



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**REQUERIMIENTOS REPRODUCTIVOS DE NUEVAS VARIEDADES DE CEREZO
DISPONIBLES EN CHILE UTILIZANDO ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN VARIETAL
Y MICROSCOPIA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción
para otorgar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Vegetal

POR: Valentina Isabella Puchi Vásquez

Profesor Guía: Verónica Guajardo

Marzo 2024

Concepción, Chile

© 2024 Valentina Isabella Puchi Vásquez

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento


REQUERIMIENTOS REPRODUCTIVOS DE NUEVAS VARIEDADES DE CEREZO
DISPONIBLES EN CHILE UTILIZANDO ANÁLISIS DE IDENTIFICACIÓN VARIETAL Y
MICROSCOPIA

Profesor Guía



Verónica Guajardo
Colaboradora académica
Bioquímica, Dra.

Profesor Guía



Rodrigo Jorge Nicolás Hasbún Zaror
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal, Dr.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Variedades de cerezos utilizados y su origen.	20
2.3 Identificación varietal de las variedades de cerezo de interés.	21
2.4 Evaluación de medios de cultivo sólidos para optimizar el desarrollo del tubo polínico en pruebas de germinación de polen de las variedades de interés y determinación del porcentaje de germinación.	26
2.5 Polinizaciones dirigidas en laboratorio (<i>in vitro</i>) y campo (<i>in vivo</i>)	28
2.6 Observación de tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios y embriones	32
2.7 Análisis estadístico	33
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1 Identificación varietal de las variedades de cerezo de interés	35
3.2 Evaluación de medios de cultivo sólidos para optimizar el desarrollo del tubo polínico en pruebas de germinación de polen de las variedades de interés y determinación del porcentaje de germinación	39
3.3 Observación de tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios y embriones	43
3.3.1 Interacción polen-pistilo en condiciones <i>in vitro</i>	43
3.3.2 Interacción polen-pistilo en condiciones <i>in vivo</i>	53
VI. CONCLUSIÓN	64
VI. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: . Secuencias nucleotídicas de los partidores PaConsl y PaConslI, utilizados para la amplificación del primer y segundo intrón del gen S-RNasa en cerezo (Sonneveld et al., 2003).....	23
Tabla 2: Mezcla de reacción para la reacción de PCR para partidores PaConsl. Los reactivos corresponden a los incluidos con la Taq Polimerasa (Brasil) (ThermoFisher, Estados Unidos).	24
Tabla 3: Mezcla de reacción para la reacción de PCR para partidores PaConslI. Los reactivos corresponden a los incluidos con la Taq Polimerasa (Brasil) (ThermoFisher, Estados Unidos).	25
Tabla 44: Tamaños esperados de los productos de PCR al utilizar los partidores consenso PaConsl (PCI) y PaConslI (PCII) (Sonneveld et al., 2003).....	25
Tabla 5: Listado de las variedades analizadas en esta tesis y sus alelos S (Schuster, 2020).	26
Tabla 6: Datos de la recolección de pistilos contando los días desde la polinización en condiciones de laboratorio para los dos ensayos realizados.....	30
Tabla 7: Datos de recolección de pistilos contando los días desde la polinización en condiciones de campo para los dos ensayos realizados.	31

Tabla 8: Alelos obtenidos en comparación con los alelos esperados de cada variedad.	39
Tabla 9. Porcentaje de germinación de cada variedad según medio de cultivo. En color rojo se destacan los porcentajes más bajos y altos de germinación sin considerar los controles de cerezo y duraznero.	41
Tabla 10. Porcentaje de germinación de polen, formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en los cruzamientos de 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' y 'Lapins' × 'Frisco'.	44
Tabla 11. Porcentaje de pistilos con formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en la autopolinización de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección en condiciones <i>in vitro</i>	47
Tabla 12. Porcentaje de germinación de polen, formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en la autopolinización de 'Areko' polinizado al día siguiente de su recolección y emasculación.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Partes de una flor de cerezo. Se utilizó como modelo a una flor de la variedad 'Frisco'. A: Flor madura, la estructura verde en el centro de la flor corresponde al gineceo, órgano femenino de la flor de cerezo, compuesto por el estigma, el estilo y el ovario, B: Androceo, compuesto por el filamento y las anteras que contienen el polen; esta estructura corresponde al órgano masculino en la flor, C: Ovario con dos óvulos, D: Estigma, estructura cubierta por una secreción o exudado, E: Sutura del ovario, F: Flor en estado de globo tardío, momento perfecto para recolección de polen y obtención de pistilos. Fotos: Valentina Puchi..... 20
- Figura 2. Polinización de pistilos en condiciones de laboratorio (*in vitro*) obtenidos de flores en estado de globo tardío recolectadas el día anterior con el fin de esperar la maduración del pistilo. Se utilizó polen fresco que se secó a temperatura ambiente para realizar polinizaciones. A: Se polinizó directamente utilizando los dedos, tocando el estigma del pistilo. B: Se conservó en condiciones de humedad utilizando esponjas. Fotos: Valentina Puchi..... 29
- Figura 3. Amplificación del primer intrón del gen *RNasa-S* con los partidores PaConSI para 22 muestras pertenecientes a 10 variedades de cerezo utilizadas en este estudio. Las muestras con nombre rojo pertenecen a las muestras control. Gel de agarosa al 2,5% corrido a 100 V por 30 minutos. Marcador de peso molecular: 100 bp. 35
- Figura 4. Amplificación del segundo intrón del gen *RNasa-S* con los partidores PaConSII para 22 muestras pertenecientes a 10 variedades utilizadas en este estudio. Las muestras con nombre rojo pertenecen a las muestras control. Gel de agarosa al 1,5% corrido a 100 V por 20 minutos. Marcador de peso molecular: 1 Kb. 37

Figura 5. (A) Crecimiento de tubo polínico de 'Frisco' en estilo de 'Lapins' tres días después de ser polinizado (B) Crecimiento de tubo polínico de 'Frisco' en estilo de 'Frisco' tres días después de ser polinizado (C) Crecimiento de tubo polínico de 'Areko' en estilo de 'Areko' seis días después de ser polinizado (D) Primer día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección (E) Segundo día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección (F) Primer día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado al día siguiente de su recolección (G) Tubos polínicos de 'Frisco' entrando en ovario de 'Frisco' hasta alcanzar el óvulo al tercer día desde la polinización (H) Comienzo de la degeneración del óvulo mostrada por la deposición de calosa en la chalaza (I) óvulo completamente cubierto por deposición de calosa..... 46

Figura 6. Pistilos en condiciones de campo, colectados al día 14 después de la polinización. Se puede visualizar los distintos crecimientos de los ovarios. (A) 'Frisco' x 'Lapins' (B) 'Lapins' x 'Lapins' (C) 'Areko' x 'Polka' (D) 'Areko' x 'Lapins'. (F) Ovario de 'Frisco' x Frisco' con un embrión de 14 días (G) Saco embrionario con embrión de 14 días..... 55

Figura 7. (A) Pistilo de 'Areko' polinizado con polen de 'Polka' al tercer día (B) Ovario de 'Areko' con un óvulo primario (a) y óvulo secundario degradado (b) al tercer día. (C) Ovario de 'Areko' con óvulo degradado (día 14) (D)) Ovario de 'Areko' con óvulo fecundado (día 14). (E) Comparación de óvulo fecundado (a) con el óvulo degradado al día cinco bajo luz UV. (F) Saco embrionario con embrión de cinco días (G) (óvulo fecundado 'Areko' x 'Lapins', a: micropilo, b: tegumentos, c: embrión, d: saco embrionario (H) Comparación de óvulo fecundado (a) con el óvulo degradado al día cinco bajo luz natural (I) Saco embrionario de ovulo degradado (J) Embrión de 8 días creciendo y alargándose por el saco embrionario. 61

RESUMEN

Entender el sistema de autoincompatibilidad gametofítica que previene la autopolinización en cerezos, controlado por el locus multialelo llamado el S-locus, el cual impide la autopolinización en cerezos, es un elemento esencial para la continua optimización de los huertos comerciales de cerezos en Chile. La amplificación de los alelos S se utiliza como herramienta para confirmar la identidad varietal en cultivares como 'Frisco', 'Lapins' y 'Areko'. Los procedimientos visuales, como la tinción de calosa con azul de anilina, son esenciales para la investigación del comportamiento del tubo polínico en el pistilo, particularmente en situaciones de compatibilidad, semicompatibilidad e incompatibilidad entre las variedades de cerezos.

'Frisco', como indica su criador, se comporta, en la fase del programica, tan compatible como 'Lapins'. La influencia del boro en la germinación del polen y en su elongación juega un papel crucial en estos procesos fisiológicos. Se sugiere que se dé énfasis a la investigación de la interacción polen-pistilo en condiciones de campo (*in vivo*) como un área de investigación futura, ya que el pistilo se encuentra en un entorno más representativo para el desarrollo embrionario.

ABSTRACT

Understanding the gametophytic self-incompatibility system that prevents self-pollination in cherry, controlled by the multiallelic locus called the S-locus, which prevents self-pollination in cherry, is an essential element for the continued optimization of commercial cherry orchards in Chile. S-allele amplification is used as a tool to confirm varietal identity in cultivars such as 'Frisco', 'Lapins' and 'Areko'. Visual procedures, such as callose staining with aniline blue, are essential for the investigation of pollen tube behavior in the pistil, particularly in situations of compatibility, semi-compatibility and incompatibility between cherry varieties.

'Frisco', as its breeder indicates, behaves, in the program phase, as self-compatible as 'Lapins'. The influence of boron on pollen germination and elongation plays a crucial role in these physiological processes. It is suggested that emphasis be given to the investigation of pollen-pistil interaction under field conditions (*in vivo*) as an area of future research, since the pistil is in a more representative environment for embryonic development.

I. INTRODUCCIÓN

Chile se posiciona como el principal productor y exportador de cerezas en el hemisferio sur, representando un impresionante 97% del total despachado en la región, según datos de IQconsulting (2023). En contraste, Argentina sigue en importancia con una participación del 1,1% durante la temporada 2022-2023. Durante este periodo, Chile experimentó un notable crecimiento en la producción de cerezas, alcanzando las 415.398 toneladas, lo que representa un incremento del 17% en comparación con la temporada anterior. Al desglosar las cifras por regiones, el Maule se destaca como líder en las exportaciones de cereza chilena, contribuyendo con 177 mil toneladas, es decir, un impresionante 43% del total exportado por el país. A continuación, la región de O'Higgins sigue de cerca, aportando un significativo 40% del total, equivalente a 167 mil toneladas (IQconsulting, 2023). Pese a las dificultades ocasionadas hace unos años por la pandemia, Chile proyecta duplicar la producción actual dentro de tres años, por lo que la producción podría llegar a 830.000 toneladas en la temporada 2026-2027 (IQconsulting, 2022). Debido a lo anterior, el cerezo es una especie de estudio de gran interés para nuestro país. En Chile, las principales variedades de cerezo plantadas corresponden a 'Lapins', 'Santina', 'Regina', 'Bing', 'Sweetheart', 'Royal Dawn', 'Skeena', 'Kordia', 'Rainier' y 'Stella' y se cultivan desde Ovalle hasta Chile Chico, siendo 'Lapins', 'Santina' y 'Regina' las

principales variedades producidas y exportadas, representando un 78% de las exportaciones totales (IQconsulting, 2023).

El cerezo (*Prunus avium* L.) pertenece a la familia *Rosaceae*, género *Prunus* y subgénero *Cerasus*, y corresponde a una especie diploide con un número cromosómico haploide de 8 ($x = 8$) y el genoma diploide organizado en $2n = 2x = 16$ cromosomas (Iezzoni *et al.*, 2017). En las especies del género *Prunus*, las flores tienen un gineceo unicarpelar, con cinco pétalos blancos, un pistilo y un ovario con dos óvulos, de los cuales uno es fecundado para convertirse en semilla y el segundo se degrada (Guerra *et al.*, 2011). En cerezo, los granos de polen aterrizan en el estigma, se hidratan y germinan produciendo un tubo polínico, los cuales se han observado en el ovario al tercer día después de la polinización (Radičević *et al.*, 2016).

Se ha realizado una gran cantidad de estudios para comprender cómo ocurre la germinación del polen, cómo se desarrolla su tubo polínico y los factores que podrían afectar este desarrollo. Dordevic *et al.* (2022) estudiaron a través de microscopía de fluorescencia el comportamiento del polen de ciruelo europeo (*P. domestica* L.). En este estudio, después de que el polen fuese almacenado a distintas temperaturas (4°C, -20°C, -80°C y -196°C), los autores observaron el crecimiento *in vivo* de los tubos polínicos dentro de los pistilos de ciruelos a distintos días desde la polinización, todo esto en

condiciones de laboratorio. Este procedimiento se realizó utilizando la tinción de la calosa (glucosa unida por enlaces β -1,3 con algunas ramas β -1,6), un polisacárido presente en paredes celulares especializadas y estructuras asociadas a la pared celular, que participa en el desarrollo del polen y en el crecimiento del tubo polínico (Cao *et al.*, 2022). La tinción de la calosa se realizó con *aniline blue* dando como resultado la clara observación de los tubos polínicos llegando a la base del estilo y entrando en el ovario. Estudios similares han sido realizados por Guerra *et al.* (2010) y Guerra *et al.* (2011), quienes trabajaron con ciruelo japonés (*P. salicina*); Hedhly *et al.* (2005) y Hedhly *et al.* (2007) en cerezo y Herrera *et al.* (2018) en damasco (*P. armeniaca* L.). Todos los autores utilizaron la misma técnica de tinción de calosa con *aniline blue* para la observación de tubos polínicos, demostrando que es un buen método para lograr estudiar, a través de microscopía de fluorescencia, el comportamiento de los tubos polínicos dentro del estilo.

Aunque Chile lidera el mercado mundial de la cereza en el hemisferio sur, sigue manteniendo desafíos al cultivar este frutal, ya que la fertilidad del cerezo, así como de otros miembros del género *Prunus* como el ciruelo, está limitada por un sistema de autoincompatibilidad gametofítica (Guerra *et al.*, 2015), controlado por un *locus* multialélico llamado *locus S* que impide la autopolinización. Hasta la fecha se conocen 22 alelos pertenecientes al *locus S*, que corresponden a *S*₁, *S*₂, *S*₃, *S*₄, *S*₅, *S*₆, *S*₇, *S*₉, *S*₁₀, *S*₁₂, *S*₁₃, *S*₁₄, *S*₁₆, *S*₁₇, *S*₁₈, *S*₁₉, *S*₂₁, *S*₂₂, *S*₂₄, *S*₂₇, *S*₃₀ y *S*₃₇ (Schuster, 2020), y como el

cerezo es diploide, cada variedad presenta una combinación de dos alelos S , como S_1S_4 , S_2S_6 , por ejemplo. La reacción de autoincompatibilidad ocurre cuando el mismo “alelo S ” se expresa tanto en el polen como en el pistilo, lo que conduce a que se detenga el crecimiento del tubo polínico. Esto sucede por la interacción de una ribonucleasa en el estilo con una proteína F-box (SFB) del polen, ambos pertenecientes al alelo S . Las variedades de cerezo son en su mayoría autoincompatibles (Radunic *et al.*, 2017). En el año 2020 se definieron 63 grupos de incompatibilidad, que agrupan 1.483 variedades autoincompatibles disponibles a nivel mundial y que no pueden ser polinizadas con su propio polen ni entre las variedades pertenecientes a un mismo grupo (Schuster, 2020). Un ejemplo es la variedad de cerezo ‘Areko’, que posee los alelos S_1S_3 , catalogada como autoincompatible, por lo que al ser polinizada con su propio polen no logra fecundar a su propio óvulo, es decir, no se logra completar la fase progámica (adhesión del polen, hidratación, germinación, producción de un tubo polínico y fecundación del óvulo) donde ocurre el proceso de rechazo o aceptación. En este caso, el polen incompatible tiene la capacidad de adherirse al estigma, hidratarse, germinar y crecer su tubo polínico por el estilo, pero no logra crecer hasta el final de éste ya que es detenido por el sistema de incompatibilidad gametofítica (Radunic *et al.*, 2017, Dordevic *et al.*, 2022). Debido a lo anterior, se favorece la polinización cruzada entre variedades, por lo que, en los huertos comerciales es necesario plantar variedades que coincidan en las fechas de su floración y en su configuración de alelos S , es decir, que pertenezcan a grupos de incompatibilidad

distintos y que estén intercalados en el mismo huerto para asegurar la cuaja y producción de fruta (Guerra *et al.*, 2011).

Existen también variedades de cerezo autofértiles o autocompatibles, entre ellas 'Lapins', una variedad antigua proveniente de Estados Unidos, con alelos S_1S_4 , que ha sido ampliamente plantada en Chile y a la que se le considera un dador universal de polen (Lane, 1984). Por otra parte, 'Frisco' es una variedad nueva en Chile que madura en una fecha similar a la de 'Lapins', pero sería interesante para el mercado oriental porque la forma de la fruta es distinta a la de 'Lapins', lo que se ha convertido en una característica que sería de gran interés para el mercado. 'Frisco' ha sido descrita por su obtentor como una variedad autocompatible, con alelos S_1S_4 al igual que Lapins; sin embargo, se recomienda utilizar un polinizante para asegurar la producción de fruta ya que se comporta como una variedad "semicompatible", es decir, que tendría problemas para producir fruta utilizando su propio polen, una condición que no ha sido estudiada en detalle para esta variedad (Lorena Pinto, ANA Chile, comunicación personal).

La germinación del polen, la transferencia del polen al estigma, la interacción polen-pistilo, la fecundación de al menos un óvulo y el desarrollo exitoso del embrión son factores que intervienen en el proceso reproductivo que lleva a la fructificación final (Guerra *et al.*, 2011). Tomando en cuenta que para cumplir con los estándares de calidad

exigidos por los grandes compradores a nivel mundial de cereza no es suficiente sólo el desarrollo de una semilla, si no que el resultado final está influenciado por la fructificación, la polinización, el desarrollo del tubo polínico entre variedades tanto compatibles como incompatibles y el desarrollo del embrión, ya que son etapas sumamente importantes de conocer en mayor profundidad para las nuevas variedades de cerezo disponibles en Chile.

Según lo expuesto previamente, en esta tesis se planteó las siguientes preguntas: ¿Por qué se considera a 'Frisco' como una variedad autocompatible, pero a la vez se comporta como una parcialmente compatible? ¿Cuál es el efecto del polen utilizado sobre la polinización de 'Frisco'? ¿Hay diferencias si pistilos de 'Frisco' son polinizados con polen de 'Frisco' o con polen de 'Lapins', una variedad utilizada como dador universal de polen? ¿Cómo funciona la polinización de pistilos de 'Lapins' con polen de 'Frisco' y de 'Lapins'? Si 'Frisco' presenta una baja producción de fruta porque el problema proviene desde el polen, se espera que la polinización de pistilos de 'Frisco' con polen de 'Frisco' no sea eficiente, es decir, exista un porcentaje de pistilos donde el tubo polínico no llegue al ovario y no exista fecundación. Por otra parte, si polinizamos pistilos de 'Areko', una variedad autoincompatible, con su propio polen, ¿cuál sería el comportamiento del tubo polínico durante la elongación dentro del estilo? ¿Cuál es la diferencia en el

comportamiento del tubo polínico al polinizar un pistilo de 'Areko' con polen de variedades incompatible, parcialmente compatible y compatible con 'Areko'?

Este trabajo tiene como objetivo determinar el comportamiento y los requerimientos reproductivos de variedades de cerezo utilizadas en Chile, a través de análisis de identificación varietal y microscopía. En este estudio, se utiliza la amplificación de alelos S para confirmar que las variedades corresponden a lo esperado para el posterior estudio de las características morfológicas y biológicas de los pistilos de 'Frisco', 'Lapins' y 'Areko', el estado de germinación del polen y el porcentaje de germinación de polen de las variedades 'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', 'Frisco', 'Epic 16', 'Areko' y 'Pacific Red', otras variedades nuevas de cerezo disponibles en Chile, almacenado a -20°C durante 12 meses.

HIPOTESIS:

La germinación del polen en medio de cultivo *in vitro* se ve favorecida por la presencia de ácido bórico. Además, se postula que la eficiencia de polinización de pistilos de la variedad 'Frisco' experimenta variaciones significativas al utilizar polen de 'Frisco' en comparación con polen de 'Lapins'. Asimismo, se sostiene que existen diferencias notables en el comportamiento del tubo polínico al polinizar pistilos de 'Areko', tanto con polen propio como con polen de otras variedades.

OBJETIVO GENERAL:

Analizar en condiciones *in vivo* e *in vitro* la biología reproductiva y la interacción polen-pistilo de las variedades de cerezo 'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', 'Frisco', 'Epic 16', 'Areko', 'Pacific Red', 'Lapins' y 'Polka', con un enfoque en la germinación del polen, la interacción polen-pistilo y el comportamiento del tubo polínico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Identificar los alelos S de las variedades 'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', 'Frisco', 'Epic 16', 'Areko', 'Pacific Red', 'Lapins' y 'Polka'

2. Evaluar la germinación del polen de 'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', Frisco', 'Epic 16', 'Areko' y 'Pacific Red' almacenados a -20°C por un año en distintos medios de cultivo

3. Investigar la interacción polen-pistilo en condiciones de laboratorio (*in vitro*) para comprender el comportamiento de 'Frisco' y 'Areko', incluyendo su capacidad de autopolinización y polinización cruzada con 'Lapins' y 'Polka'

4. Investigar la interacción polen-pistilo en condiciones de campo (*in vivo*) para comprender el comportamiento de 'Frisco' y 'Areko', incluyendo su capacidad de autopolinización y polinización cruzada 'Lapins' y 'Polka'.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Variedades de cerezos utilizados y su origen.

La recolección de flores frescas para la obtención de pistilos y polen se realizó en la Parcela #83, El Tambo, San Vicente de Tagua Tagua, Región de O'Higgins. Se seleccionó cuatro variedades de cerezo, 'Frisco' (semicompatible, alelos S_1S_4), 'Lapins' (autocompatible, alelos S_1S_4), 'Areko' (autoincompatible, S_1S_3) y 'Polka' (autoincompatible, alelos S_6S_9) (Schuster, 2020). Se recolectaron flores cerradas en fase de globo tardío (Figura 1f) y fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.



Figura 1. Partes de una flor de cerezo. Se utilizó como modelo a una flor de la variedad 'Frisco'. A: Flor madura, la estructura verde en el centro de la flor corresponde al gineceo, órgano femenino de la flor de cerezo, compuesto por el estigma, el estilo y el ovario, B: Androceo, compuesto por el filamento y las anteras que contienen el polen; esta

estructura corresponde al órgano masculino en la flor, C: Ovario con dos óvulos, D: Estigma, estructura cubierta por una secreción o exudado, E: Sutura del ovario, F: Flor en estado de globo tardío, momento perfecto para recolección de polen y obtención de pistilos. Fotos: Valentina Puchi.

2.2 Recolección y almacenamiento de anteras.

En el laboratorio, se quitaron las anteras de flores de las distintas variedades en estudio frotando las flores de cada variedad por separado contra una rejilla fina y se dejaron secar sobre un trozo de vidrio durante 24 horas a 23°C. El polen se colectó en un tubo de 2 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.3 Identificación varietal de las variedades de cerezo de interés.

Para confirmar que las plantas que se utilizarían en el desarrollo de esta tesis correspondían a las variedades de interés, se realizó extracción de ADN genómico a partir de hojas jóvenes obtenidas de los árboles desde donde se colectaron flores para ser utilizadas en las polinizaciones dirigidas en laboratorio y campo y también se realizó extracción de ADN genómico desde polen a utilizarse en la evaluación de medios de cultivo sólidos. Para realizar las extracciones de ADN se utilizó el NucleoSpin Plant II Mini kit (Macherey-Nagel, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la extracción, el ADN fue cuantificado y se evaluó su calidad utilizando un espectrofotómetro

(Tecan Tradind AG, Suiza). A partir de cada ADN stock se preparó una dilución a una concentración de 0,4 ng/ul, la que se utilizó para todas las reacciones de PCR. Para confirmar que las muestras presentaban los alelos de tamaños esperados, se utilizaron muestras analizadas previamente en el laboratorio como controles.

Para realizar las reacciones de PCR para la confirmación de la identidad de las variedades de interés, se utilizaron reactivos ThermoFisher (Estados Unidos) y los partidores PaConsl y PaConslI. Los partidores PaConsl amplifican el primer intrón del gen *RNasa-S* y los partidores PaConslI amplifican el segundo intrón del gen *RNasa-S* (Figura 2; Tabla 1) (Sonneveld *et al.*, 2001 y 2003). Ambos marcadores son altamente polimórficos y codominantes, lo que significa que pueden distinguir entre diferentes alelos en un *locus* concreto y pueden ser utilizados para inferir la heterocigosidad en poblaciones de plantas.

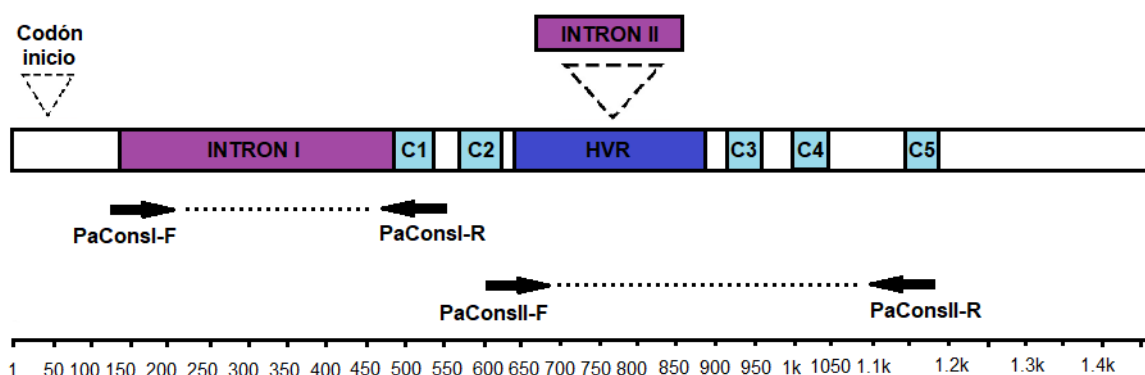


Figura 2. Alelo S3 de gen *RNasa-S* con ubicaciones de intrones y posición de los partidores PaConsl y PaConslI (Sonneveld *et al.*, 2001 y 2003).

Tabla 1: . Secuencias nucleotídicas de los partidores PaConsl y PaConslI, utilizados para la amplificación del primer y segundo intrón del gen S-RNasa en cerezo (Sonneveld et al., 2003).

Partidor ^a	Secuencia 5' → 3'	Temp. de alineamiento
PaConsl-F	(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C	54°C
PaConsl-R	CAT G(A/G)A TGG TGA A(A/G)T (T/A)TT GTA ATG G	
PaConslI-F	G GCC AAG TAA TTA TTC AAA CC	58°C
PaConslI-R	CA(T/A) AAC AAA (A/G)TA CCA CTT CAT GTA AC	

^a F = forward, R = reverse

Para amplificar el primer intrón del gen *RNasa-S*, utilizando los partidores PaConsl (Tabla 1), se utilizó una mezcla de reacción de PCR según lo indicado en la Tabla 2. El programa de PCR utilizado comienza con un ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de PCR utilizado comienza con un ciclo inicial de 94°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min (Sonneveld *et al.*, 2003). Se cargaron 7 ul de cada producto de PCR y 1,2 ul de marcador de peso molecular de 100 pb (ThermoFisher, Estados Unidos) en un gel de agarosa al 2,5% preparado con buffer TAE 1X y la electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis a 100 V por 30 minutos. La visualización de los productos de PCR se realizó en un transiluminador y se realizó registro del gel con una cámara fotográfica.

Tabla 2: Mezcla de reacción para la reacción de PCR para partidores PaConsl. Los reactivos corresponden a los incluidos con la Taq Polimerasa (Brasil) (ThermoFisher, Estados Unidos).

Reactivo	1 rx (ul)	Concentración final
Buffer 10X	1,2	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,6	2,5 mM
dNTPs 2,5 mM	1	0,2 mM
Part. 5 uM	0,5	0,2 uM
Taq 5U/ul	0,2	0,075U/ul
Agua	1,5	
Total mix	5	
DNA (0,4 ng/ul)	7	2,8 ng
Total rx	12	Volumen final: 12 ul de rx

Para amplificar el segundo intrón del gen *RNasa-S*, utilizando los partidores PaConslI (Tabla 1), se utilizó una mezcla de reacción según lo indicado en la Tabla 3. El programa de PCR utilizado comienza con un ciclo inicial de 94°C por 2 min, 10 ciclos de 94°C por 10 seg, 58°C por 2 min, 68°C por 2 min y 25 ciclos de 94°C por 10 seg, 58°C por 2 min, 68°C por 2 min aumentando 10 seg a la extensión de 68°C por ciclo (Sonneveld *et al.*, 2003). Se cargaron 2,5 ul de cada producto de PCR y 1,2 ul de marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher, Estados Unidos) en un gel de agarosa al 1,5% preparado con buffer TAE 1X y la electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis a 100 V por 20 minutos. La visualización de los productos de PCR se realizó en un transiluminador y se realizó registro del gel con una cámara fotográfica.

Tabla 3: Mezcla de reacción para la reacción de PCR para partidores PaConsII. Los reactivos corresponden a los incluidos con la Taq Polimerasa (Brasil) (ThermoFisher, Estados Unidos).

Reactivo	1 rx (ul)	Concentración final
Buffer 10X	1,25	1X
MgCl ₂ 50 mM	0,5	2 mM
dNTPs 2,5 mM	1	0,2 mM
Part. 5 uM	0,5	0,2 uM
Taq 5U/ul	0,12	0,048 U/ul
Agua	5,63	
Total mix	9	
DNA (0,4 ng/ul)	3,5	1,4 ng
Total rx	12,5	Volumen final: 12,5 ul de rx

Tabla 44: Tamaños esperados de los productos de PCR al utilizar los partidores consenso PaConsl (PCI) y PaConsII (PCII) (Sonneveld et al., 2003).

Alelo S	PCI (pb)	PCII (pb)	Alelo S	PCI (pb)	PCII (pb)
S1	456	874	S5	462	2159
S2	419	2204	S6	518	577
S3	300	898	S7	420	2385
S4	523	1064	S9	428	798

Tabla 5: Listado de las variedades analizadas en esta tesis y sus alelos S (Schuster, 2020).

Variedad	Alelos	Variedad	Alelos
1. 'Areko' (Control)	S_1S_3	12. 'Nimba' Polen	
2. 'Areko' Hoja		13. 'PA1 UNIBO' (Control)	S_3S_4'
3. 'Areko' Polen		14. 'PA1 UNIBO' Polen	
4. 'Epic 16' (Control)	S_1S_4	15. 'PA2 UNIBO' (Control)	S_3S_4
5. 'Epic 16' Polen		16. 'PA2 UNIBO' Polen	
6. 'Frisco' (Control)	S_1S_4'	17. 'PA4 UNIBO' (Control)	S_3S_4
7. 'Frisco' Hoja		18. 'PA4 UNIBO' Polen	
8. 'Frisco' polen		19. 'Pacific Red' (Control)	S_4S_9
9. 'Lapins' (Control)	S_1S_4'	20. 'Pacific Red' Polen	
10. 'Lapins' Hoja		21. 'Polka' (Control)	S_6S_9
11. 'Nimba' (Control)	S_2S_3	22. 'Polka' Hoja	

2.4 Evaluación de medios de cultivo sólidos para optimizar el desarrollo del tubo polínico en pruebas de germinación de polen de las variedades de interés y determinación del porcentaje de germinación.

Se utilizó cuatro medios de cultivos sólidos distintos para determinar cuál permitía observar un porcentaje de germinación más alta del polen en condiciones *in vitro*. Para esta actividad se utilizó polen guardado por un año a -20°C de las siguientes variedades:

'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', 'Frisco', 'Epic 16', 'Areko', 'Pacific Red', y como controles se utilizó polen de duraznero y cerezo.

Los medios evaluados fueron:

- Medio A: Azúcar 15%, ácido bórico 5 ppm y agar 1%
- Medio B: Azúcar 10% y agar 1%
- Medio C: $\text{Ca}(\text{NO}_3) \cdot \text{xH}_2\text{O}$ 500 Mg/Lt., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 Mg/Lt., KNO_3 200 Mg/Lt., H_3BO_3 20 Mg/Lt., Azúcar: 10% y agar 1%.
- Medio D: H_3BO_3 : 100 Mg/Lt., $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 300 Mg/Lt., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 Mg/Lt., KNO_3 100 Mg/Lt. y azúcar 10% y agar 1%.

Las anteras guardadas en tubos de 2 ml se trituraron con un pistilo de plástico para obtener el polen. Luego, con un pincel se recogió el polen y se depositó cuidadosamente en dos placas Petri por cada variedad. Cada placa se mantuvo en una cámara de cultivo por 18 horas a 23°C. El polen se clasificó como germinado cuando la longitud del tubo polínico excedía el doble del diámetro de su grano de polen (Galleta 1983; Radicevic et al. 2016). Para cada tratamiento, se registró la germinación en dos placas Petri contando los granos de polen germinados y no germinados en tres campos por placa, cada campo con 100 a 200 granos de polen, bajo un microscopio LEICA DM500 con un foco 10x. Se

seleccionaron los dos medios con mayor porcentaje de germinación para los análisis de germinación posteriores y los otros dos medios no se consideraron.

2.5 Polinizaciones dirigidas en laboratorio (*in vitro*) y campo (*in vivo*)

Para estudiar la interacción polen-pistilo en condiciones de laboratorio (*in vitro*), se recolectaron dardos con flores de 'Frisco' (variedad semicompatible), 'Lapins' (variedad autocompatible) y 'Areko' (variedad autoincompatible) según su fecha de floración en fase de globo tardío y fueron llevadas al laboratorio. El día de su recolección se quitó los pétalos y los estambres de 30 flores por variedad, dejando una pequeña parte de la corola y 3 cm de pedúnculo. Los cortes entre el pedúnculo y el dardo se realizaron en inmersión utilizando agua de la llave. Los pistilos se mantuvieron en espuma floral hidratada por 24 horas a 20°C y 60% de humedad ambiental en una cámara de crecimiento. Cumplidas 24 horas en esta condición, los pistilos se polinizaron directamente con el dedo utilizando polen fresco (Figura 3) obtenido según lo indicado en el punto 2.2.

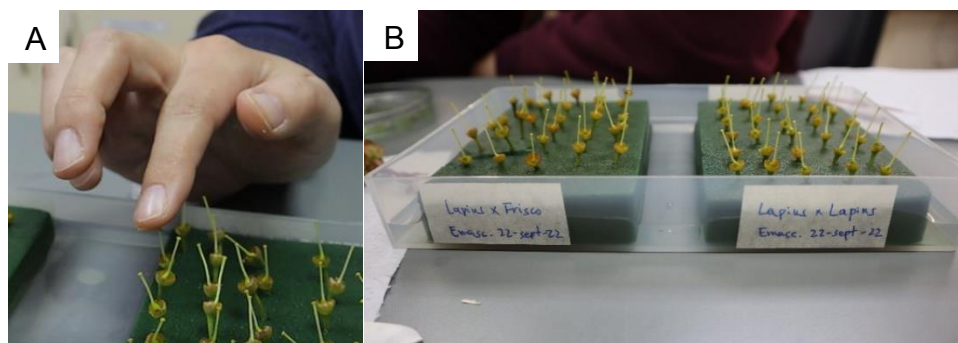


Figura 2. Polinización de pistilos en condiciones de laboratorio (*in vitro*) obtenidos de flores en estado de globo tardío recolectadas el día anterior con el fin de esperar la maduración del pistilo. Se utilizó polen fresco que se secó a temperatura ambiente para realizar polinizaciones. A: Se polinizó directamente utilizando los dedos, tocando el estigma del pistilo. B: Se conservó en condiciones de humedad utilizando esponjas. Fotos: Valentina Puchi.

Para comparar la germinación de polen en pistilos de 'Frisco', identificada como semicompatible, utilizando su propio polen y un polinizante universal, se realizó un primer ensayo en condiciones de laboratorio (*in vitro*) en donde se utilizaron las variedades 'Frisco' y 'Lapins'. Las combinaciones polen-pistilo realizadas fueron 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' y 'Lapins' × 'Frisco' (Tabla 6). Tras tres días de incubación a 20°C y 60% de humedad en una cámara de crecimiento, se observó si había desarrollo del tubo polínico en los cruzamientos indicados previamente utilizando la técnica de tinción de tubos polínicos con *aniline blue*, como se describe más adelante.

Tabla 6: Datos de la recolección de pistilos contando los días desde la polinización en condiciones de laboratorio para los dos ensayos realizados.

PISTILO × POLEN	Días de recolección después de la polinización						
	1	2	3	4	5	6	7
'Frisco' × 'Frisco'			x				
'Frisco' × 'Lapins'			x				
'Lapins' × 'Lapins'			x				
'Lapins' × 'Frisco'			x				
'Areko' × 'Polka'			x	x	x	x	x
'Areko' × 'Lapins'			x	x	x	x	x
'Areko' × 'Areko'*	x	x				x	
'Areko' × 'Areko'**	x				x	x	

* polinizado el mismo día de su recolección

** polinizado al día siguiente de su recolección.

En un segundo ensayo en condición de laboratorio, para observar el desarrollo de tubos polínicos en una variedad autoincompatible, se utilizaron las variedades 'Areko' y 'Polka' y las combinaciones utilizadas fueron 'Areko' × 'Areko' (cruzamiento incompatible), 'Areko' × 'Polka' (cruzamiento totalmente compatible, ya que no comparten alelos S) y 'Areko' × 'Lapins' (cruzamiento parcialmente compatible ya que comparten el alelo S₁). Tras tres, cuatro, cinco, seis y siete días de incubación a 20°C y 60% de humedad en una cámara de crecimiento, se realizaron las observaciones de tubos polínicos de 'Areko' × 'Polka' y 'Areko' × 'Lapins', estado de óvulos, tamaño de sacos embrionarios y embriones. En las combinaciones 'Areko' × 'Areko' (cruzamiento incompatible) se realizaron dos ensayos distintos, un grupo de flores fue polinizado el mismo día de su

recolección y el segundo grupo fue polinizado al día siguiente de su recolección. Tras uno, dos y seis días de incubación a 20°C se realizaron las observaciones de tubos polínicos de 'Areko' × 'Areko' polinizadas el mismo día. Tras uno, cinco y seis días se observaron los pistilos polinizados al día siguiente (Tabla 6).

Tabla 7: Datos de recolección de pistilos contando los días desde la polinización en condiciones de campo para los dos ensayos realizados.

PISTILO × POLEN	Días de recolección después de la polinización					
	3	5	7	10	11	14
'Frisco' × 'Frisco'				x		x
'Frisco' × 'Lapins'				x		x
'Lapins' × 'Lapins'				x		x
'Lapins' × 'Frisco'				x		
'Areko' × 'Polka'	x	x	x		x	
'Areko' × 'Lapins'	x	x	x		x	

Para estudiar la interacción polen-pistilo en condiciones *in vivo*, se realizó la emasculación de 100 flores en estado de globo tardío en árboles de las variedades 'Frisco', 'Lapins' y 'Areko' según su fecha de floración y se envolvieron en bolsas de seda para evitar la polinización con polen no deseado. Pasadas 24 horas de la emasculación, se realizó la polinización de los pistilos con el dedo usando polen fresco obtenido según lo indicado en el punto 2.2. Las combinaciones realizadas fueron las siguientes: 'Frisco'

× 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Frisco', 'Areko' × 'Polka' y 'Areko' × 'Lapins (Tabla 7)'.

2.6 Observación de tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios y embriones

Utilizando el protocolo descrito en Dordevic *et al.*, (2022), cuando se cumplieron los tiempos de interés desde la polinización, se tomaron los pistilos y se fijaron en FAA (alcohol etílico 96°, agua destilada, formaldehído 37% y ácido acético glacial) (D'Ambrogio De Argueso, 2000) durante 24 horas mínimo. Luego, se lavaron con agua destilada y se incubaron en NaOH 8M entre 15 a 20 horas para ablandar y aclarar el tejido. A continuación, se lavaron con agua destilada entre cuatro a cinco veces por 10 minutos cada lavado hasta no observar residuos de NaOH y luego se incubó en *aniline blue* 0,1% por un mínimo de 18 horas. En un portaobjeto, se depositaron los pistilos y con un bisturí nuevo se separó el ovario del estilo; el ovario se llevó a otro portaobjeto para ser observado a continuación. Luego, se agregaron una o dos gotas de glicerina: FeCl₃ 1:1 (Brundrett *et al.*, 1988) y se aplastó el estigma con el estilo usando el cubreobjeto para luego ser observado bajo luz UV. Los ovarios se abrieron por la sutura procurando conservar la integridad de la estructura. Para la observación de los tubos polínicos al entrar en el ovario y el estado de los óvulos se utilizó un microscopio de fluorescencia Olympus BX43F con foco de 10x/0.30 ph1, 20x/0.50 ph1 y 40x/0.75 ph2 más un CoolLED

pE excitation system. Las fotografías se tomaron con una cámara QIMAGING Micropublisher 3.3 RTV incluida en el microscopio.

Para la observación detallada de los sacos embrionarios de pistilos de uno a siete días desde la polinización se utilizó la técnica de tinción con safranina, colorante catiónico que se utiliza para teñir lignina, núcleos, cutícula y parénquima (D'Ambrogio De Argueso, 2000). Se extrajeron los óvulos desde los ovarios utilizando dos agujas de insulina procurando no dañar la integridad física de los óvulos y se decoloraron en cloro 2,4% hasta lograr transparencia de los tejidos. Luego, éstos se lavaron tres veces con agua destilada, se depositaron en un portaobjetos, se agregaron una o dos gotas de glicerina:FeCl₃ 1:1 y se cubrió con un cubreobjetos para ser observado con el microscopio Olympus BX43F con foco de 10x/0.30 ph1.

2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico utilizando R-Studio. En primer lugar, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos correspondientes al polen germinado en medios de cultivo. Los resultados indicaron una distribución normal ($p > 0,005$). Posteriormente, se llevó a cabo una prueba de varianza para verificar la homocedasticidad de los datos. Después de confirmar la

homocedasticidad, se procedió a analizar si existían diferencias significativas entre los porcentajes de germinación en cada medio de cultivo. Para ello, se aplicó la prueba t de Student para dos muestras. En caso de no encontrarse homocedasticidad, se optó por el test de Welch en lugar de la prueba t.

Para evaluar la dependencia o independencia de los resultados en los cruzamientos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se utilizó la prueba de chi cuadrado. La hipótesis nula (H_0) afirmaba que la llegada de los tubos polínicos al ovario es independiente de los cruzamientos, mientras que la hipótesis alternativa (H_A) sugería que los resultados dependían de los cruzamientos. Se consideró un valor-p superior al 5% como falta de evidencia significativa para rechazar H_0 , lo que implicaría la aceptación de la independencia en los resultados de los cruzamientos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Identificación varietal de las variedades de cerezo de interés

Para analizar los resultados con respecto a los tamaños esperados de los alelos *S* de cada variedad analizada (Tabla 5), se consideró la información descrita por Sonneveld *et al.*, (2003). Para 'Areko' (S_1S_3), los partidores PaConsl (Figura 4) permiten observar los alelos S_1 (456 pb) y S_3 (300 pb), mientras que los partidores PaConsII no permiten diferenciar ambos alelos (Figura 5). Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito por Sonneveld *et al.*, (2003) y Schuster (2021) para esta variedad y su perfil también coincide con el de las muestras control del laboratorio.

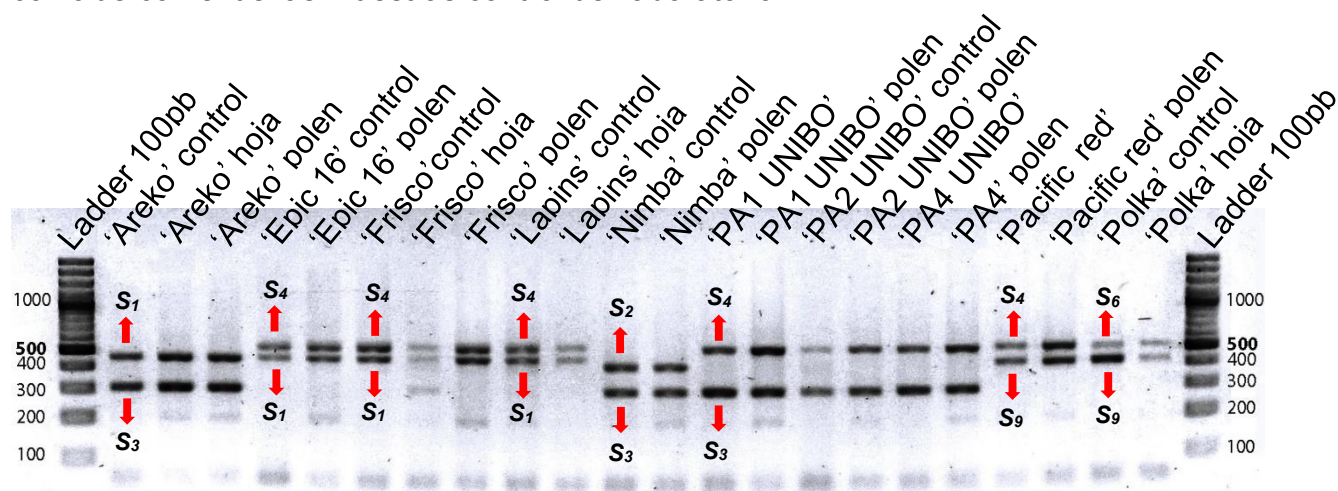


Figura 3. Amplificación del primer intrón del gen *RNase-S* con los partidores PaConsl para 22 muestras pertenecientes a 10 variedades de cerezo utilizadas en este estudio. Las muestras con nombre rojo pertenecen a las muestras control. Gel de agarosa al 2,5% corrido a 100 V por 30 minutos. Marcador de peso molecular: 100 bp.

Se amplificó tenuemente una tercera banda (Figura 4). Esto se pudo generar por algún error involuntario en la preparación del mix de PCR, ya que un aumento mínimo en la Taq polimerasa puede generar bandeo inespecífico. En 'Epic 16' (S_1S_4) S_1 tiene un tamaño esperado de 450 pb y S_4 523 pb utilizando PaConsl, coincide con los tamaños esperados descritos por Sonneveld *et al.* (2003) (Tabla 5) y con la muestra control de laboratorio (Figura 4). 'Frisco' (S_1S_4) presenta dos bandas, una con un tamaño de aproximadamente 450 pb, que correspondería al alelo S_1 y otra banda con un tamaño sobre 500 pb, que correspondería al alelo S_4 (Tabla 5). El tamaño de los fragmentos coincide con los indicados por Sonneveld *et al.* (2003) y también con la muestra control, sin embargo, la muestra de hoja amplificó una tercera barra de aproximadamente 300 pb y la muestra obtenida del polen también amplificó una tercera banda no esperada de un tamaño de 200 pb aproximadamente, lo que se podría atribuir a algún problema en la preparación del mix por exceso de Taq polimerasa. 'Lapins' (S_1S_4) presentó alelos similares a 'Frisco' y su perfil coincide con el de la muestra control y con lo descrito por Sonneveld *et al.* (2003). Para 'Nimba' (S_2S_3) se observó una banda de tamaño superior a 400 pb, que coincide con el tamaño esperado para el alelo S_2 (419 pb) y una banda con un tamaño de 300 pb correspondiente al alelo S_3 , que coincide con lo descrito en literatura y con la muestra control utilizando PaConsl (Tabla 4). Por otra parte, 'PA1 UNIBO' (S_3S_4), 'PA2 UNIBO' (S_3S_4), 'PA4 UNIBO' (S_3S_4) muestran bandas de tamaños esperados y sus perfiles coinciden con el de las muestras control. En 'Pacific Red' (S_4S_9) se observan dos

bandas correspondientes a los perfiles esperados S_4 con tamaño de 523 pb y S_9 con 428 pb. Finalmente, la variedad 'Polka' (S_6S_9) muestra dos bandas con tamaños de 518 (S_6) y 428 pb (S_9).

El mismo grupo de muestras fue analizado a través de PCR utilizando los partidores PaConsII (Figura 5) y todas las muestras analizadas presentaron un perfil genético similar al de las muestras control de laboratorio. La variedad 'Areko' (S_1S_3) presenta sólo una banda con tamaño superior a los 750 pb ya que los partidores PaConsII no permiten diferenciar los alelos S_1 y S_3 , además estos alelos tienen tamaños similares (Tabla 5) de 874 pb y 898 pb respectivamente.

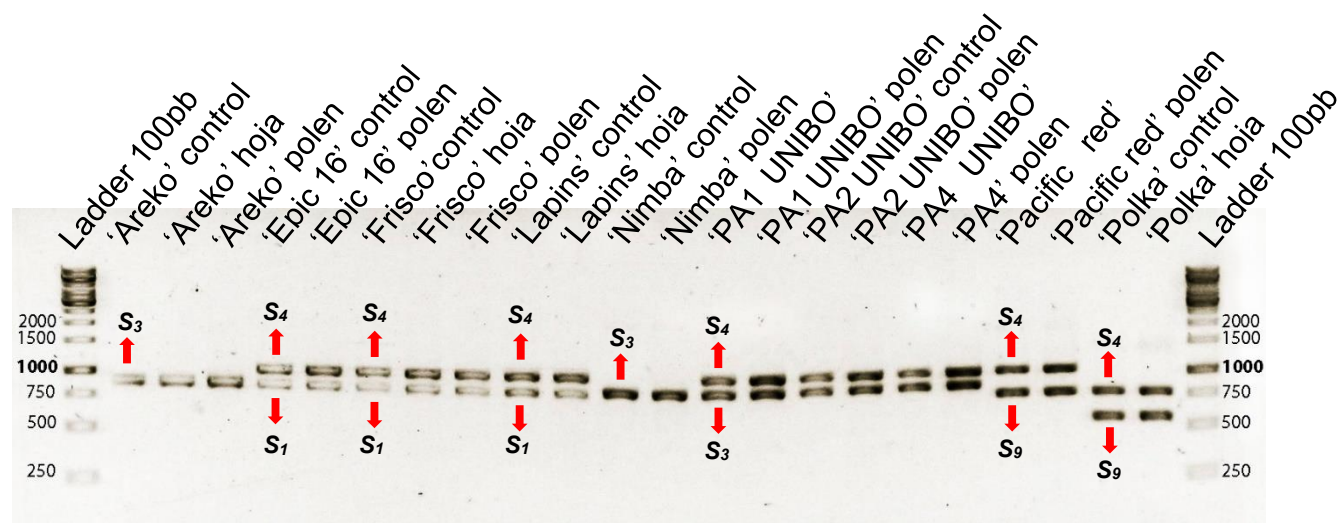


Figura 4. Amplificación del segundo intrón del gen *RNasa-S* con los partidores PaConsII para 22 muestras pertenecientes a 10 variedades utilizadas en este estudio. Las muestras con nombre rojo pertenecen a las muestras control. Gel de agarosa al 1,5% corrido a 100 V por 20 minutos. Marcador de peso molecular: 1 Kb.

En el caso de 'Epic 16' (S_1S_4) con S_1 de tamaño 874 pb y S_4 1064 pb los partidores PaConsII si muestran ambas bandas y coinciden con el tamaño esperado. Por otra parte, 'Frisco' (S_1S_4) y 'Lapins' (S_1S_4) muestran dos alelos con tamaños similares a los esperados por la literatura al igual que 'Epic 16'. 'Nimba' presenta los alelos S_2 (2204) y S_3 (898 pb), sin embargo, no se observa el alelo S_2 , esto debido a que la longitud del fragmento de ADN de dicho alelo es de 2204 pb según Sonneveld *et al.*, (2003) por lo que requiere de más ciclos de polimerización para que exista una banda visible en el gel de agarosa.

Con las variedades 'PA1 UNIBO' (S_3S_4), 'PA2 UNIBO' (S_3S_4) y 'PA4 UNIBO' (S_3S_4) con el mismo perfil S_3 898 pb y S_4 1064 pb coinciden con lo esperado, sin embargo, no se observan alineadas las bandas ya que el gel se vio afectado por el pocillo utilizado para su elaboración. 'Pacific Red' (S_4S_9) con S_4 1064 pb y S_9 798 pb muestra dos bandas alineadas a los tamaños esperados confirmando su perfil genético. Finalmente 'Polka' (S_6S_9) con S_6 577 pb y S_9 798 pb muestra también ambas bandas con el perfil esperado según la literatura.

Tabla 8: Alelos obtenidos en comparación con los alelos esperados de cada variedad.

Variedad	Alelos esperados	Alelos observados	Variedad	Alelos esperados	Alelos observados
'Areko'	S_1S_3	S_1S_3	'PA1 UNIBO'	$S_3S_{4'}$	$S_3S_{4'}$
'Epic 16'	S_1S_4	S_1S_4	'PA2 UNIBO'	S_3S_4	S_3S_4
'Frisco'	$S_1S_{4'}$	$S_1S_{4'}$	'PA4 UNIBO'	S_3S_4	S_3S_4
'Lapins'	$S_1S_{4'}$	$S_1S_{4'}$	'Pacific Red'	$S_4'S_9$	$S_4'S_9$
'Nimba'	S_2S_3	S_2S_3	'Polka'	S_6S_9	S_6S_9

En conjunto, los resultados de la amplificación del gen *RNasa-S* con ambas parejas de partidores permitieron realizar la identificación varietal de los distintos tipos de muestras de variedades utilizadas en este trabajo de tesis y se concluyó que todas las muestras correspondían a la variedad esperada.

3.2 Evaluación de medios de cultivo sólidos para optimizar el desarrollo del tubo polínico en pruebas de germinación de polen de las variedades de interés y determinación del porcentaje de germinación

Se realizó una prueba inicial sembrando polen en los cuatro medios de cultivo y se determinó que los medios de cultivo C y D no serían considerados en análisis posteriores ya que presentaron casi nula germinación (resultados no mostrados).

El análisis de germinación reveló que el mayor porcentaje se alcanzó utilizando polen de la muestra control de durazno en el medio de cultivo A. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en comparación con la germinación en el medio B. En cuanto a las variedades de interés, se destacó que la variedad 'Frisco' sembrada en el medio A exhibió el porcentaje más alto de germinación (15,9%), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en comparación con el medio B (5,4%). Similarmente, la variedad 'Areko' también mostró una germinación significativamente mayor en el medio A en comparación con el medio B.

En resumen, se observó un mayor porcentaje de germinación del polen en los medios de cultivo A en comparación con el medio B. Sin embargo, esta diferencia fue estadísticamente significativa solo para las variedades 'Frisco' y 'Areko', indicando que el medio A es significativamente más eficaz para la germinación del polen en el cultivo *in vitro* para estas variedades.

Esta diferencia en los porcentajes de germinación entre medio A y B se puede deber a que la composición del medio de cultivo puede afectar la germinación del polen en diferentes variedades de cerezos. El medio de cultivo A, que contiene ácido bórico, parece favorecer una mayor germinación en varias variedades.

Tabla 9. Porcentaje de germinación de cada variedad según medio de cultivo. En color rojo se destacan los porcentajes más bajos y altos de germinación sin considerar los controles de cerezo y duraznero.

Variedad	Medio A	Medio B
'Areko' *	14,6%*	6,8%*
'Epic 16'	10,3%	16,4%
'Frisco' *	15,9%*	5,4%*
'Nimba'	15,6%	10,5%
'PA1 Unibo'	7,5%	4,2%
'PA2 Unibo'	14,0%	8,1%
'PA4 Unibo'	15,3%	7,3%
'Pacific red'	7,0%	3,6%
'Cereza'	3,3%	2,7%
'Durazno'	60,2%	52,5%

*Diferencia significativa entre medio A y medio B ($p < 0,05$)

El boro es conocido por jugar un papel importante en la germinación del polen y en el crecimiento del tubo polínico. Como se explica en Dantas *et al.*, (2005) y en Fagundes *et al.*, (2021) el boro, al formar complejos ionizables con sacarosa, puede reaccionar más rápidamente con las membranas celulares, lo que facilita el desarrollo *in vitro* del polen. Esto puede mejorar la eficiencia de la germinación y reducir la probabilidad de ruptura del polen (Cao *et al.*, 2022) (Franzon y Raseira, 2006). Sin embargo, cada variedad respondió de manera única a los diferentes medios de cultivo, lo que destaca la importancia de considerar factores específicos de cada variedad al diseñar prácticas de polinización y

manejo de cultivo. Además, la muestra de duraznero mostró consistentemente altos porcentajes de germinación en ambos medios de cultivo, lo que sugiere que esta especie podría tener una mayor eficiencia de polinización y formación de frutos.

Wang *et al.*, (2022) estudiaron las condiciones de germinación del polen *in vitro* de *Taxodium distichum* var (ciprés de los pantanos) donde probaron distintas concentraciones de ácido bórico y sacarosa. Se observó que la tasa de germinación en el medio suplementado sólo con ácido bórico fue de 27,9 a 58,2%, significativamente mayor que el del medio que no contenía ácido bórico o que solo estaba suplementado con sacarosa. La tasa de germinación de polen más alta fue de 66,8% y se observó en los medios suplementados con ácido bórico al 0,012%, sin embargo, a medida que la concentración de ácido bórico aumentaba entre 0,016 y 0,03%, la tasa de germinación del polen se redujo del 55,3 al 16,64%. Fagundes *et al.*, (2021) observaron que la longitud del tubo polínico aumentó al adicionar ácido bórico en el medio de cultivo para la germinación de granos de polen de *Hylocereus polyrhizus* y *Hylocereus undatus*. Ambas especies presentaron un aumento en la longitud del tubo polínico alcanzando un incremento de cuatro y trece veces mayor, respectivamente, que en ausencia de ácido bórico. La diferencia de crecimiento entre ambas especies se debe a que cada especie tiene un comportamiento diferente en presencia del ácido bórico y así mismo ocurre con las variedades de cerezo, como se observó en este trabajo. Pudimos observar que con la misma concentración de ácido bórico (5 ppm) existió un distinto porcentaje de

germinación al comparar entre distintas variedades. El ácido bórico en una concentración adecuada es de suma importancia para la germinación de los granos de polen y además en el crecimiento del tubo polínico.

3.3 Observación de tubos polínicos, óvulos, sacos embrionarios y embriones

3.3.1 Interacción polen-pistilo en condiciones *in vitro*

3.3.1.1 Germinación de polen en pistilos de 'Frisco' y 'Lapins'

Los resultados de los cruzamientos con 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' y 'Lapins' × 'Frisco' fueron similares entre si (Tabla 10) con una mínima diferencia en los porcentajes. En el cruzamiento 'Frisco' × 'Frisco' se esperaba un menor porcentaje de pistilos en donde sus tubos polínicos alcanzaran el ovario, ya que en la práctica y en la formación de fruto, se ha descrito que 'Frisco' se comporta como una variedad semicompatible (Lorena Pinto, ANA Chile, comunicación personal). Sin embargo, 'Frisco' es una variedad catalogada como autocompatible por su obtentor con alelos S_1S_4 al igual que Lapins y al analizar los resultados se observó que 'Frisco' polinizado con su propio polen alcanzó en el 95% de los pistilos que los tubos polínicos entraron en su ovario

(Tabla 10), situación que confirma el comportamiento autocompatible tal como describió su obtentor.

Tabla 10. Porcentaje de germinación de polen, formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en los cruzamientos de 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' y 'Lapins' × 'Frisco'.

Cruzamiento	Cantidad de pistilos observados	Germinación* de polen en estigma	Se ven* tubos polínicos	Tubos* polínicos en la base del estilo	Tubos* polínicos entran en ovario
'Frisco' × 'Frisco'	20	100%	100%	95%	95%
'Frisco' × 'Lapins'	20	100%	100%	85%	85%
'Lapins' × 'Lapins'	15	100%	100%	93,3%	86,6%
'Lapins' × 'Frisco'	20	100%	100%	90%	85%

* Los resultados son independientes.

** Los resultados son dependientes.

La aplicación de la prueba de independencia de chi cuadrado en R-Studio indicó que los resultados son independientes. Esto implica que los diferentes cruzamientos, ya sea 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' o 'Lapins' × 'Frisco', no determinan un mejor o mayor resultado en la fase programática. Los tubos polínicos alcanzaron el ovario (Figura 6G) de manera independiente, ya sea que se utilice 'Frisco' o 'Lapins' como polinizador en pistilos de 'Frisco' y 'Lapins'. Este hallazgo confirma que 'Frisco' no presenta problemas de autoincompatibilidad gametofítica y actúa como una variedad autocompatible, además de ser compatible con 'Lapins'. Por lo tanto, el comportamiento

semicompatible observado por los agrónomos en el terreno con respecto a 'Frisco' podría atribuirse a posibles problemas en el desarrollo del embrión cuando 'Frisco' se autopoliniza.

Es posible evaluar la eficiencia de las variedades polinizantes observando la presencia de tubos polínicos que llegan al ovario o que llega a una zona específica del estilo (Jacquemart, 2007). La tinción con aniline blue de los pistilos estudiados en esta tesis y la posterior observación de la germinación del polen en el estigma permitió obtener información muy valiosa para entender el comportamiento de dos variedades de cerezo que poseen el alelo *S4'*, pero donde una de ellas se ha descrito como semicompatible ('Frisco') y la otra como autocompatible ('Lapins'). Como se observa en la Figura 6, la elongación del tubo polínico en el estilo bajo la aplicación de luz ultravioleta resalta de manera clara la presencia y la distribución de la calosa en estas estructuras celulares esenciales para el desarrollo reproductivo de la planta. Este colorante se unió específicamente a la calosa presente en las paredes celulares del polen y los tubos polínicos, ya que tiene afinidad por este polisacárido proporcionando una visualización clara y distintiva de esta sustancia bajo el microscopio óptico. Este detallado análisis ofrece valiosa información sobre los procesos biológicos subyacentes y subraya la importancia de la calosa en la reproducción de la planta de cerezo.

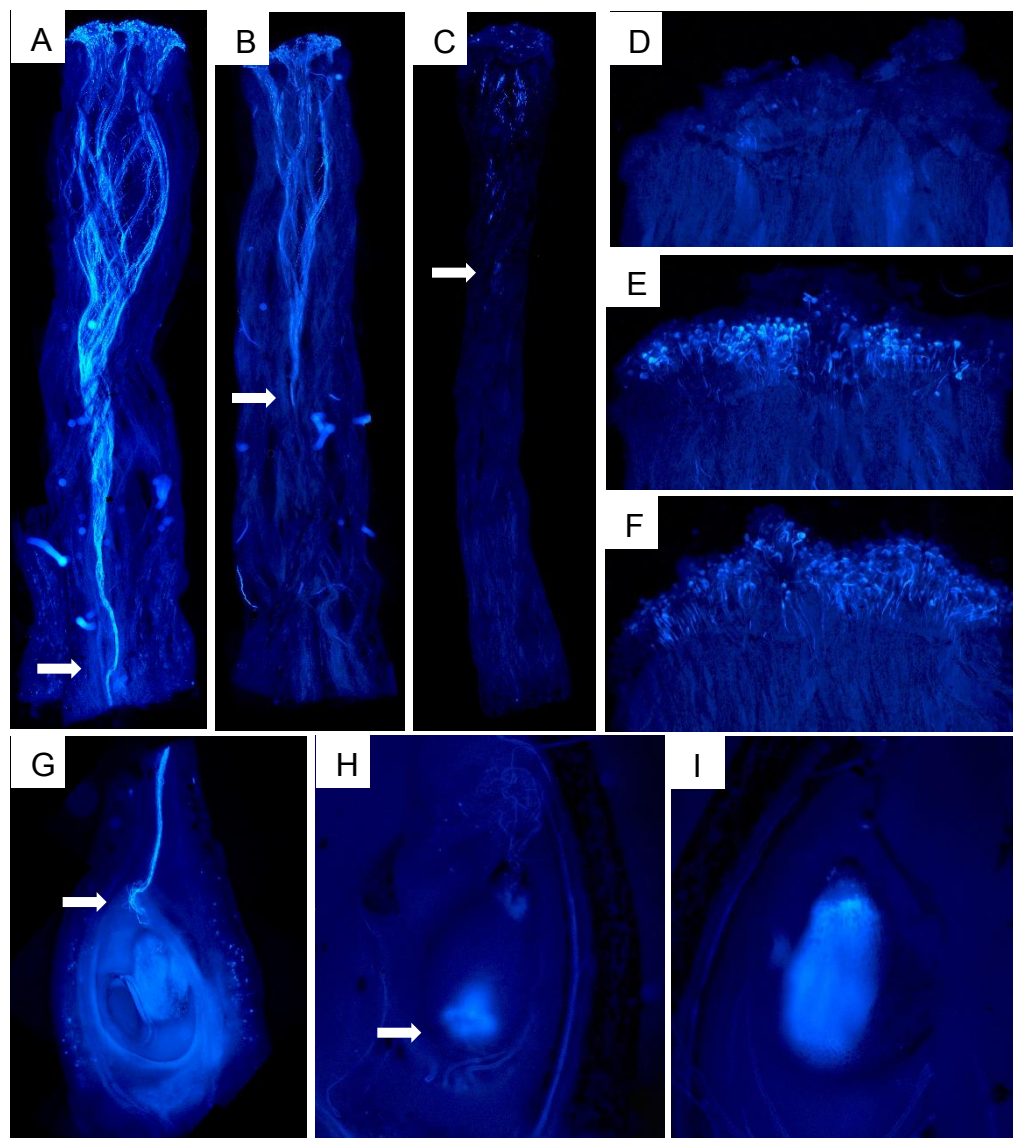


Figura 5. (A) Crecimiento de tubo polínico de 'Frisco' en estilo de 'Lapins' tres días después de ser polinizado (B) Crecimiento de tubo polínico de 'Frisco' en estilo de 'Frisco' tres días después de ser polinizado (C) Crecimiento de tubo polínico de 'Areko' en estilo de 'Areko' seis días después de ser polinizado (D) Primer día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección (E) Segundo día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección (F) Primer día desde la polinización con polen de 'Areko' en estigma de 'Areko' polinizado al día siguiente de su recolección (G) Tubos polínicos de 'Frisco' entrando en ovario de 'Frisco' hasta alcanzar el óvulo al tercer día desde la

polinización (H) Comienzo de la degeneración del óvulo mostrada por la deposición de calosa en la chalaza (I) óvulo completamente cubierto por deposición de calosa.

3.3.1.2 Desarrollo de tubos polínicos en la variedad 'Areko'

Se realizaron las siguientes combinaciones: 'Areko' × 'Areko' (cruzamiento incompatible), 'Areko' × 'Polka' (cruzamiento totalmente compatible) y 'Areko' × 'Lapins' (cruzamiento parcialmente compatible).

Tabla 11. Porcentaje de pistilos con formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en la autopolinización de 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección en condiciones *in vitro*.

'Areko' × 'Areko' polinizado el mismo día	Cantidad de pistilos observados	Germinación de polen en estigma	Tubos polínicos en la mitad del estilo	Tubos polínicos en la base del estilo	Tubos polínicos entran en ovario
Día 1	10	100%	100%	0%	0%
Día 2	10	100%	100%	0%	0%
Día 6	10	0%	0%	0%	0%

En la combinación 'Areko' × 'Areko', donde los pistilos fueron polinizados el mismo día de su recolección y emasculación, la flor aún se encontraba en estado de globo (Figura 1f). Se observó que el 100% de los pistilos presentaron germinación y elongación de los tubos polínicos hasta la mitad del estilo en los días uno y dos desde la polinización (Tabla 11). Este fenómeno se debe a que el estigma proporciona un entorno propicio para la

germinación del polen, y el crecimiento inicial (tercio inicial) del tubo polínico no depende exclusivamente de los nutrientes del estilo, ya que utiliza las reservas contenidas en el grano de polen (De Graaf *et al.*, 2001; Hormaza y Herrero, 1999). Sin embargo, el estigma es esencial para proporcionar un soporte óptimo y adecuado para la hidratación del polen, la germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico (Heslop-Harrison, 2000).

En estudios previos (Sanzol *et al.*, 2003), se identificaron tres estadios de desarrollo estigmático: estigmas inmaduros que permiten la adhesión del polen pero no su hidratación, estigmas receptivos que permiten la adhesión, la correcta hidratación y germinación del polen, y estigmas degenerados donde el polen se hidrata y germina correctamente, pero el crecimiento se ve afectado poco después de la germinación.

Al examinar los pistilos de 'Areko' polinizados con polen de 'Areko' el mismo día de su recolección (en estado de globo), se observó una germinación de polen casi imperceptible al primer día después de la polinización (Figura 6D). Sin embargo, al observar al segundo día, se apreció una mayor cantidad de polen germinado (Figura 6E). Al examinar también los pistilos de 'Areko' polinizados al día siguiente de su recolección (tras 24 horas de maduración de la flor), se observó una mayor cantidad de polen germinado en el primer día después de la polinización. Esto concuerda con lo descrito por Sanzol *et al.*, (2003), ya que la polinización en el estado de globo puede encontrarse

con un estigma inmaduro, mostrando poca germinación de polen, mientras que permitir que la flor madure durante un día favorece la receptividad estigmática, evidenciándose una mayor germinación (Figura 6 D y E).

En estigmas húmedos, la receptividad implica la producción de exudados ricos en proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos, creando un ambiente propicio para la hidratación del polen, la germinación y el crecimiento inicial del tubo polínico (Willingale et al., 1986). Por lo tanto, se recomienda, para futuros trabajos, esperar un día de maduración después de la recolección de la flor antes de llevar a cabo la polinización en condiciones *in vitro*.

Tabla 12. Porcentaje de germinación de polen, formación de tubos polínicos, tubos polínicos que logran alcanzar la base del estilo y el porcentaje de tubos polínicos que logran entrar en el ovario en la autopolinización de 'Areko' polinizado al día siguiente de su recolección y emasculación.

'Areko' × 'Areko' polinizado día siguiente	Cantidad de pistilos observados	Germinación de polen en estigma	Tubos polínicos en la mitad del estilo	Tubos polínicos en la base del estilo	Tubos polínicos entran en ovario
Día 1	10	100%	10%	0%	0%
Día 5	10	90%	50%	0%	0%
Día 6	10	90%	60%	0%	0%

Algo interesante de destacar es que los pistilos de 'Areko' × 'Areko' que fueron polinizados el mismo día de su recolección presentaron un 100% de elongación de tubos

polínicos que alcanzaron la mitad del estilo (Tabla 11); sin embargo, los pistilos de 'Areko' × 'Areko' polinizados al día siguiente de su recolección y emasculación mostraron un menor porcentaje de germinación y elongación en los tubos polínicos que alcanzaron la mitad del estilo (Tabla 12). Debemos tomar en cuenta que tanto un crecimiento excesivamente rápido como un crecimiento demasiado lento del tubo polínico pueden afectar negativamente la fertilización, el crecimiento equilibrado del tubo polínico es esencial para evitar que estalle antes de llegar al óvulo, la síntesis equilibrada de calosa en el tubo polínico es crucial para evitar problemas como el estallido prematuro antes de alcanzar el óvulo (Cao Peng *et al.*, 2022) por lo que en 'Areko' × 'Areko' polinizado el mismo día de su recolección es probable que el estilo no haya estado totalmente preparado para el crecimiento del tubo polínico por lo que creció rápidamente en el primer día hasta alcanzar la mitad del estilo y vemos que en el día seis se observa nulo crecimiento del tubos polínicos. En cambio, en los pistilos polinizados al día siguiente, vemos que solo en un 10% de los pistilos se observó crecimiento de tubos polínicos en el primer día y el porcentaje fue aumentando a 50% en el día cinco y a 60% en el día seis.

Tabla 13. Observación y comparación al día tres, cuatro, cinco y seis de 'Areko' con polen de 'Lapins' (Cruzamiento semicompatible) y 'Areko' con polen de 'Polka' (Cruzamiento totalmente compatible) en condiciones *in vitro*.

Día de observación	Cruzamiento	Cantidad de pistilos observados	Germinación de polen en estigma	Tubos polínicos en la base del estilo	Tubos polínicos entran en ovario
Día 3	'Areko' × 'Lapins'	5	100%*	100%*	100%*
	'Areko' × 'Polka'	5	100%*	60%*	60%*
Día 4	'Areko' × 'Lapins'	5	100%*	40%*	0%*
	'Areko' × 'Polka'	5	100%*	80%*	80%*
Día 5	'Areko' × 'Lapins'	6	100%*	67%*	50%*
	'Areko' × 'Polka'	7	100%*	71,4%*	71,4%*
Día 6	'Areko' × 'Lapins'	8	100%*	50%*	13%*
	'Areko' × 'Polka'	6	100%*	83%*	50%*

* Los resultados son independientes.

** Los resultados son dependientes.

Solo en las combinaciones de 'Areko' × 'Polka' y 'Areko' × 'Lapins' (Tabla 13), los tubos polínicos alcanzaron la base del estilo y entraron al ovario, resultado que se esperaba, ya que por el sistema de autoincompatibilidad gametofítica (Guerra *et al.*, 2015), 'Areko' × 'Areko' corresponde a un cruzamiento autoincompatible.

El análisis de chi cuadrado arrojó que los resultados son independientes, esto quiere decir que, estadísticamente, el porcentaje de pistilos que sus tubos polínicos alcanzaron la base del estilo y entraron en el ovario es independiente del tipo de cruzamiento que se

realice, sin embargo, se observa que en los días cuatro, cinco y seis el cruzamiento de 'Areko' x 'Polka' dio un mayor porcentaje de pistilos que sus tubos polínicos llegaron a la base del estilo y entraron en el ovario, resultado que se esperaba ya que el cruzamiento de 'Areko' x 'Polka' es completamente compatible, lo que significa que estas dos variedades pueden interactuar favorablemente en el proceso de polinización y fecundación, lo que lleva a una alta eficiencia en la producción de frutos. Esto es posible ya que 'Areko' tiene alelos S_1S_3 y 'Polka' S_6S_9 (tabla 4) por lo que no existe incompatibilidad gametofítica, que es lo que permite que este cruzamiento funcione.

El cruzamiento de 'Areko' (S_1S_3) x 'Lapins' (S_1S_4) está clasificado como parcialmente compatible porque ambas variedades comparten el alelo S_1 . Los resultados muestran que el día tres fue el día en que todos los pistilos tenían tubos polínicos llegando al ovario, contradictoriamente, los siguientes días se obtuvieron menores porcentajes, teniendo el día seis solo un 13%, esto puede explicarse por qué el número de muestras analizadas (5-8) fue muy pequeño y no se logró tomar una muestra representativa.

Se sugiere trabajar con una mayor cantidad de pistilos en los siguientes trabajos de investigación, ya que en este estudio se utilizaron menos de 10 pistilos por cruzamiento.

La observación del posible crecimiento del embrión mostró las distintas fases y condiciones de los óvulos. En cerezo, de los dos óvulos presentes en el ovario, normalmente solo uno, el ovulo primario se convierte en semilla, el otro, el ovulo

secundario, suele abortar (Hedhly *et al.* 2007). El ovulo secundario, se distingue por la presencia de calosa en la chalaza (Figura 6H)) que se extiende por todo el nucelo y los tegumentos hasta cubrir el ovulo completo (Figura 6I) (Hedhly *et al.* 2007; Radicevic *et al.* 2016)

3.3.2 Interacción polen-pistilo en condiciones *in vivo*

3.2.2.1 Cruzamientos en pistilos de 'Frisco' y 'Lapins'

El bajo crecimiento de los ovarios en estos cruzamientos se debe al daño causado por la emasculación de la flor, ya que el daño podría generar un aborto selectivo por parte del árbol hacia ese futuro fruto, la emasculación acelera la degeneración del óvulo (Hedhly *et al.* 2009; Hedhly *et al.* 2003) por lo que a pesar de que los tubos polínicos si alcanzaron casi en un 100% los ovarios en condiciones *in vitro* (Figura 6A) no se observó mayor crecimiento del ovario en condiciones de campo para los días diez y catorce (Figura 7).

En el análisis de chi cuadrado realizado en R-Studio para el día 10, los cruzamientos entre 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins' y 'Lapins' × 'Frisco' indicaron independencia en los resultados. Sin embargo, en el día 14, se obtuvo un valor de p igual a 0.01952. Este resultado sugiere que hay evidencia suficiente para rechazar la hipótesis nula (H0), lo que implica que los resultados son dependientes. En otras palabras, el

crecimiento del ovario en estos cruzamientos no ocurre al azar, y existe evidencia de que depende del tipo de cruzamiento.

Tabla 14. Porcentaje de crecimiento de ovarios en el cruzamiento de 'Frisco' × 'Frisco', 'Frisco' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Lapins', 'Lapins' × 'Frisco' a los 10 y 14 días desde la polinización en condiciones de campo.

Días de observación	Cruzamientos	Pistilos observados	Nulo crecimiento	Crecimiento de ovario
Día 10	'Frisco' × 'Frisco'	10	90%*	10%*
	'Frisco' × 'Lapins'	10	70%*	30%*
	'Lapins' × 'Lapins'	12	75%*	25%*
	'Lapins' × 'Frisco'	12	100%*	0%*
Día 14	'Frisco' × 'Frisco'	22	77,3%**	22,7%**
	'Frisco' × 'Lapins'	22	36,3%**	63,6%**
	'Lapins' × 'Lapins'	31	45%**	55%**
	'Lapins' × 'Frisco'	24	37,5%**	62,5%**

* Los resultados son independientes.

** Los resultados son dependientes.

En detalle, los datos revelan que el crecimiento del ovario en 'Frisco' × 'Frisco' es menor en comparación con otros cruzamientos, siendo un 22.7%, mientras que en 'Frisco' × 'Lapins' alcanza un notable 63.6%. Estos hallazgos respaldan la discusión previa, donde se plantea que 'Frisco' × 'Frisco' actúa como una variedad compatible en la fase progámica, es decir, no se ve afectada por la autoincompatibilidad gametofítica. No obstante, en condiciones reales, se comporta como una variedad semicompatible, un aspecto que se refleja en los resultados del crecimiento del ovario para el día 14 después

de la polinización. En resumen, al polinizar 'Frisco' con su propio polen, se produce la fecundación del óvulo, pero surgen dificultades en el desarrollo del embrión.

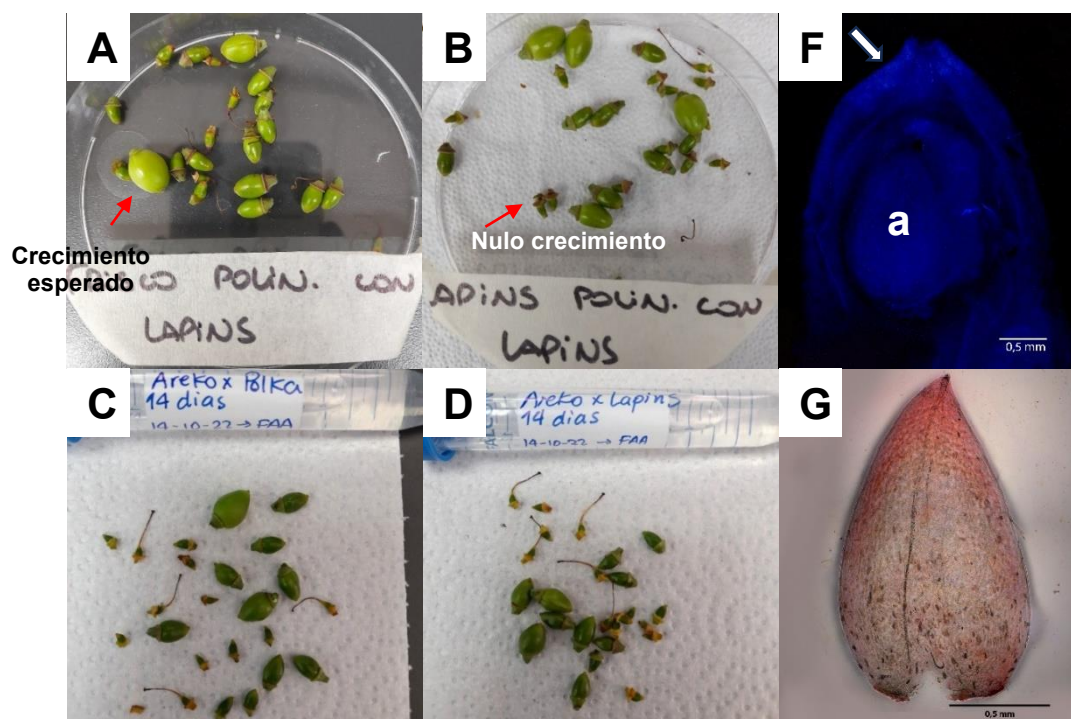


Figura 6. Pistilos en condiciones de campo, colectados al día 14 después de la polinización. Se puede visualizar los distintos crecimientos de los ovarios. (A) 'Frisco' x 'Lapins' (B) 'Lapins' x 'Lapins' (C) 'Areko' x 'Polka' (D) 'Areko' x 'Lapins'. (F) Ovario de 'Frisco' x Frisco' con un embrión de 14 días (G) Saco embrionario con embrión de 14 días.

Es importante tener en cuenta las diferencias observadas entre las condiciones de laboratorio y campo, ya que pueden influir en la tinción de calosa y, en última instancia, en el éxito de la polinización y el desarrollo de frutos.

3.3.2.1 Desarrollo de tubos polínicos, ovario y óvulos en la variedad 'Areko'

Después de tres, cinco, siete y once días desde la polinización, se realizaron observaciones similares para los cruzamientos 'Areko' × 'Polka' y 'Areko' × 'Lapins' a partir de polinizaciones realizadas en condiciones de campo. Se observó el desarrollo de tubos polínicos en todas las combinaciones polen-pistilo estudiados, junto con cambios en el estado de los óvulos y la presencia de sacos embrionarios y embriones en etapas posteriores de incubación.

Tabla 15. Porcentaje de pistilos donde los tubos polínicos alcanzaron el ovario en los cruzamientos de 'Areko' × 'Lapins' (cruzamiento semicompatible) y 'Areko' × 'Polka' (Cruzamiento compatible) a los tres y cinco días desde la polinización en condiciones de campo.

Día de observación	Cruzamiento	Cantidad de pistilos observados	Germinación de polen en estigma	Tubos polínicos en la base del estilo	Tubos polínicos entran en ovario
Día 3	'Areko' × 'Lapins'	6	100%	100%*	83%*
	'Areko' × 'Polka'	5	100%	100%*	100%*
Día 5	'Areko' × 'Lapins'	10	100%	90%*	90%*
	'Areko' × 'Polka'	9	100%	100%*	100%*

* Los resultados son independientes.

** Los resultados son dependientes.

En el cruzamiento entre 'Areko' y 'Polka' bajo condiciones de campo, se observó que tanto a los tres como a los cinco días después de la polinización (véase Tabla 15), los

tubos polínicos alcanzaron el ovario en el 100% de los pistilos examinados (véase Figura 8AB). Esta discrepancia con respecto a los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* podría atribuirse a que son más favorables las condiciones en campo para el desarrollo del estilo, donde los tubos polínicos compiten por los recursos de carbohidratos (Herrero, 2017). En condiciones *in vitro*, la falta de conexión con el árbol implica un suministro reducido o nulo de carbohidratos al tubo polínico. Dado que el crecimiento y la formación de tejido celular del tubo polínico dependen de la calosa, se ha observado que la acumulación de esta está estrechamente vinculada al agotamiento de las reservas de almidón (Radičević *et al.*, 2018). La síntesis de calosa en el tubo polínico desempeña un papel crucial en su integridad estructural (Cao *et al.*, 2022), lo que sugiere que las condiciones de campo proporcionan un entorno ideal para estudios de este tipo. Los resultados obtenidos para estos períodos son independientes, según el análisis estadístico realizado, lo que sugiere que el tipo de cruzamiento no afecta los resultados.

En la Figura 8B, se puede apreciar el ovario con dos óvulos: uno primario, sin calosa, y otro secundario, ya degradado, evidenciado por la presencia de calosa. La aparición de óvulos degenerados es una característica común en el cerezo dulce y agrio (Eaton, 1959), y se ha observado que estas anomalías en el desarrollo del óvulo y del saco embrionario también se presentan en otras especies frutales como el albaricoque, pistacho y aguacate (Eaton, 1959; Eaton y Jamón, 1965; Grundwag y Fahn, 1969)

Para los días siete, once y catorce en los cruzamientos entre 'Areko' y 'Polka', así como entre 'Areko' y 'Lapins', los análisis estadísticos indicaron nuevamente la independencia de los resultados. Sin embargo, se observó consistentemente que el cruzamiento 'Areko' × 'Polka' exhibió un mayor porcentaje de crecimiento del ovario (Tabla 16), junto con una mayor incidencia de pistilos en los cuales los tubos polínicos alcanzaron el ovario, tanto en condiciones de campo durante los días tres y cinco (Tabla 15), como en condiciones *in vitro* durante los días cuatro, cinco y seis (Tabla 13). Estos hallazgos son congruentes con el comportamiento esperado, dado que, como se mencionó previamente, el cruzamiento 'Areko' × 'Polka' se caracteriza por ser totalmente compatible, mientras que 'Areko' × 'Lapins' es considerado semicompatible.

En la Figura 8E se observa el óvulo sin fluorescencia (viable) y con fluorescencia (no viable). Además, se puede apreciar la diferencia en tamaño de un óvulo que fue fecundado y en que su calosa ya se degradó, en comparación con el óvulo fluorescente que no fue fecundado o que abortó. En general se observó mayor tinción y fluorescencia en los tubos polínicos y óvulos en los tratamientos *in vivo*, lo que se podría explicar debido a las mejores condiciones en las que se encuentran los pistilos, ya que, al estar unidas al árbol, continúan recibiendo nutrientes para el crecimiento del ovario, como se ha

mencionado anteriormente. Es por esto por lo que se sugiere en próximas investigaciones se realicen los ensayos en condiciones de campo.

Tabla 16. Porcentaje de crecimiento del ovario en los cruzamientos de 'Areko' × 'Lapins' (cruzamiento semicompatible) y 'Areko' × 'Polka' (Cruzamiento compatible) en condiciones de campo para los días siete, once y catorce días después de la polinización.

Día de observación	Cruzamiento	Cantidad de pistilos	No hubo crecimiento	Crecimiento de ovario
Día 7	'Areko' × 'Lapins'	15	46,6%*	53,3%*
	'Areko' × 'Polka'	15	40%*	60%*
Día 11	'Areko' × 'Lapins'	14	92,8%*	7,1%*
	'Areko' × 'Polka'	17	88%*	12%*
Día 14	'Areko' × 'Lapins'	25	56%*	44%*
	'Areko' × 'Polka'	23	52,1%*	47,8%*

* Los resultados son independientes.

** Los resultados son dependientes.

El óvulo es una parte fundamental en el proceso de fertilización de las cerezas, y su desarrollo y vigor están influenciados por diversos factores, incluyendo la morfología floral, la posición relativa de órganos masculinos y femeninos, y la temperatura durante la floración (Sarisu, 2021). El óvulo pierde vigor en casos de desarrollo lento del tubo polínico (Sarisu, 2021), es por esto que, para la observación del crecimiento embrionario a pocos días de la fecundación, se sugiere trabajar en condiciones *in vivo*, ya que sólo en estas se logró observar crecimiento del embrión (Figura 8).

En la Figura 8E se aprecian dos óvulos provenientes del mismo ovario, observados bajo luz ultravioleta. El óvulo de mayor tamaño corresponde al que ha sido fecundado, ya exento de calosa. En contraste, el óvulo de menor tamaño exhibe calosa, indicativo de su proceso de degradación, como se evidencia con la tinción de anilina azul (Arberloa y Herrero, 1991). La Figura 8F, visualizada bajo luz natural, destaca el notable tamaño del saco embrionario con el embrión en desarrollo. En el caso del óvulo no fecundado o en proceso de degradación, el saco embrionario, como se muestra en la Figura 8I, no presenta crecimiento. La Figura 8H, observada bajo luz natural, permite apreciar la estructura de los óvulos y comparar los hallazgos con la observación bajo luz ultravioleta.

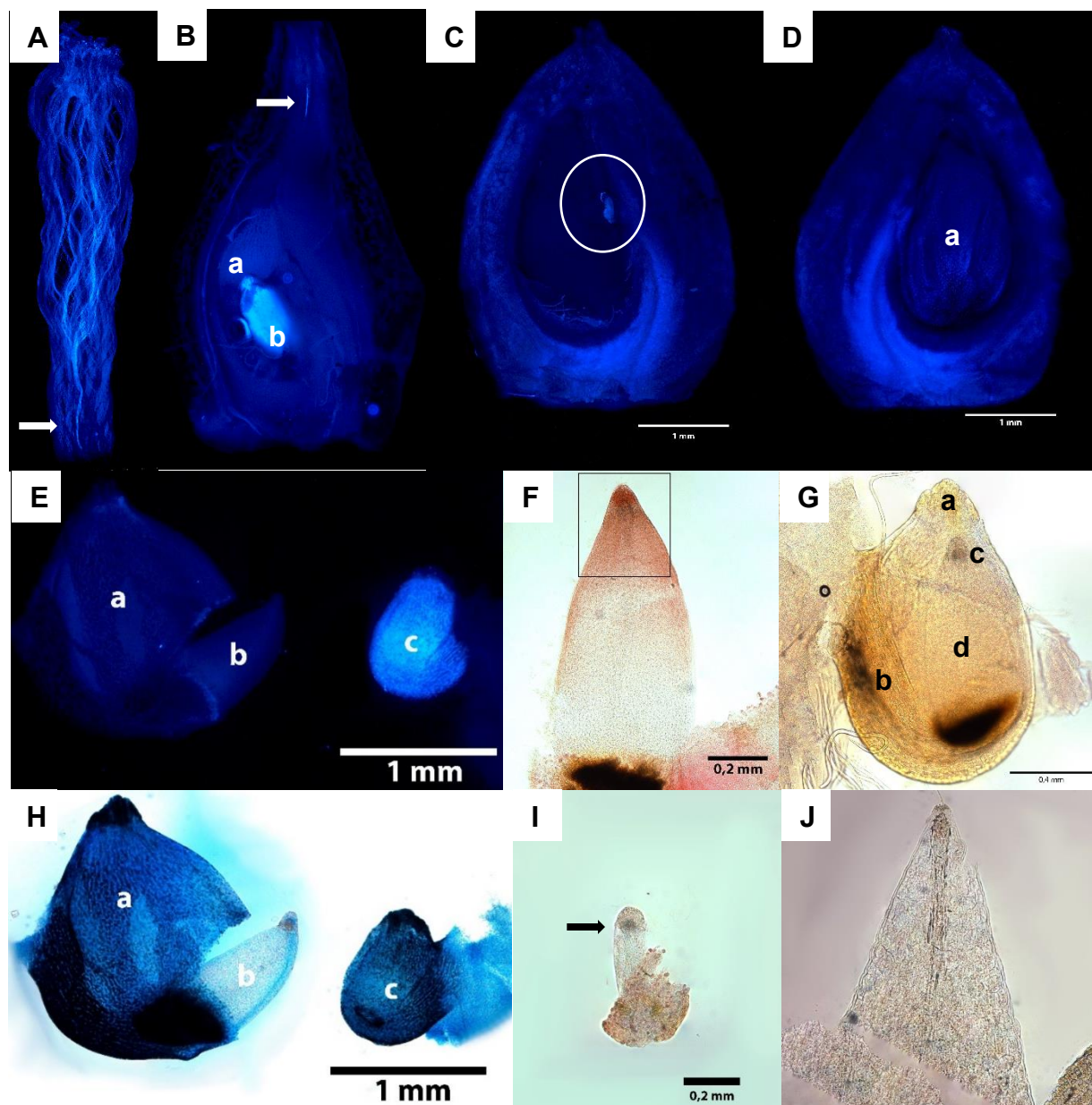


Figura 7. (A) Pistilo de 'Areko' polinizado con polen de 'Polka' al tercer día (B) Ovario de 'Areko' con un óvulo primario (a) y óvulo secundario degradado (b) al tercer día. (C) Ovario de 'Areko' con óvulo degradado (día 14) (D) Ovario de 'Areko' con óvulo fecundado (día 14). (E) Comparación de óvulo fecundado (a) con el óvulo degradado al día cinco bajo luz UV. (F) Saco embrionario con embrión de cinco días (G) (óvulo fecundado 'Areko' x 'Lapins', a: micropilo, b: tegumentos, c: embrión, d: saco embrionario (H) Comparación de óvulo fecundado (a) con el óvulo degradado al día cinco bajo luz

natural (I) Saco embrionario de ovulo degradado (J) Embrión de 8 días creciendo y alargándose por el saco embrionario.

Se ha observado que la acumulación de calosa está estrechamente relacionada con el gasto de las reservas de almidón cuyo nivel disminuye después de que ocurre la fertilización, y desempeña un rol importante en la nutrición del saco embrionario (Radičević *et al.*, 2018). El contenido de almidón está relacionado con el diferente destino que pueden experimentar los dos óvulos de una flor de *Prunus*, en la que uno se convierte en semilla (Figura 8C), mientras que el otro se degrada (Figura 8C) (Rodrigo y Herrero, 1998). El micropilo (Figura 8Ga) es una abertura en la parte superior del óvulo que permite el acceso del tubo polínico durante la fertilización. La calosa puede estar presente en esta área y a menudo desempeña un papel importante al regular la llegada y el crecimiento del tubo polínico ya que puede disolverse o modificarse para permitir que el tubo polínico penetre en el óvulo (Radičević *et al.*, 2018). La calosa también puede estar presente en la pared del óvulo y desempeña un papel en la protección del óvulo y en la interacción con el tubo polínico a medida que se acerca al óvulo. Por lo tanto, la presencia de calosa es fundamental para el éxito del proceso progámico. El depósito de calosa puede detener el crecimiento de los óvulos (Figura 8Bb), y condicionar el cese de su función. Aunque tradicionalmente se ha interpretado que la función de la calosa aísla la muerte de las células vivas, la calosa también podría inhibir el transporte de azúcar al saco embrionario abortivo (Sun *et al.*, 2004; Radičević *et al.*, 2018).

En la Figura 8J podemos apreciar el tamaño de un saco embrionario a once días desde la polinización, por lo que se estima que es un embrión de 8 días. Podemos observar que el ovulo fecundado alcanza un tamaño de aproximadamente un milímetro y dentro del saco embrionario (Figura 8J) el embrión se alarga desde el micrópilo hacia la base del saco embrionario.

VI. CONCLUSIÓN

En el presente estudio, se ha confirmado el perfil genético de diversas variedades, entre ellas, 'PA1 UNIBO', 'PA2 UNIBO', 'PA4 UNIBO', 'Nimba', 'Frisco', 'Epic 16', 'Areko', 'Pacific Red', 'Lapins' y 'Polka'.

Respecto a la germinación del polen almacenado a -20°C , se observó un aumento significativo en las variedades 'Frisco' y 'Areko' cuando se le agregó ácido bórico al medio de cultivo (5 ppm).

La interacción polen-pistilo en condiciones de laboratorio confirmó la autocompatibilidad de la variedad 'Frisco', evidenciada por la finalización de la fase programática al tercer día. Por otro lado, la interacción de 'Areko' consigo misma demostró un comportamiento incompatible, ya que los tubos polínicos no alcanzaron más de la mitad del estilo en ningún pistilo.

Para futuras investigaciones, se sugiere explorar condiciones de campo hasta los días cinco o seis, ya que se observó un mejor estado de conservación de los pistilos y un mayor crecimiento de los óvulos fecundados en este periodo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Arbeloa, A. and Herrero, M. 1991. Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Nezv Phytol.* 118, 527-533

Brundrett, M. C., Enstone, D. E., y Peterson, C. A. 1988. A berberine-aniline blue fluorescent staining procedure for suberin, lignin, and callose in plant tissue. *Protoplasma*, 146(2-3):133–142.

Cao P., Tang C., Wu¹ X., Qian M., Lv S., Gao H., Qiao X., Chen G., Wang P., Zhang S. y Wu¹ J. 2022. PbrCalS5, a callose synthase protein, is involved in pollen tube growth. *Planta* 256:22

Chagas E. A., Pio R., Chagas P. C., Pasqual M., Bettioli Neto J. E. 2010. Composição do meio de cultura e condições ambientais para germinação de grãos de pólen de porta-enxertos de pereira. *Ciência Rural*, 40(2): 231–236

Dantas, A.C.D.M., M.L. Peixoto, R.O. Nodari, and M.P. Guerra. 2005. Viabilidade do pólen e desenvolvimento do tubo polínico em macieira (*Malus* spp.). *Revista Brasileira De Fruticultura* 27(3):356–359.

De Graaf, B.H.J., Derksen, J.W.M., Mariani, C. 2001. Pollen and pistil in the progamic phase. *Sex. Plant Reprod.* 14, 41–55.

D Ambrogio De Argueso Ana. 2000. *Manual De Tecnicas En Histologia Vegetal* (spanish Edition). Editorial hemisferio sur. 9, 42 y 73 p.

Đorđević M., Vujović T., Cerović R., Glišić I., Milošević N., Marić S., Radičević, S., Fotirić Akšić, M., Meland, M. 2022. In Vitro and In Vivo Performance of Plum (*Prunus domestica* L.) Pollen from the Anthers Stored at Distinct Temperatures for Different Periods. *Horticulturae* 8: 616.

Eaton, G.W 1959. A study of the microgametophyte in *Prunus avium* and its relation to fruit setting. *Can. J. Plant Sci.* 39, 466-476.

Eaton, G.W. Jamon, A.M. 1965. Embryo sac development in the apricot, *Prunus armeniaca* L. Cv 'Constant'. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 86, 95-101.

Fagundes, M. C. P., Ramos, J. D., Tostes, N. V., Pasqual, M. and Rodrigues, F. A. 2021. In Vitro Germination of Pollen Grains in Pitahaya Species. *International Journal of Fruit Science*, 21:1, 556-564

Franzon R. C., Raseira M. do C. B. 2006. Germinação in vitro e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 18–20

Franzon, R.C., and M.D.C.B. Raseira. 2006. Germinação in vitro e armazenamento do pólen de *Eugenia involucrata* DC (Myrtaceae). *Revista Brasileira De Fruticultura* 28:18–20.

Galleta GJ.1983. Pollen and seed management. In: Moore JN, Janick J (eds) *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press, West Lafayette, pp 23–47

Guerra, M., Wunsch, A., López-Corrales, M. y Rodrigo, J. 2011. Lack of Fruit Set Caused by Ovule Degeneration in Japanese Plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136(6):375–381.

Guerra M., Wünsch A., López-Corrales M., y Rodrigo J. 2010. Flower Emasculation as the Cause for Lack of Fruit Set in Japanese Plum Crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135:6

Guerra, M.E., Rodrigo, J. 2015. Japanese plum pollination: A review. *Scientia Horticulturae*.

Grundwag, M. Fahn, A. 1969. The relation of embryology to the low seed set in *Pistacia vera* (Anacardiaceae). *Phytomorphology* 19, 225-235. HALL, A.E., 1992: Breeding for heat tolerance. *Plant Breed. Rev.* 10, 129-168.

Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. 2005. Influence of genotype-temperature interaction on pollen performance. *J. Evol. Biol.* 18:1494–1502

Hedhly A, Hormaza JI, Herrero M. 2004. Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *Am J Bot* 91:558–564

Hedhly A., Hormaza J.I., Herrero M. 2007. Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81:158 – 164

Hedhly, A, Hormaza, J.I. and Herrero, M. 2009. Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry. *Sci Hortic* 119: 455 - 457.

Herrera S., Lora J., Hormaza J., Herrero M. y Rodrigo J. 2018. Optimizing Production in the New Generation of Apricot Cultivars Self-incompatibility, S-RNase Allele Identification, and Incompatibility Group Assignment. *Frontiers in Plant Science* 9: 527

HESLOP-HARRISON, Y. 2000. Control gates and micro-ecology: the pollenstigma interaction in perspective. *Annals of Botany* 85(Supplement A): 5–13.

Hormaza, J. I., and Herrero, M. 1999. Pollen performance as affected by the pistilar genotype in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Protoplasma* 208: 129–135.

Herrero, M. 2017. Flower biology and fruit set in Cherry. *Acta Hortic.* 1161, 345-352

IQconsulting. 2022. Anuario internacional de cereza <http://www.iqconsulting.com/yb/>

lezzoni, A., Wünsch, A., Höfer, M., Giovannini, D., Jensen, M., Quero-García, J., et al. 2017. Biodiversity, germplasm resources and breeding methods. p. 36-59. In Quero-

García, J., Iezzoni, A., Pulawska, J., and Lang, G. (eds.) *Cherries: Botany, production and uses*. CABI, Wallingford, UK.

Jacquemart, A.-L. 2007. Methods for Determining Compatibility and Pollinator Efficiency in Temperate Fruit Species. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 1(1), 26-38

Lane, W. D. y Schmid, H. 1984. Lapins and sunburst sweet cherry. *Canadian Journal of Plant Science*, 64(1): 211–214.

Radičević S., Cerović, R., Nikolić D., Đorđević M. 2016. The effect of genotype and temperature on pollen tube growth and fertilization in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*, 209(1):121–136.

Radičević, S., Cerović, R., and Đorđević, M. 2018. Ovule senescence and unusual pollen tube growth in the ovary of sweet cherry as affected by pistilar genotype and temperature. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16:4 (Radičević et al., 2018)

Radunić M., Jazbec A., Ercisli S., Čmelik Z., Ban S.G. 2017. Pollen-pistil interaction influence on the fruit set of sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, 224: 358–366.

Rodrigo, F.J., and Herrero, M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex. Plant Reprod.* 11 (2), 86–93

SANZOL, J., P. RALLO, AND M. HERRERO. 2003. Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*, Rosaceae) flower. *American Journal of Botany* 90: 78–84.

Sarisu, H. 2021. Flower Biology and the Effects of Different Chemicals on Pollen Germination of Some Early Sweet Cherry Cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 64

Schuster, M. 2020. Self-incompatibility (S) genotypes of cultivated sweet cherries – An overview update 2020. Julius Kühn-Institut (JKI)

Sonneveld, T., Robbins, T., Boskovic, R., Tobutt, K. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor. Appl. Genet.* 102:1046-1055.

Sonneveld, T., Tobutt, K. R., & Robbins, T. P. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 107(6): 1059–1070.

Sun, K., Hunt, K. and Hauser, B.A. 2004. Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. *Plant Physiol* 135: 2358-2367

Wang, Z., Yin, M., Creech, D.L., Yu, C. 2022. Microsporogenesis, Pollen Ornamentation, Viability of Stored *Taxodium distichum* var. *distichum* Pollen and Its Feasibility for Cross Breeding. *Forests* Volume 13. Article number 694

WILLINGALE, J., P. G. MANTLE, AND R. P. THAKUR. 1986. Post-pollination stigmatic constriction, the basis for ergot resistance in selected lines of pearl millet. *Phytopathology* 76: 536–539.