entre polen y pistilo solamente se manifiesta en una mayor velocidad de germinación y de crecimiento inicial de tubos polínicos, igualándose posteriormente la velocidad en los diferentes tipos de cruzamientos.

2. El aumento de la temperatura ha producido un aumento en la velocidad de los tubos polínicos.

3. La llegada de los tubos polínicos al ovario no ha supuesto la fecundación de los óvulos en los cruzamientos interespecíficos incompatibles, lo que indica que la manifestación de la incompatibilidad interespecífica es en el ovario.

4. El nivel de fecundación depende del estado de la planta madre y especialmente del porcentaje de óvulos bien desarrollados. Ello obliga a una elección cuidadosa de las plantas y a unas técnicas de cultivo adecuadas que aseguren una alta viabilidad de los óvulos con el fin de que los cuajados, especialmente en los cruzamientos más difíciles, resulten en un nivel aceptable de frutos y por ende de semillas en el proceso de selección de patrones.

5. En los cruzamientos compatibles, tanto intraespecíficos como interespecíficos, el desarrollo del óvulo y del embrión sigue el patrón de desarrollo de la planta polinizada, independientemente del polen utilizado.

6. El cultivo de óvulos en los cruzamientos estudiados sólo ha servido para aumentar parcialmente el número de embriones híbridos obtenidos. Ello puede ser debido a que se ha utilizado para todos ellos el mismo medio de cultivo, mientras que se ha observado que cada uno puede presentar unos requisitos más específicos en cuanto al medio de cultivo de óvulos.

7. El aborto de embriones en los cruzamientos interespecíficos se ha producido en el estado globular.

8. La caída de frutos más pronunciada en todos los cruzamiento se ha correspondido con la segunda caída, indicada para todos los frutales de hueso, que es debida a flores no fecundadas.

9. En los cruzamientos V, VI, VIII las barreras de incompatibilidad parecen producirse a nivel postzigótico.

10. Solamente en el cruzamiento interespecífico III se observa que la barrera de incompatibilidad es a nivel postzigótico, por lo que el cultivo de embriones en este cruzamiento sería interesante.

11. El cruzamiento interespecífico IV, entre mirobolán y albaricoquero, se puede considerar compatible y con posibilidades de obtención de un buen cuajado, para una selección posterior de plantas híbridas en un proceso de selección.

12. El nivel de cuajado puede depender más del estado de la planta que de la afinidad del polen utilizado ya que cruzamientos intraespecíficos pueden tener un cuajado mayor que los interespecíficos como se indica en los cruzamientos IX, intraespecíficos y X interespecíficos.

13. La diferencia de comportamiento del pollizo 'Puebla de Soto 101' en relación con el 'Reina Claudía' puede reforzar la hipótesis de considerar a los pollizos como una especie *P. insititia*, independiente de *P. domestica* y no como una subespecie de ésta.