



**EVALUACIÓN DE LÍNEAS DE *CUCURBITA MAXIMA* CON
MEJORES APTITUDES PARA LA PRODUCCIÓN DE SEMILLA
HÍBRIDA EN CRUZAMIENTOS CON *C. MOSCHATA***

ESTELA MARY BLANCO

Director: Dra. Iris Edith Peralta

Codirector: Dr. Raúl Pozner

Tesis presentada como requerimiento parcial
para obtener el grado de

MAGISTER SCIENTIAE EN HORTICULTURA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Julio de 2012

RESUMEN

El género *Cucurbita* incluye algunas de las especies más antiguamente cultivadas por la humanidad, de las que se aprovechan sus frutos comestibles. El mejoramiento apunta hacia la generación de híbridos con mejor calidad de frutos tanto para el consumo en fresco como para el deshidratado. El éxito del cruzamiento para la producción de híbridos (F1) enfrenta distintos problemas a medida que los individuos se encuentran menos emparentados entre sí. En la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta INTA (Mendoza, Argentina) se han seleccionado líneas que actúan como madre y padre en los cruzamientos para la producción de híbridos de zapallo. El híbrido Aconcagua INTA, obtenido del cruzamiento de líneas de *C. maxima* x *C. moschata* es un zapallo muy apreciado por su excelente aptitud para el deshidratado y su alto rendimiento agronómico e industrial. Sin embargo, se presentan varios inconvenientes en su producción, como el escaso prendimiento de los frutos, la reducida cantidad de semillas, semillas sin embrión o “vanas” y anomalía de las plántulas. Resulta necesaria una selección de las líneas parentales para mejorar la obtención de la semilla híbrida. Este trabajo busca identificar las líneas con mejores aptitudes combinatorias y encontrar las posibles causas que afectan la producción de la semilla híbrida. Se estudió la polinización utilizando una sola flor directamente en contraste con el uso de una mezcla de polen de varias flores, y no se encontraron diferencias entre ambas técnicas. El análisis de la viabilidad de polen confirmó a *C. moschata* como fuente de polen de buena calidad. La cantidad de polen germinado encontrado en el estigma y los tubos polínicos en el estilo de *Cucurbita maxima*, demostraron que la polinización no presenta barreras a este nivel. En los cortes longitudinales de los óvulos se observó que la fecundación ocurre antes del tercer día después de la polinización, y que la formación de la ampolla lítica en el pico nucelar sucedió tanto en las autopolinizaciones de *Cucurbita maxima* como en los cruzamientos híbridos. Esta ampolla lítica indica que el tubo polínico ha llegado al tejido nucelar, aunque no garantiza una fecundación viable ya que no se pudieron observar embriones normales vivos. Este hecho sugiere que podrían estar operando barreras reproductivas postcigóticas tempranas. Se analizaron y midieron variables morfológicas en semillas de 27 días luego de la polinización y semillas maduras, según los grupos de líneas maternas, donde resultan superiores los grupos 1 y 5. Se observaron y midieron las frecuencias de aparición de embriones deformes y los tipos de malformación más frecuentes, según los grupos de líneas y los ciclos de

cultivo, donde resultaron superiores los grupos 5 y 3. Se discute el posible efecto de las condiciones ambientales en la aparición de malformaciones de los embriones.

ABSTRACT

The genus *Cucurbita* includes some of the oldest species cultivated for their edible fruits by humankind. Nowadays, breeding strategies points to the generation of hybrids to improve fruit quality for both fresh and dehydrated products consumption. The success of breeding techniques to produce hybrids (F1) faces different challenges as parental individuals are less related to each other. In the breeding program developed at the Agricultural Experimental Station La Consulta INTA (Mendoza, Argentina) several lines have been selected to act as mother and father in crosses to produce hybrid squash. The hybrid Aconcagua INTA is obtained by crossing lines of *C. maxima* x *C. moschata* squash, and it is prized for the excellent suitability for dehydration of its fruits, high agronomic production and industry processing performance. However, there are several drawbacks in its production, such as poor fruit development, small amount of seeds, seeds without embryo or "vain" and abnormal seedlings. It is necessary to select parental lines that give the best crosses combinations to improve hybrid seed production. This research seeks to identify the best combining ability of parental lines, and find possible causes that affect the production of hybrid seeds in Aconcagua hybrid production. Pollination techniques using single flowers were compare with the use of a pollen mixture from different flowers; no differences were found between both techniques. The test of pollen viability of *C. moschata* confirmed good pollen quality of the father line. The pollen grains found on the stigma and the pollen tubes growing in the style of *Cucurbita maxima* showed that the process of pollination has no crossing barriers at this level. In the longitudinal cut of ovules the fertilization occurred before the third day after pollination, and the formation of the "lentic blister" (the ampuliform phase of the pollen tube) in the nucellar beak occurred both in self-pollination of *Cucurbita maxima* as in the hybrid crosses. The ampuliform phase of the pollen tube in the nucellar beak does not guarantee a viable fertilization, as no live normal embryos were observed in ovule sections. This fact suggests the action of the postzygotic barriers. Morphological variables in the formation of seed were analyzed and measured after 27 days and after 60 days of pollination. These variables were compared among maternal lines groups; where the most efficient were groups 1 and 5. The frequency of deformed embryos and most frequent types of malformations were observed and measured in the maternal lines groups and considering the crop cycles; of these, the best were groups of lines 5 and 3. The possible effect of environmental conditions on the appearance of embryos malformations is discussed.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción	2
Referencias bibliográficas.....	12
CAPÍTULO I: El género <i>Cucurbita</i> . Biología reproductiva. Polinización y fecundación en cruzamientos de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i> y en autofecundaciones.	
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Introducción.....	16
Materiales y Métodos.....	33
Resultados y discusión.....	46
Conclusiones.....	58
Referencias bibliográficas.....	60
Capítulo II: Los híbridos en <i>Cucurbita</i> . Cruzamientos interespecíficos de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i> . Embriones en desarrollo y a término.	
Resumen.....	63
Abstract.....	64
Introducción.....	65
Materiales y Métodos.....	71
Resultados y discusión.....	76
Conclusiones.....	91
Referencias bibliográficas.....	92
Conclusiones generales y perspectivas futuras.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Agrupamiento de líneas de <i>C. maxima</i> utilizadas en el ensayo.....	34
Tabla 1.2. Formulación del colorante de Alexander.....	36
Tabla 1.3. Formulación de los compuestos utilizados en la coloración de	43

Safranina- Fast Green.....	
Tabla 1.4. Cantidad de portaobjetos preparados	44
Tabla 1.5. Frecuencias y estadísticos para “granos de polen viables”, “no viables” y “subviables” de <i>C. moschata</i> , según el colorante usado.....	47
Tabla 1.6. Frecuencias y estadísticos para “granos de polen viables”, “no viables” y “subviables” de <i>C. moschata</i>	47
Tabla 1.7. Frecuencias y estadísticos para “granos de polen germinados”, “no germinados” y “subgerminados”, en cruzamientos híbridos.....	48
Tabla 1.8. Medias y desvíos estándar del número de tubos polínicos con citoplasma en cortes de estilos, luego de 2 días de polinización.....	53
Tabla 2.9. Flores polinizadas y frutos obtenidos en la prueba de polinización.....	72
Tabla 2.10. Frutos y semillas analizadas a los 27 días de polinización. Ciclo 2006/7.....	73
Tabla 2.11. Frutos y semillas analizadas en frutos a término.....	74
Tabla 2.12. Resumen del material recolectado.....	75
Tabla 2.13. Medias y desvíos estándar para los tipos de polinización. Ciclo 2006/7.....	76
Tabla 2.14. Frecuencias y estadísticos de “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”.....	77
Tabla 2.15. Medias y desvíos estándar de las variables medidas en embriones de 27 d. Ciclo 2006/7.....	78
Tabla 2.16. Frecuencias y estadísticos de la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”.....	79
Tabla 2.17. Medias y desvíos estándar de las variables medidas en semillas a término.....	83
Tabla 2.18. Frecuencias y estadísticos para “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”.....	84
Tabla 2.19. Medias y desvíos estándar del porcentaje de llenado en semillas a término.....	85
Tabla 2.20. Frecuencias y estadísticos para “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”.....	86
Tabla 2.21. Frecuencias absolutas y estadísticos de variables categóricas para cada malformación estratificado por ciclo de cosecha.....	87
Tabla 2.22. Frecuencias absolutas y estadísticos de variables categóricas para cada malformación estratificado por grupo de líneas.....	88
Tabla 2.23. Condiciones meteorológicas durante la floración y el cuajado de frutos en los ciclos estudiados.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Líneas parentales para la obtención del Híbrido Aconcagua INTA.....	9
Figura 1.2. Dendrograma que muestra el agrupamiento de entradas de <i>C. maxima</i> , <i>C. moschata</i> y <i>C. pepo</i>	18
Figura 1.3. Flores de <i>Cucurbita</i>	19
Figura 1.4. Flores de <i>Cucurbita</i>	21
Figura 1.5. Corte transversal de estilo y de la parte superior del ovario.....	22
Figura 1.6. Sección diagramática de una flor carpelada joven de <i>Cucurbita</i> ...	22
Figura 1.7. Sección longitudinal de un óvulo de <i>Cucurbita</i>	23
Figura 1.8. Tubo polínico en el pico nucelar del óvulo.....	26
Figura 1.9. Acondicionamiento de las flores carpeladas y estaminadas un día antes de la polinización manual.....	28
Figura 1.10. Acondicionamiento de la flor estaminada y polinización.....	28
Figura 1.11. Flor polinizada manualmente.....	28
Figura 1.12. Embrión en dos etapas del desarrollo de los cotiledones.....	30
Figura 1.13. Desarrollo de la plántula de <i>Cucurbita</i>	31
Figura 1.14. Granos de polen en el estigma luego de 2 días de polinización en un cruzamiento híbrido de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>	48
Figura 1.15. Tubos polínicos en la base del estilo, en un cruzamiento híbrido de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>	49
Figura 1.16. Pico nucelar sin penetración del tubo polínico, en una polinización híbrida de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>	50
Figura 1.17. Picos nucleares de óvulos autopolinizados de <i>C. maxima</i> después de 3 días de polinización.....	51
Figura 1.18. Picos nucleares de polinizaciones híbridas de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>	51
Figura 1.19. Corte de la base del estilo de <i>C. maxima</i> dos días después de la polinización.....	52
Figura 1.20. Cruzamiento híbrido de <i>C. maxima</i> x <i>C. moschata</i>	54
Figura 1.21. Autopolinización de <i>C. maxima</i>	54
Figura 1.22. Saco embrionario híbrido abortado, luego de 2 días de polinización.....	55

Figura 1.23. Cruzamiento recíproco de <i>C. moschata</i> x <i>C. maxima</i> . Embrión de 11 días.....	56
Figura 1.24. Embrión híbrido de 27 días.	57
Figura 2.25. Embriones híbridos de semillas de 27 días.....	78
Figura 2.26. Semilla híbrida a término.....	80
Figura 2.27. Semilla híbrida a término con embrión bien formado pero con poco llenado	80
Figura 2.28. Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico.....	81
Figura 2.29 Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico.....	81
Figura 2.30. Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico.....	81
Figura 2.31 Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico.....	82
Figura 2.32. Frecuencias relativas de variables categóricas para cada malformación estratificadas por ciclo de cosecha.....	87
Figura 2.33. Frecuencias relativas de variables categóricas para cada malformación estratificadas por grupos de líneas.....	88

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las Cucurbitáceas y su mejoramiento

La heterosis o superioridad de un híbrido implica mejores características en la progenie que en los genotipos parentales. Este fenómeno ha sido utilizado para la producción de semilla híbrida proveniente del cruzamiento de individuos dentro de una misma especie, entre especies y entre géneros (Márquez Sánchez, 1988). El éxito del cruzamiento enfrenta distintos problemas a medida que estos grupos se encuentran menos emparentados entre sí, siendo el cruzamiento cada vez más dificultoso y esporádico (Harlan y de Wet, 1971).

Las Cucurbitáceas incluyen algunas de las especies más antiguamente usadas y cultivadas por la humanidad; se las aprovecha por sus frutos comestibles, sus semillas ricas en proteínas y aceites son utilizadas en la industria, otros usos van desde el consumo de flores y tallos tiernos, hasta la fabricación de instrumentos musicales, recipientes, filtros industriales, y otros usos textiles y medicinales. El mejoramiento apunta, en la actualidad, hacia la obtención de individuos diclinos monoicos (eliminación de la dioecia), el aumento de la proporción de flores femeninas (carpeladas) sobre las masculinas (estaminadas) (Tasa F/M) y la generación de híbridos (Nayar y More, 1998).

Los cruzamientos en Cucurbitáceas, por tratarse de plantas alógamas y en general diclinas, son normalmente sencillos de realizar en forma manual, y muy utilizados en la obtención de nuevos cultivares y líneas con uniformidad, que luego pueden ser seleccionadas para la producción de híbridos (Cardoso, 2005). Generalmente son posibles los cruzamientos recíprocos, es decir se obtienen los mismos resultados al utilizar un individuo como madre o como padre, independientemente del sentido del cruzamiento, aunque se encuentran respuestas variables (Lira-Saade, 1995). Robinson (1999) señala que los cruzamientos recíprocos entre Cucurbitáceas son frecuentemente similares, pero daría mejores resultados el uso de la línea con semilla más grande o con mayor producción de semillas como madre para la generación del híbrido.

El género *Cucurbita* comprende especies silvestres y cultivadas que presentan mayor o menor afinidad al cruzamiento interespecífico. Generalmente se forman frutos al cruzar la mayoría de las especies, pero existen importantes barreras genéticas que operan a diferentes niveles precigóticos y postcigóticos (Futuyma, 1998). En algunos casos los frutos híbridos que se producen no contienen semillas o las semillas tienen embriones anormales o parcialmente desarrollados. En otros cruzamientos, cuando las semillas híbridas están bien

desarrolladas, generalmente las generaciones F1 y raramente las F2 o las derivadas de retrocruzas con alguno o ambos progenitores presentan importantes disminuciones de la fertilidad, esterilidad en alguno de los sexos o una serie de deformaciones en sus partes vegetativas o reproductivas. Sin embargo, se pueden obtener todos esos resultados en cruzamientos de un mismo par de especies, lo cual indica que existen distintas posibilidades de éxito al emplear diferentes porciones de la variación (cultivares, razas o variedades regionales, etc.) de cada una de ellas (Lira-Saade, 1995).

Importancia de las Cucurbitáceas en la producción de alimentos

El aumento en la producción de los cultivos durante el siglo XX estuvo en gran medida basado en la utilización de la heterosis. El aprovechamiento de ésta en la producción vegetal es de vital importancia en las estrategias para la provisión de alimentos y la seguridad nutricional de la población. Para Robinson (1999) invertir en tecnología para híbridos es de gran relevancia en los países en desarrollo, tanto para alimentar a la población existente como para disminuir la cantidad de tierras destinadas a la agricultura evitando la declinación del recurso básico, y constituye una opción real para incrementar la producción requerida para las próximas décadas.

El uso efectivo de la heterosis ha fomentado el desarrollo de las grandes industrias semilleras. Los rápidos avances en mejoramiento de plantas asociados a tecnologías de producción de semillas han servido para aumentar la competitividad de los híbridos e incrementar el rendimiento de cultivo y de semilla por hectárea, reduciendo los costos involucrados y mejorando la calidad de la semilla (Robinson, 1999).

El valor de las Cucurbitáceas híbridas se reconoció en 1914 cuando Lumsden informó que cruzando melones ingleses por franceses se producía un híbrido que combinaba características deseables de cada padre. En algunos casos, los híbridos superaban a sus padres en precocidad, rendimiento y otras características usuales debido a la heterosis. Los cultivares híbridos de Cucurbitáceas comenzaron a producirse comercialmente en los '30, pero fue recién después de la segunda guerra mundial, cuando tomaron mayor importancia. Éstos se han difundido sobre todo para la sandía, el melón y el pepino, y están muy desarrollados en Japón. En la actualidad se reporta que el 43 % de las semillas de pepino, el 56 % de los "zapallos de invierno" y el 10 % de los "zapallos de verano" (tipo *Succhini*), entre

otros, son híbridos. La ventaja de los híbridos fue que al ser tan buenos se volvieron muy populares (Robinson, 1999).

Desde hace 60 años aproximadamente, los cultivares de especies del género *Cucurbita* fueron caracterizados debido a su alta variabilidad genética, atribuida en parte a su tendencia al cruzamiento cruzado. La demanda por la uniformidad y la selección por precocidad, tamaño, color, forma y calidad del fruto resultó en una alta homocigosis y en verdaderos cultivares (Bisognin, 2002). En la producción de las especies de *Cucurbita*, la forma de fruto es la característica más importante y se busca una relación apropiada entre largo y diámetro de fruto según cada propósito. Los frutos que se consumen no maduros se caracterizan por una cáscara fina, mientras que en los que se consumen maduros se busca una cáscara más desarrollada, para incrementar la protección y conservación del fruto. Recordemos que la selección para su domesticación fue por forma de fruto, pulpa no amarga, pocas semillas y tamaño grande de semillas y fruto. Esto resultó en el mantenimiento de una alta diversidad genética para forma de fruto, tamaño y textura entre las especies cultivadas (Bisognin, 2002).

Los programas de multiplicación de *Cucurbita* están enfocados en algunas características específicas. El color de fruto naranja intenso es más atractivo en apariencia por su alta concentración de pro-vitamina A (Whitaker y Robinson, 1986). Plantas con hábito de crecimiento compacto denominadas “arbustivas” y con entrenudos cortos como resultado de la reducida biosíntesis de giberelina endógena, son desarrolladas en algunas especies para mejorar el manejo de cultivo. Plantas arbustivas de *C. pepo* y *C. maxima* tienen crecimiento más uniforme y mejor respuesta a alta densidad de plantas comparadas con plantas no arbustivas (Bisognin, 2002).

Está generalmente aceptado que todos los cultivos de Cucurbitáceas son autocompatibles. Esto hizo posible el desarrollo de líneas consanguíneas para usarlas en la producción de semilla híbrida F1. Durante los últimos 35 años, las líneas endocriadas han sido usadas para desarrollar híbridos, con más uniformidad y homogeneidad que los cultivares de polinización abierta (Robinson, 1999). Aunque no todas las especies presentan el mismo nivel de autocompatibilidad, por ejemplo, se reporta que *Cucurbita maxima* no presenta depresión por consanguinidad o endogamia, mientras que *C. pepo* presenta este carácter en las líneas endocriadas cada vez en mayor proporción al aumentar las generaciones de endocría (Hayes *et al.* 2005; Stephenson *et al.* 2001).

Líneas desarrolladas en la EEA La Consulta INTA

En la EEA La Consulta INTA (Mendoza, Argentina) se han seleccionado líneas madre y padre para la producción de híbridos de zapallo. El híbrido Aconcagua INTA, obtenido del cruzamiento de líneas seleccionadas de *C. maxima* (línea madre) x *C. moschata* (fuente de polen) es un zapallo muy apreciado por su excelente aptitud para la deshidratación de su pulpa y su alto rendimiento agronómico e industrial. Sin embargo, a pesar de las buenas cualidades que presenta, su obtención insume gran cantidad de mano de obra para realizar los cruzamientos (Della Gaspera 2005). (Figura 1).



A.



B.



C.

Figura 1: Líneas parentales para la obtención del Híbrido Aconcagua INTA. A: *Cucurbita maxima* (línea materna); B: *Cucurbita moschata* (línea paterna); C: Híbrido Aconcagua INTA.

La línea madre, denominada Zapuco INTA, pertenece al tipo “Pink banana”, y su destino es la industria del deshidratado. Es la única en el mercado nacional, posee plantas guadoras con rendimientos medios de 25 t.ha⁻¹. Los frutos son grandes con extremos puntiagudos. La pulpa es de color anaranjado y la cáscara es blanda y de color rosada-anaranjada con líneas blanco-cremosas. Se destaca por su elevado rendimiento industrial, presentando 12 % de sólidos totales, y por la

excelente calidad del producto final que es utilizado en la preparación de caldos y sopas.

La línea padre, Paquito INTA, es un zapallo de tipo “Anco”, con destino a consumo directo.

Híbrido Aconcagua INTA

Es un híbrido interespecífico entre *C. maxima* y *C. moschata*. Esta vía de cruzamiento es similar a los híbridos tipo Tetsukabuto, pero con destino a la industria del deshidratado. Compite en el mercado industrial con los del tipo Anco. Posee plantas muy vigorosas y expansivas por la heterosis que se obtiene en la F1. El extraordinario vigor de las plantas se ve reflejado en los rendimientos medios que superan las 50 t.ha⁻¹. Los frutos son de tamaño intermedio, el peso promedio es de 1,700 kg. La forma es ovalada y el color es anaranjado con bandas irregulares. Tiene un excelente rendimiento industrial que supera el 14 % en sólidos totales. También presenta un alto grado de resistencia a enfermedades fúngicas y tiene mejor aptitud industrial por su mayor contenido de sólidos totales, color y cualidades organolépticas (Della Gaspera, 2009).

En el proceso de obtención del híbrido Aconcagua INTA se presentan varios inconvenientes, como el escaso prendimiento de los frutos, la reducida cantidad de semillas, semillas sin embrión o “vanas” (semillas con los tegumentos aparentemente bien formados pero vacías) y anormalidad de las plántulas. Los estudios de aptitud combinatoria han sido muy difíciles de desarrollar por el elevado número de líneas evaluadas, obteniéndose resultados poco confiables y azarosos, debiéndose seleccionar sólo las líneas que dan buena cantidad de semillas, corriendo el riesgo de eliminar una línea que produjo pocos frutos sólo debido al azar (Della Gaspera, 2005).

Dada la importancia económica del híbrido Aconcagua INTA para la industria del deshidratado, se necesita una selección de las líneas parentales que mejoren la producción de semilla híbrida. Se busca identificar las líneas con mejores aptitudes combinatorias para la producción de semilla híbrida en diferentes cruzamientos entre líneas seleccionadas de *C. maxima* y *C. moschata* y analizar las posibles causas que afectan la producción de la semilla híbrida.

Hipótesis planteadas

- Existen barreras a la fertilización en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.
- *C. maxima* presenta líneas con mayor aptitud combinatoria o afinidad al cruzamiento con *C. moschata*.

Objetivos generales

- Estudiar las barreras a la fertilización en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.
- Optimizar la obtención de híbridos (favorecer la selección de grupos de líneas con mayor aptitud combinatoria).

Objetivos Específicos

- Identificar si operan barreras precigóticas o postcigóticas en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.
- Identificar grupos de líneas de mayor aptitud combinatoria para la obtención de semilla híbrida en cruzamientos interespecíficos entre *C. maxima* y *C. moschata*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Cienc. Rural* 32 (5): 715-723
2. Cardoso, A. I. I. 2005. Polinização manual em abobrinha: efeitos nas produções de frutos e de sementes. *Hortic. Bras.* 23 (3): 731-734
3. Della Gaspera, P. 2005. Informe Técnico. Convenio Unilever-INTA. Programa de mejoramiento de zapallo para deshidratado. Pp. 10-23.
4. Della Gaspera, P. 2009. Jornadas de Actualización Hortícola. INTA – Centro Regional Mendoza – San Juan. Proyecto Desarrollo Sustentable de la Horticultura Regional. Pp. 1-4.
5. Futuyma D. J. 1998. *Evolutionary Biology. Chapter 15*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. Pp. 447-479.
6. Harlan, J.R., and J.H.J. de Wet. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon* 20 (4): 509-517.
7. Hayes, C. N. Winsor, J. A. and Stephenson, A. G. 2005. A comparison of male and female responses to inbreeding in *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (*Cucurbitaceae*). *American Journal of Botany* 92: 107-115.
8. Lira - Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las *Cucurbitaceae* latinoamericanas de importancia económica. Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools 9. IPGRI. Pp. 1-53.
9. Márquez Sánchez, F. 1988. Genotecnia Vegetal. Tomo II. AGT Editor, México. Pp 1-15. 665 p.
10. Nayar, N. M. and More, T. A. 1998. Cucurbits. Science publishers Inc. U. S. A. Pp. 1-340.
11. Robinson, R. W. 1999. Rationale and methods for producing hybrid Cucurbit seed. In *Hybrid Seed Production in Vegetables: Rationale and Methods in Selected Crops*. Amarjit S. Basra ed. *Journal of New Seeds* 1(3-4):1-47.
12. Stephenson, A. G. Hayes, C. N. Johannsson and M. H. Winsor, J. A. 2001. The performance of microgametophytes is affected by inbreeding depression and hybrid vigor in the sporophytic generation. *Sexual Plant Reproduction* 14 (1-2): 77-83.
13. Whitaker, T. W. Robinson, R. W. 1986. Squash Breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. Edited by Mark J. Basset. The AVI Publishing Company Inc. Connecticut. USA. Pp. 209-242.

CAPÍTULO 1

**EL GÉNERO *Cucurbita*. BIOLOGIA REPRODUCTIVA. POLINIZACIÓN
Y FECUNDACIÓN EN CRUZAMIENTOS DE *C. maxima* X *C. moschata* Y
EN AUTOFECUNDACIONES.**

RESUMEN

Se discuten los conceptos sobre la domesticación y las relaciones filogenéticas en el género *Cucurbita*, y se describen sus estructuras florales, los gametófitos, el proceso de fecundación y formación de la semilla y el desarrollo de los cruzamientos híbridos interespecíficos dentro de este género, especialmente entre *C. maxima* y *C. moschata*. Se relacionan estos aportes con las implicancias agronómicas en la producción de semilla híbrida. El test de viabilidad de polen de *C. moschata* lo confirma como dador de polen de buena calidad. La cantidad de granos de polen germinados encontrados en el estigma y el número de tubos polínicos que atraviesan el estilo de *Cucurbita maxima*, demuestran que el proceso de polinización no presenta barreras a este nivel. En las observaciones microscópicas de los cortes longitudinales de óvulos se encontró que la fecundación ocurre antes del tercer día después de la polinización, y que la formación de la ampolla de lisis en el pico nucelar sucede tanto en las autopolinizaciones de *Cucurbita maxima* como en los cruzamientos híbridos. Esta ampolla lítica del tubo polínico no garantiza una fecundación viable, ya que no se pudieron observar embriones normales vivos en los cortes al micrótopo de óvulos. Estos resultados sugieren que podrían estar operando barreras reproductivas postcigóticas.

ABSTRACT

Concepts about domestication and phylogenetic relationships in *Cucurbita* are discussed. Floral structures, gametophytes, the process of fertilization and seed formation are described, and the development of interspecific hybrids in this genus, especially between *C. maxima* and *C. moschata*. These contributions are discussed and compared with the agronomic implications in hybrid seed production. The test of pollen viability of *C. moschata* confirmed good pollen quality of the paternal line. The number of germinated pollen grains found on the stigma and the number of pollen tubes growing in the style of *Cucurbita maxima* showed that the process of pollination has no barriers at this level. In the microscopical observations of longitudinal slices of the ovules, fertilization occurred before the third day after pollination and the formation of the "lentic blister" (the ampuliform phase of the pollen tube) in the nucellar beak appeared in both self-pollinated *Cucurbita maxima* ovules as well as in the ovules of hybrid crosses. The ampuliform phase of the pollen tube in the nucellar beak does not guarantee a viable fertilization, as no live normal embryos were observed in the microscopical sections. These results suggest the action of postzygotic barriers.

INTRODUCCION

Domesticación

El género *Cucurbita* (*Cucurbitaceae*, *Cucurbitoideae*) es nativo y endémico de América y cuenta con cerca de 20 especies; de las cuales *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, *C. ficifolia* y *C. argyrosperma* son cultivadas. *Cucurbita* es considerado como uno de los géneros más variables morfológicamente en todo el reino vegetal, con características extremadamente diversas en el color, tamaño, y forma del fruto (Holle, 1983; Singh, 1990; Lira-Saade, 1995; Nayar y More, 1998; Robinson *et al.* 1976). Las especies de *Cucurbita* pueden dividirse en mesofíticas y xerofíticas. Singh (1990) señala que las especies cultivadas aparentemente se originaron de las mesofíticas y son parte de este grupo.

Los registros arqueológicos sugieren que las especies de *Cucurbita* fueron una de las primeras plantas en ser domesticadas. La asociación *Cucurbita*-maíz-poroto formó la base alimenticia para las civilizaciones pre-Colombinas en América (Holle, 1983; Whitaker y Bemis, 1975). Las especies de este género fueron valoradas por sus semillas comestibles, y por la pulpa y la cáscara de sus frutos. La selección por tamaño de la semilla pudo haber traído como resultado un mayor tamaño del fruto. La domesticación se caracterizó por la selección por forma, pulpa poco amarga y almidonosa, semillas grandes y pocas, y frutos grandes con cáscara no lignificada. La selección por frutos no amargos fue el paso principal en la domesticación del zapallo. Las semillas fueron probablemente la primera parte usada como comida, obtenidas generalmente de un fruto amargo con semillas no amargas (Bisognin, 2002).

Evidencias sobre las relaciones fitogeográficas y los hospedantes parásitos, sugieren al centro y sur de México como posibles áreas de origen del género (Singh, 1990). Holle (1983) menciona que hay varias colecciones disponibles de germoplasma en México, Colombia, Brasil, Perú y Costa Rica, aunque se han hecho poco esfuerzos para recolectar recursos genéticos en forma sistemática o como selecciones locales. Singh (1990) concluye que según nuevas evidencias arqueológicas y genéticas, el género *Cucurbita* es nativo tanto de Norteamérica como de Sudamérica; que de las especies cultivadas, *C. maxima* y probablemente *C. ficifolia* son nativas de Sudamérica, mientras que *C. argyrosperma*, *C. pepo* y *C. moschata* son nativas de Norteamérica; y que *C. moschata* es probablemente el taxón ancestral más acertado.

Relaciones filogenéticas

Las relaciones filogenéticas de las especies de *Cucurbita* han sido estudiadas sobre la base de caracteres morfológicos (Whitaker y Davis, 1962; Bisognin, 2002), citológicos (Yamane, 1950; Weiling, 1953) y moleculares, como la composición de isoenzimas (Puchalski y Robinson, 1978; Bisognin, 2002), de proteínas (Castro *et al.* 2006) y el análisis de ADN (Leclerc y Siegel, 1987; Singh, 1990; Pasha y Sen, 1998; Baranek *et al.* 2000; Sisko *et al.* 2003).

Weiling (1953) fue uno de los primeros en examinar este género citológicamente, informó que éste tiene 20 pequeños cromosomas (número gamético) en forma de bastones, y sugirió que las especies de *Cucurbita* son poliploides secundarios con un número básico de $x=10$, y que las especies cultivadas anuales; *C. pepo*, *C. argyrosperma*, *C. moschata* y *C. maxima*; tienen genomas idénticos. Asimismo, el constante y relativamente alto número cromosómico ($2n: 40$) junto con el patrón del complejo de isoenzimas sugieren un origen alopoliploide del género (Bisognin, 2002).

Las especies cultivadas están aisladas reproductivamente unas de otras por barreras genéticas (Singh, 1990; Robinson, 1999). Diversos estudios indican que estas especies se originaron de diferentes grupos genéticos. Singh (1990) informa que *C. moschata* se cruza tanto con las especies de los grupos mesofíticos como xerofíticos de este género, y sugiere que es el vínculo conectivo entre las especies silvestres y cultivadas. Robinson (1999) señala que si se comparan las relaciones de las cuatro especies cultivadas anuales a una rueda, *C. moschata* sería el centro y las otras especies serían los rayos. Asimismo Bisognin (2002) destaca que *C. moschata* es la más variable y estrechamente relacionada a las otras especies del género y está cerca de los ancestros comunes del género, debido a su alta compatibilidad interespecífica.

Con respecto al uso de *C. moschata* en cruzamientos con *C. maxima*, en la figura 1.2 puede observarse un dendrograma (modificado de Athanasios *et al.* 2009) basado en la distancia genética (Método UPGMA) que muestra la estrecha relación entre taxones de *C. maxima* y *C. moschata*, esta distancia se calculó en base al análisis de caracteres morfofisiológicos y marcadores moleculares. En general *C. moschata* es muy eficaz como donante de polen (Della Gaspera, 2005), aunque no así como línea madre; en este sentido, Sisko *et al.* (2003) reportaron que cuando se usa *C. moschata* como madre aparecen plantas letales y semillas

vanas. También Baggett (1979) obtuvo resultados similares al hacer cruzamientos recíprocos entre *C. moschata* y *C. pepo*.

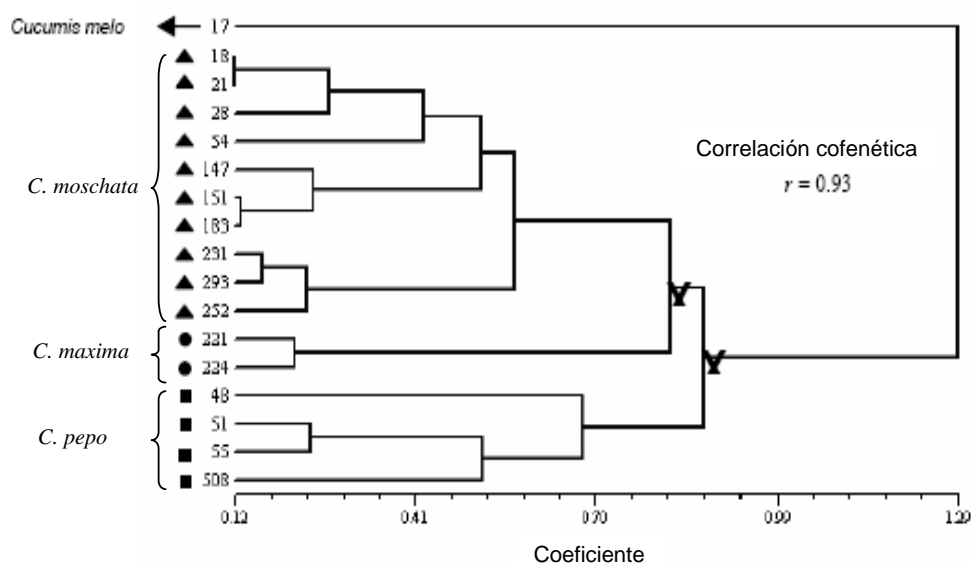


Figura 1.2: Dendrograma que muestra el agrupamiento de 10 entradas de *C. maxima*, 2 de *C. moschata* y 4 de *C. pepo* (método UPGMA) (Modificado de Athanasios *et al.* 2009).

Estos estudios fundamentan el uso de *C. moschata* en cruzamientos interespecíficos, ya sea para transferir sus propias características deseables, como así también como especie “puente”, es decir, para transferir genes deseables de progenitores silvestres o de genotipos cultivados relacionados, si las especies presentan dificultad para cruzarse. (Shifriss y Cohen, 1974; Whitaker y Robinson, 1986; Robinson, 1999).

Estructuras florales

Las flores de las especies de *Cucurbita* son unisexuales, grandes, vistosas, de color amarillo o crema, y en general aparecen solitarias en las axilas de las hojas. La corola es campanulada y junto al cáliz forma un tubo basal de perianto. (Figura 1.3) El número de flores estaminadas por planta excede siempre al de flores carpeladas. Éstas aparecen anticipándose a ellas y se localizan cerca del centro de la planta (Hayward, 1938, Whitaker y Robinson, 1986).

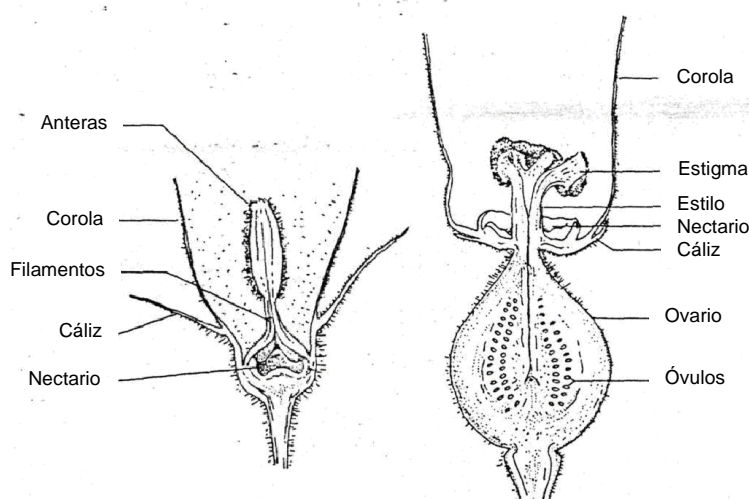


Figura 1.3: Flores de *Cucurbita*. Izquierda: flor estaminada, derecha, flor carpelada. (Modificado de Whitaker y Robinson, 1986).

Flor estaminada

Las partes de la flor estaminada aparecen en la siguiente secuencia: lóbulos de los sépalos unidos entre sí, corola gamopétala, estambres unidos por las anteras y filamentos (sinfiandros) y finalmente de pistilodios. Presenta tres estambres unidos, uno de ellos es más pequeño, con una sola teca; mientras que los otros dos estambres grandes tienen dos tecas conspicuas. Cada uno de los estambres grandes está opuesto a los lóbulos de los pétalos, mientras que el estambre pequeño permanece intermedio entre los lóbulos de pétalos y sépalos. Los filamentos son simples pero los estambres están más o menos unidos por sus anteras, que forman como una maraña vermiforme, pues las tecas tienen plegamientos flexuosos. Tres pequeños lóbulos alternados con los de los estambres forman un pistilodio trilobado en la base del tubo de perianto. (Figura 1.4) (Hayward, 1938; Whitaker y Davis, 1962).

En *Cucurbita* la dehiscencia de la antera precede a la apertura de la flor y la flor estaminada se abre primero que la carpelada. El polen de las cucurbitáceas cultivadas es pegajoso y no es llevado muy lejos por el viento. La polinización natural en las especies de *Cucurbita* es usualmente hecha por abejas del género *Peponapis*. En *C. moschata* la antesis es completa a las 10,00 AM, la dehiscencia de las anteras se produce un poco antes que la apertura de la flor y es acompañada por la receptividad en el estigma de la flor carpelada. La temperatura óptima para este proceso es de 13 - 18 ° C. La producción de polen es abundante, pero el polen es pegajoso debido al cemento polínico o *pollenkitt*, película oleosa que rodea los granos de polen de gran parte de las especies de polinización entomófila. El

pollenkitt está compuesto de pigmentos, principalmente carotenoides, es disuelto por solventes lípidos y más fácilmente observado en material fresco (Shridar y Singh, 1990; Sharma y Lal, 1998; Nepi y Franchi, 2000).

Los caracteres morfológicos del polen se estudian desde cinco aspectos: apertura, ornamentación de la exina, estratos de la exina, tamaño y forma. El polen de *C. moschata* y de *C. maxima* son similares, ambos son esferoidales, pantoporados, con la superficie de la exina espinulada y de grosor similar (1,8 μm). *C. moschata* presenta además poros elípticos de 24 μm de diámetro, y su tamaño es de 132 a 249 μm , un poco mayor que el de *C. maxima*, que tiene de 17 a 88 μm (Shridar y Singh, 1990; Nair y Satheesh, 1998).

La célula madre del polen se divide por meiosis para formar una tétrada de micrósporas haploides. Cada micróspora se divide por mitosis en 2 células haploides. Cuando el grano de polen o microgametofito sale de la antera ya ha sufrido internamente una mitosis y es binucleado, y contiene una célula vegetativa grande y una célula generativa pequeña. Para Dathan y Singh (1990) éstos se dispersan en estado bicelular, aunque también se menciona que la célula generativa puede estar ya dividida en dos células, una para fecundar la ovocélula y la otra para fecundar la célula media o endospermogénica (Singh y Dathan, 1998, Nepi y Franchi, 2000).

Flor Carpelada

Las partes de la flor carpelada aparecen en el siguiente orden: sépalos, pétalos, estaminodios y carpelos. La flor carpelada tiene ovario ínfero, el tubo del cáliz termina en 5 lóbulos, la corola campanulada también es 5 lobada y de color amarillo. Los estambres son rudimentarios y forman 3 estaminodios, uno de ellos más pequeño. Cada uno está localizado en forma opuesta al lóbulo del pétalo, y también presenta un nectario anillado entre la base del tubo de perianto y el estilo (Figura 1.4) (Whitaker y Davis, 1962).

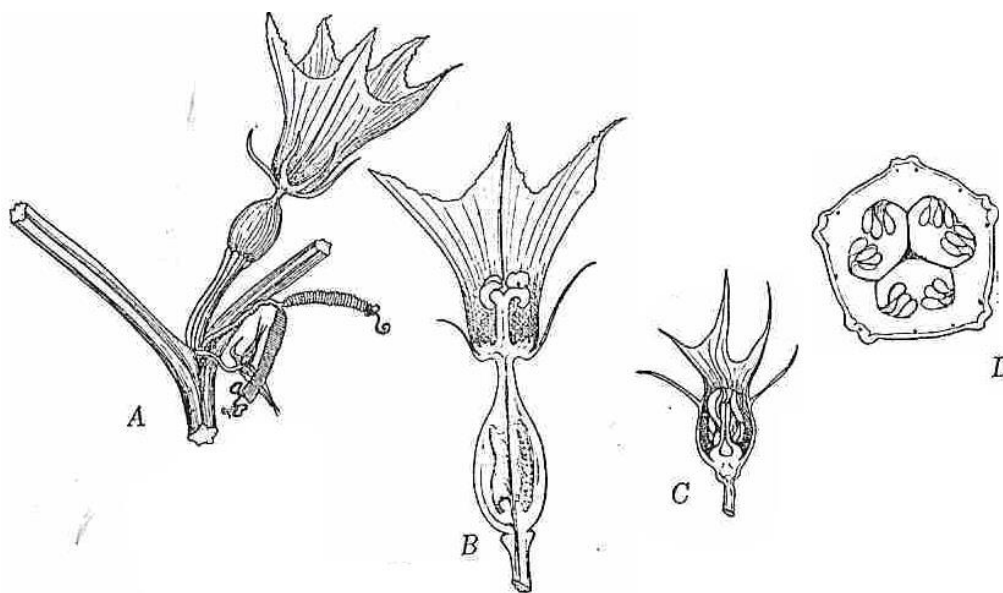


Figura 1.4: Flores de *Cucurbita*. A: Flor carpelada, forma de inserción en la planta, B. Sección longitudinal mostrando el carácter epígino, C. Sección longitudinal de una flor estaminada mostrando el pistilo abortivo, D. Sección transversal de un ovario tricarpelar mostrando la placentación (Modificado de Hayward, 1938).

El estigma está formado por los extremos libres de los carpelos, y la superficie receptiva corresponde a la cara interna (Pozner, 1993), donde se desarrollan apéndices papilosos bilobados o divididos, que se separan y aparecen en lóbulos divergentes al estilo. Cada lóbulo corresponde a una de las divisiones del estilo (Hayward, 1938). La receptividad del estigma es máxima en el momento de la antesis y el estigma permanece receptivo por cerca de 20 horas (Guha y Sen, 1998).

El estilo es corto y delgado, allí cada carpelo está usualmente plegado y unido lateralmente con los carpelos contiguos, y se encuentra recorrido por un canal de sección radiada, en donde el número de planos radiales se corresponde al número de carpelos. En su recorrido conecta la superficie del estigma con una región estéril del gineceo asociada al hipanto, que se extiende dentro del ovario y suele tener la misma estructura radiada que el canal estilar (Pozner, 1993). (Figura 1.5).

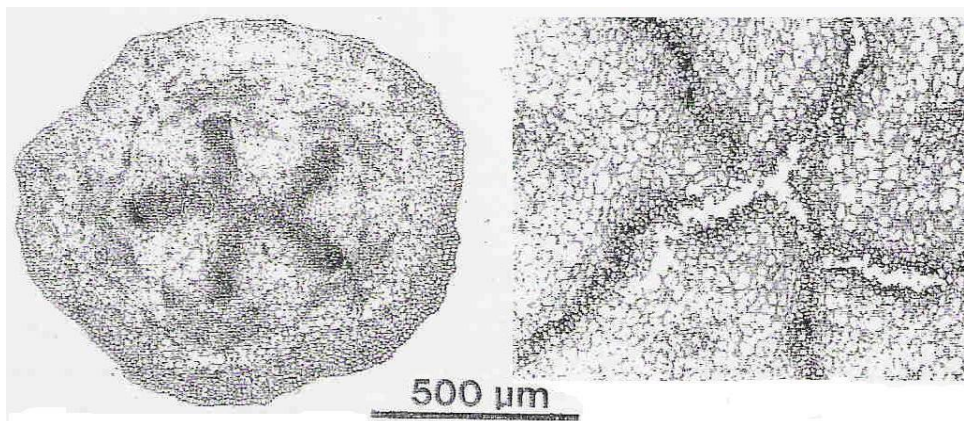


Figura 1.5: A la izquierda, corte transversal de estilo con el tejido de transmisión de sección radiada. A la derecha, corte transversal de la parte superior del ovario; nótese el tejido de transmisión lisado por los tubos polínicos. (Especie *Cucurbitella duriaei*, modificado de Pozner, 1993)

La región fértil del gineceo, el pistilo, tiene 3 carpelos, los cuales forman un ovario trilobular. Ocasionalmente puede tener 4 ó 5 carpelos, que se corresponden con 4 ó 5 celdas en el ovario. Para Singh y Dathan (1998) el ovario es tricarpelado y unilocular, con tres placentas masivas, bifidas o en forma de “T”. Pozner (1993) señala que los lóculos carpelares son “virtuales” pues los rudimentos seminales ocupan todo el espacio de cada lóculo, encontrándose en íntimo contacto con la cara interna del carpelo, de esta manera cada rudimento seminal queda encerrado en una cámara o nicho alojados dentro del carpelo. Cada carpelo lleva 4 hileras de óvulos, que derivan de dos hileras de cada placenta. El límite entre los carpelos se pierde por una fusión congénita de sus epidermis. Los óvulos nacen en los flancos placentarios (Figura 1.6) (Whitaker y Davis, 1962; Pozner, 1993).

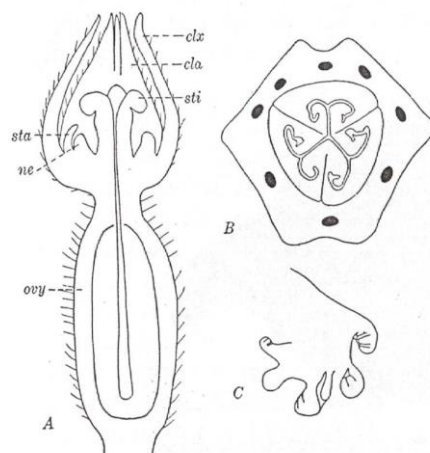


Figura 1.6: A: Sección diagramática de una flor carpelada joven de *Cucurbita* mostrando el ovario epígino. B: sección transversal de un ovario tricarpelar mostrando la placentación. C: Diagrama ilustrando la placenta, el origen de los óvulos y su desarrollo comparativo. cla: corola, clx: cáliz, ne: nectario, ovy: ovary, sta: estaminodios, sti: estigma. (Modificado de Hayward, 1938)

El rudimento seminal es anátropo, bitegumentado y crasinucelado. El extremo micropilar de la nucela se halla modificado formando un pico nucelar, que hace que la nucela tenga forma de botella. (Singh y Dathan 1998). El pico nucelar es una estructura cilíndrica y alargada, cuyo extremo distal está en contacto con la desembocadura interna del canal de la micrópila. La micrópila es en general un canal estrecho de 5 μm de diámetro cuya longitud puede variar y esta delimitada por el tegumento interno. Este tegumento es de menor grosor que el externo y es de duración efímera, ya que en la antesis comienza a colapsarse desde la calaza hasta la micrópila. Dentro del pico nucelar las células muestran un ordenamiento en hileras, mientras que en la nucela tienen una disposición en hileras de células con disposición radiada que concurren en el saco embrionario (Figura 1.7) (Pozner, 1993).

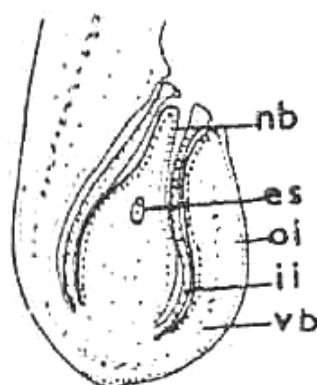


Figura 1.7: Sección longitudinal de un óvulo de *Cucurbita* fecundado mostrando el pico nucelar y el saco embrionario. nb: pico nucelar, es: saco embrionario, oi: tegumento externo, ii: tegumento interno, vb: haz vascular (Modificado de Singh y Dathan, 1998).

La célula madre del saco embrionario se distingue de las restantes células por su mayor desarrollo general y se divide por meiosis en una tétrada de megásporas, de las cuales 3 degeneran o permanecen como células nucleares, quedando funcional la más próxima a la calaza. La megáspora calazal forma el saco embrionario, que luego de 3 ciclos cariocinéticos es 8-nucleado. Posteriormente ocurre la citocinesis y quedan delimitadas 3 antípodas, dos sinérgidas, la ovocélula y la célula media binucleada (Dathan y Singh, 1990; Pozner, 1993; Singh y Dathan, 1998).

Polinización y crecimiento del tubo polínico

La polinización ha sido estudiada en las Cucurbitáceas para aumentar los rendimientos de los frutos. El éxito de la polinización está relacionado, entre otros, a

la viabilidad del polen, ya que cuando el polen maduro sale de la antera, normalmente tiene un corto tiempo de vida (Richards, 1997). Las especies de polinización entomófila, como las del género *Cucurbita*, presentan polen con mayor tiempo de viabilidad. La viabilidad está también relacionada con características ambientales como humedad y temperatura (Nepi y Pacini, 1993).

La polinización inicia una serie de reacciones que llevan a la fertilización y el desarrollo de las semillas y del fruto. En el proceso de fecundación natural, cuando el grano de polen alcanza la superficie del estigma, éste pasa por las etapas de adhesión e hidratación, que culminan con la emisión del tubo polínico. En las Cucurbitáceas, como en muchas otras plantas, se requiere sacarosa para la germinación y el crecimiento del tubo polínico. También el boro y el calcio aumentan el índice de germinación y de crecimiento del tubo polínico (Richards, 1997; Guha y Sen, 1998).

Las flores son polinizadas breve tiempo después de la antesis, y los granos de polen germinan en el estigma unas pocas horas después de la polinización. Después de 24 horas, los tubos polínicos alcanzan el ovario y algunos incluso penetran la nucela y alcanzan el saco embrionario. Al día siguiente la fertilización ha tenido lugar (Richards, 1997).

En su trayecto, el tubo polínico interactúa con el tejido estigmático, el tejido de transmisión del estilo, el tejido de transmisión del ovario, el tejido nucelar y las sinérgidas. En el estilo, el tubo polínico continúa su crecimiento intercelularmente en los espacios dentro del largo tejido de transmisión estilar. El centro del estilo está relleno con tejido de transmisión, entre los cuales los tubos polínicos crecen hacia los óvulos (Richards, 1997). Los tubos polínicos en las Cucurbitáceas desarrollan un crecimiento ectotrópico desde el estigma hasta el rudimento seminal (Pozner, 1993).

La tasa de crecimiento del tubo polínico es un aspecto utilizado para medir la aptitud de las funciones masculinas en plantas hermafroditas (Hayes *et al.* 2005). Johannsson y Stephenson (1998) estudiaron el desempeño del polen de *Cucurbita pepo* y destacaron que un microgametófito (grano de polen) desarrollado en condiciones óptimas, produce un esporófito (cigota) con mejores caracteres, y que el crecimiento del tubo polínico está influido por factores ambientales, como la temperatura.

Cuando el tubo polínico alcanza el saco embrionario (gametófito femenino), penetra una de las sinérgidas produciendo un tubo de descarga de los espermios o

gametas masculinas dentro de esta sinérgida. Un espermio se fusiona con la ovocélula para originar una cigota $2n$ responsable de formar el embrión de la siguiente generación esporofítica. El segundo espermio se fusiona con los dos núcleos polares de la célula media para formar una célula $3n$, responsable del origen del endosperma (Pozner, 1993). Este mecanismo de doble fecundación provoca que el desarrollo de la semilla dependa en partida doble del progenitor masculino (Puertas, 1992).

Pozner (1993) estudió la fecundación en Cucurbitáceas silvestres, y señaló que dos asuntos han causado la atención de los investigadores en lo que se refiere a fecundación en Cucurbitáceas: la persistencia del tubo polínico dentro del pico nucelar aún mucho después de la fecundación y el comportamiento particular del tubo polínico, que se manifiesta en la formación de una gran ampolla o bolsa dentro del pico nucelar del rudimento seminal. Con respecto al primero, Whitaker y Davis (1962) también mencionan el pronunciado alargamiento del tubo una vez que entra en la nucela y refieren que cuando el tubo polínico viaja a través del pico nucelar destruye mucho del tejido nucelar, y parte de los tegumentos internos.

Con respecto al segundo aspecto, es decir, el peculiar crecimiento del tubo polínico que se expande en una ampolla en el pico nucelar, Singh y Dathan (1998) señalan que el tubo polínico tiene un ancho uniforme y que esta dilatación puede observarse antes o después de la fertilización en muchos casos (Figura 1.8).

Hayward (1938) indicó que en algunos casos el tubo polínico se divide en brazos que atraviesan la nucela, el tegumento interno y mantienen una íntima conexión con las capas internas del tegumento externo. Datos más recientes, como los de Singh y Dathan (1998), refieren que el tubo polínico generalmente no es ramificado, aunque se han observado tubos polínicos ramificados en *Cucurbita* y *Cucumis*. Este comportamiento fue explicado como una función haustorial de translocación de material nutritivo por el tubo polínico (Hayward, 1938), aunque no se trataría de una función haustorial pues después de la fecundación el tubo polínico carece de núcleo y es una célula próxima a la muerte. En opinión de Pozner (1993) este comportamiento está relacionado a la competencia entre los tubos polínicos por los rudimentos seminales.

El núcleo sifonogénico no solo tiene un papel importante en el acarreo de las gametas masculinas sino también parece participar activamente en la formación del tubo de acoplamiento y el tubo copulador, asociado a las estructuras fibrilares que se ven dentro del extremo del tubo durante la primera de esas etapas. Las

observaciones del aparato filar en la zona en donde penetra el tubo copulador, antes y después de la descarga, sugieren que el tubo copulador atraviesa el aparato filar no totalmente por una acción lítica, sino por una presión mecánica que éste ejerce sobre el aparato filar provocando un desgarro en la pared de la sinérgida. Y en el caso de las especies estudiadas por Pozner (1993) las gametas masculinas se descargan junto con el núcleo sifonogénico (Figura 1.8).

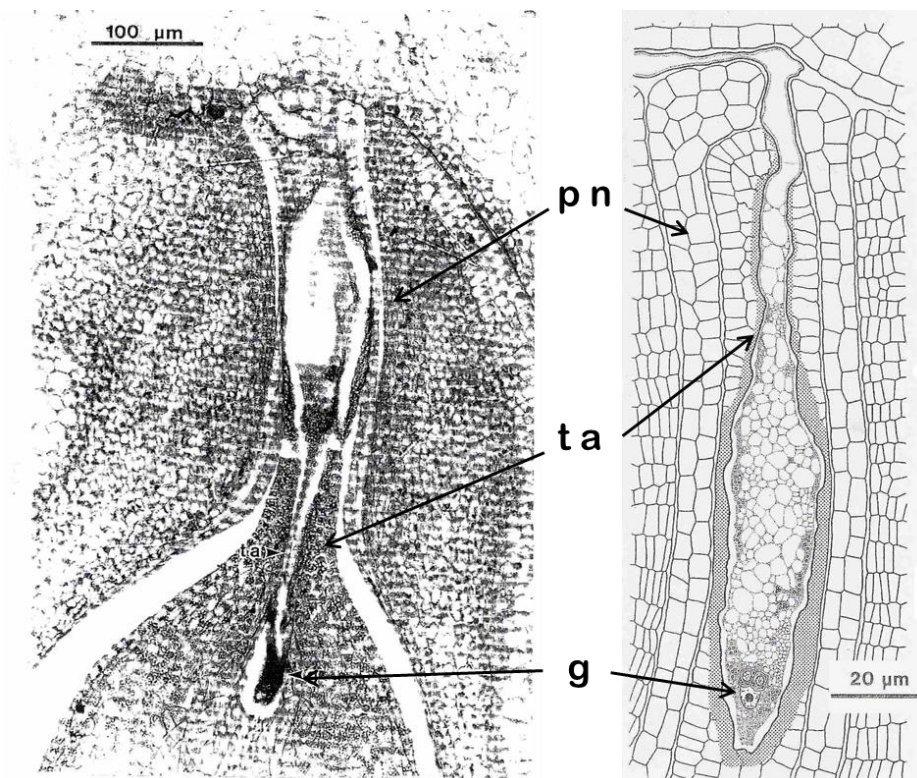


Figura 1.8: Tubo polínico en el pico nucelar del óvulo, se observa la zona lisada en el pico nucelar (pn), el tubo de acoplamiento (ta) dentro del óvulo y las gametas (g) en la porción calazal del tubo. (Especie *Cayaponia citrullifolia*, modificado de Pozner, 1993).

La polinización y posterior fertilización desencadena procesos metabólicos que dan lugar a la producción de auxinas, giberelinas y citocininas que tienen acción en el cuajado de frutos y su crecimiento. Casi todas las Cucurbitáceas necesitan de auxinas para el crecimiento del fruto, tanto que la aplicación de estas hormonas pueden substituir totalmente el proceso de polinización. El estímulo viene no sólo del polen, sino también del ovario. La polinización acelera la tasa de síntesis de auxina (Guha y Sen, 1998).

Pozner (1993) menciona que en el estigma se favorece la hidratación del andrófito o grano de polen, y podría facilitar el acceso directo de distintas sustancias estigmáticas a la célula sifonogénica, por lo que un eventual mecanismo de incompatibilidad gametofítica podría actuar durante la hidratación del andrófito

antes de que éste germine, simulando la acción de un mecanismo de incompatibilidad esporofítica.

Con respecto a los mecanismos de auto incompatibilidad en Cucurbitáceas, Pozner (1993) interpreta que el gran número de fecundaciones rechazadas y la imposibilidad de obtener semillas, se debe a la existencia de un mecanismo de incompatibilidad que actúa tardíamente a nivel del rudimento seminal o de las gametas mismas, puesto que las etapas de acoplamiento, copulación y descarga se cumplen en forma normal. En el caso de fecundaciones inviables las gametas femeninas muestran una tendencia al desarrollo partenogenético, quizá inducido por la descarga del tubo polínico. Esta tendencia partenogenética se manifiesta en varias especies de esta familia, específicamente de los géneros *Bryonia*, *Cucurbita*, *Luffa* y *Sicyos* (Pozner, 1993).

Implicancias Agronómicas

Cuando la polinización por insectos es usada en la producción de semillas híbridas, son importantes los factores que influyen en la actividad de éstos. Con respecto a los aislamientos para prevenir cruzamientos en producción de semillas híbridas, algunos autores recomiendan separar los campos de producción de semillas de diferentes cultivares de *Cucurbita* entre 1000 y 1500 m (Robinson, 1999).

La polinización por cruzamiento natural en Cucurbitáceas varía según la especie, genotipo, actividad de los insectos, distribución de plantas, estación del año, y otros. Bajo la mayoría de estas condiciones, aparecen normalmente suficientes autopolinizaciones como para que se produzca una selección natural que elimina genes letales, y resulta en una pequeña depresión por consanguinidad. No obstante, el genotipo y el ambiente pueden ser manipulados para producir suficiente cruzamiento para hacer eficientemente posible la producción de semillas híbridas (Robinson, 1999).

En cruzamientos planificados, las flores que se utilizan en la polinización manual suelen cerrarse un día antes de la antesis para prevenir la polinización por insectos (Figura 1.9). Las flores masculinas pueden cortarse la tarde anterior y mantenerlas en humedad durante la noche, para coleccionar el polen en la mañana próxima (Figura 1.10). Las flores de las especies de *Cucurbita* se abren temprano en la mañana. Las polinizaciones son generalmente completadas antes de la tarde y las flores polinizadas a mano suelen ser embolsadas (Robinson, 1999). En los

cruzamientos a campo se usa una sola flor masculina para fecundar cada flor femenina (figura 1.11).



Figura 1.9: Acondicionamiento de las flores carpeladas y estaminadas un día antes de la polinización manual.



A

B

Figura 1.10: A: Acondicionamiento de la flor estaminada el día de la apertura de la flor para la polinización. B: Polinización manual



Figura 1.11: Flor polinizada manualmente marcada con una etiqueta.

Fertilización y formación de la semilla

Whitaker y Davis (1962) indican que la fertilización es difícil de observar porque después de entrar en el óvulo, el tubo polínico echa una cantidad de material oscuro en el saco embrionario. Además el tubo polínico persiste después de la fertilización. Esto puede contribuir en parte, al fuerte teñido del saco embrionario en la fertilización. Después de ésta, el endosperma crece rápidamente y es muy grande antes de que el embrión alcance el estado de 2 células.

Según datos más recientes, como los de Singh y Dathan (1998), la singamia usualmente precede la triple fusión de la gameta masculina y los núcleos polares, y luego de ésta, la cigota desarrolla una pared pectocelulósica, y comienza a dividirse, pasando los estados globular y cordiforme. Un poco más tarde se distinguen los meristemas del vástago y de la raíz, y los cotiledones. A partir de esta etapa el embrión crece notablemente en longitud, en especial los cotiledones, digiriendo el endosperma y almacenando los materiales en los cotiledones. En la semilla madura el embrión es recto y la mayor parte de su cuerpo está constituida por los cotiledones reservantes que han digerido la totalidad del endosperma (Pozner, 1993).

La formación del endosperma es de tipo nuclear, ya que se desarrolla como un cenocito en toda su extensión (Singh y Dathan 1998). En cierta etapa del desarrollo cenocítico la porción micropilar del endosperma va formando poco a poco sus paredes celulares en dirección de la calaza. Simultáneamente la porción calazal del endosperma forma un haustorio secundario. Este haustorio calazal mantiene la estructura cenocítica juvenil del endosperma, e invade la cámara formada previamente por la lisis de la nucela (Pozner, 1993).

El desarrollo del endosperma y del embrión no acompaña paulatinamente el desarrollo de la semilla. Luego de la fecundación el rudimento seminal crece hasta alcanzar el tamaño de la semilla madura, pero el endosperma permanece como un pequeño cenocito. El embrión ni siquiera ha alcanzado el estado globular. Cuando se llega a esta etapa del desarrollo embrionario, el endosperma ya posee una porción micropilar celular y una porción calazal cenocítica y haustorial (Pozner, 1993) (Figura 1.12).

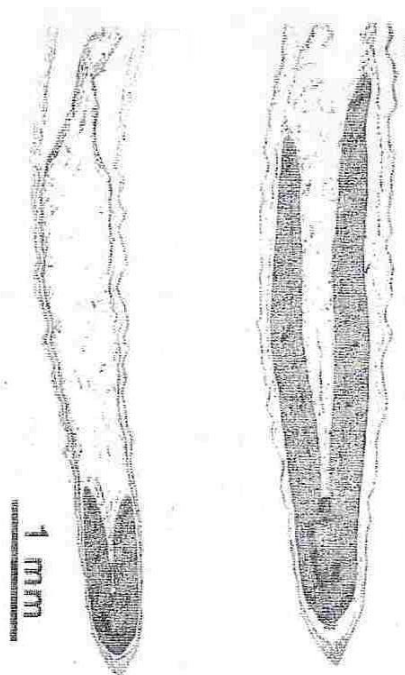


Figura 1.12: Embrión en dos etapas del desarrollo de los cotiledones. Se observa el endosperma consumido por el embrión y los restos de nucela (Especie *Cayaponia citrullifolia*, modificado de Pozner, 1993).

A la madurez el embrión está formado por dos cotiledones chatos y algo carnosos con una vena central prominente, un eje hipocotiledonar corto y romo y un punto de crecimiento cónico muy corto que constituye el epicótilo (Hayward, 1938; Whitaker y Davis, 1962).

Las semillas maduras son grandes, achatadas y ovadas. Anatómicamente la semilla comprende la cubierta seminal, una o dos capas remanentes de perisperma, endosperma y un embrión espatulado. La cubierta seminal está formada por cinco diferentes capas de tejido, las cuales se desarrollan a partir de los dos tegumentos del óvulo anátropo (Singh y Dathan, 1998). El tegumento externo forma las tres capas externas de la cubierta seminal y parte de la cuarta, mientras que la restante deriva del tegumento interno. (Hayward, 1938; Whitaker y Davis, 1962), sin embargo Singh y Dathan (1990, 1998) y Pozner (1993) mencionan que el tegumento externo forma toda la cubierta seminal mientras que el tegumento interno degenera.

Desarrollo de la plántula

Bajo condiciones favorables, la raíz primaria emerge entre las mitades de la cubierta seminal y se extiende en ángulo recto con respecto a la semilla. La raíz primaria crece rápidamente y puede alcanzar 3 cm de longitud al final del tercer día

de la siembra. En ese momento una protuberancia de células parenquimáticas llamada clavija inicia su desarrollo, con un crecimiento lateral en el ángulo formado por el hipocótilo que se encuentra horizontal y la raíz primaria que está vertical. La función de la clavija es la de ayudar en la ruptura de la cubierta seminal y a la exposición de los cotiledones. Al cuarto día la clavija está alargada considerablemente y justo debajo de ella la raíz primaria produce muchas raíces laterales. El hipocótilo inicia su elongación mientras que los cotiledones permanecen dentro de la cubierta seminal (Hayward, 1938; Singh y Dathan, 1998) (Figura 1.13).

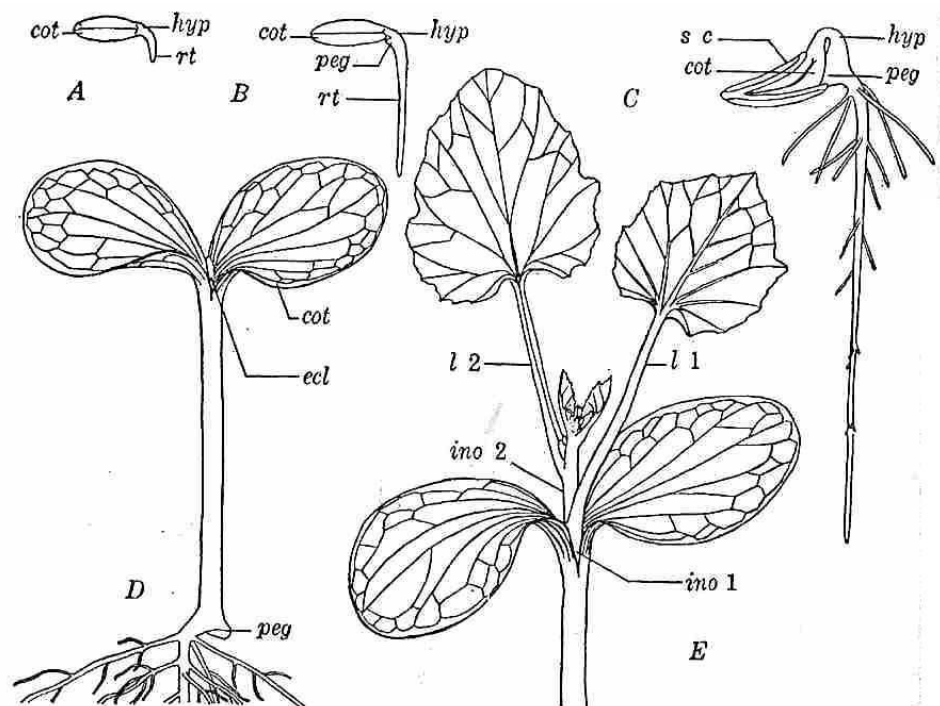


Figura 1.13: Desarrollo de la plántula de *Cucurbita*. A: dos días después de la germinación, se observa el ángulo recto formado por la raíz primaria y la semilla. (La cubierta seminal ha sido removida). B: A los tres días, inicio del desarrollo de la clavija. C: A los 5 días, se observa la función de la clavija de ayudar en la ruptura de la cubierta seminal y en la exposición de los cotiledones. D: A los 8 días, el crecimiento primario de la plántula es completo. E: Plántula desarrollada: se observa la posición de las primeras hojas y las longitudes de los internodios. cot: cotiledón, hyp: hipocótilo, rt: raíz principal, peg: clavija, sc: cubierta seminal, ecl: epicótilo, ino 1: primer internodio, ino 2: segundo internodio, l 1: primera hoja, l 2: segunda hoja. (Modificado de Hayward, 1938)

Hipótesis

- Existen barreras a la fertilización en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.

Objetivo específico

- Identificar si operan barreras precigóticas o postcigóticas en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos a campo se realizaron en la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta INTA, situada en el departamento de San Carlos, Mendoza, Argentina (950 msnm; 33° 42' S y 69° 04' O). Se utilizaron líneas de *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata* cv. Paquito durante tres ciclos de cultivo: 2005/06, 2006/07 y 2008/09.

Los estudios de laboratorio de los materiales recolectados se realizaron en el Laboratorio de Semillas José Cnkro de la EEA La Consulta INTA (La Consulta, Mendoza), en el Laboratorio de Botánica Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Chacras de Coria, Mendoza), en el Laboratorio de Microscopía del Instituto Darwinion (San Isidro, Buenos Aires) y en el Laboratorio de Veterinaria de la EEA San Luis INTA (Villa Mercedes, San Luis).

POLINIZACIÓN MANUAL DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

En la EEA La Consulta INTA se siembran anualmente las líneas madre del híbrido Aconcagua INTA, que se autopolinizan para el mantenimiento de las mismas. *Cucurbita maxima* es utilizada como madre en los planes de mejoramiento, y cuenta en la actualidad con cerca de 91 líneas diferenciadas entre sí por caracteres morfológicos y productivos y cuya selección se inició en 1993. Estas líneas se formaron a partir de 15 frutos iniciales de *C. maxima*, cada uno producido por autofecundación, de una planta distinta. Las semillas fueron plantadas y se seleccionaron individuos por selección genealógica y recurrente. Los caracteres del fruto que se eligieron para hacer la selección fueron espesor de pulpa, sólidos totales, forma del fruto, y otros.

Las líneas seleccionadas de *C. maxima* (♀) se reunieron en 5 grupos según sus características morfológicas y de origen, considerando cada línea como una unidad de muestreo, y se polinizaron las flores pistiladas con una mezcla de polen de flores de líneas de *C. moschata* cv. Paquito. Las líneas de *C. moschata*, utilizadas como padre, son muy similares entre sí y se tomaron como un solo grupo.

Se tomaron muestras de flores polinizadas y frutos correspondientes a tres campañas o ciclos de cultivo: 2005/06, 2006/07 y 2008/09. Las reducciones o aumentos en el número de líneas se deben a la disponibilidad de semillas para esa campaña. (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Agrupamiento de las líneas de *C. maxima* utilizadas en el ensayo.

Grupos maternos	Número de líneas Ciclo 2005/06	Número de líneas Ciclo 2006/07	Número de líneas Ciclo 2008/09
G 1	24	16	14
G 2	10	6	3
G 3	17	8	15
G 4	13	7	2
G 5	19	7	13
Total de líneas	83	44	47
Total de plantas	415	440	329

Los lotes de cada grupo de líneas se sembraron en cada campaña a principios de noviembre. A comienzos de enero del año siguiente se realizó una poda de flores femeninas en el lote de las líneas de *C. maxima* para concentrar la floración en la segunda quincena de enero, junto con una poda de los frutos generados por polinización libre.

La técnica de polinización manual que se utiliza habitualmente en la Estación Experimental de INTA La Consulta es el método de flor directa, que consiste en “asegurar” las flores la mañana anterior a la polinización. Tanto las flores masculinas como las femeninas que se abrirán al día siguiente se atan con un hilo de color, a nivel de la corola, para evitar polinizaciones no deseadas. A la mañana siguiente el operario utiliza el polen de una sola flor masculina para fecundar la flor femenina, corta la flor masculina, luego retira el cáliz y la corola, y pone en contacto el estambre con el estigma de la flor femenina, atando nuevamente su corola e identificando la flor polinizada con una etiqueta.

En los ciclos 2005/06 y 2006/07 se utilizó una mezcla de polen. La mañana en que se realizó la polinización se recolectaron alrededor de 80 flores masculinas, se les retiró el cáliz y corola, se desprendió el polen de cada flor con ligeros golpes de lápiz y se lo recogió sobre una caja de Petri. Luego con un pincel se colocó la mezcla de polen sobre cada flor femenina, atando la corola e identificando la flor. En el ciclo 2008/09 se utilizó el método de flor directa.

En las líneas madres de *C. maxima* se aseguraron alrededor de 30 flores por grupo en el primer año. Como no se disponía de datos para esta especie sobre el momento de recolección de las flores polinizadas, se tuvieron en cuenta las experiencias realizadas en cruzamientos de *Cucurbita* por Quesada *et al.* (1996) y se recolectaron flores a las 8, 12, 24 y 30 h y 2 días luego de la polinización. El segundo año se aseguraron cerca de 20 flores por grupo y se recolectaron frutos a los 3, 4, 5, 10, 11 y 27 días. Se agregaron cruzamientos de *C. maxima* x *C. maxima*, donde se autopolinizaron alrededor de 10 flores, a razón de 2 flores por

grupo materno, recolectados a los 3 y 4 días luego de la polinización, para poder comparar las estructuras encontradas en los óvulos en los tratamientos de autopolinización, en los cruzamientos de *C. maxima* y *C. moschata* y en el cruzamiento recíproco, *C. moschata* x *C. maxima*, es decir *C. moschata* como línea madre. En el ciclo 2008/09 los frutos fueron dejados en la planta hasta su madurez comercial.

Los frutos recolectados fueron llevados al laboratorio y conservados en el fijador líquido FAA (Solución formada por 50 % de alcohol etílico 95%, 35 % de agua destilada, 10% de Formaldehído 40% y 5 % de Acido Acético glacial).

El estilo y el estigma se guardaron enteros, el ovario se cortó transversalmente en rodajas de 0,5-0,6 cm de espesor y se guardaron en frascos de plástico de 100, 200 y 500 ml. Cuando los frutos eran muy grandes para conservarlos enteros, se los cortaba transversalmente, y se separaban y guardaban la totalidad de las semillas.

1. TEST DE VIABILIDAD DE POLEN

Las líneas de *Cucurbita maxima* (♀) reunidas en 5 grupos, se polinizaron con una mezcla de polen de cerca de 60 flores de líneas de *C. moschata* (♂) cv. Paquito, que al ser muy similares entre sí constituyeron un solo grupo.

Se tomaron flores masculinas de *C. moschata* para estudiar la viabilidad del polen. De la misma mezcla de polen utilizada para la polinización manual de la primera campaña se extrajo una alícuota y se la expuso a varios colorantes. En la campaña 2005/06 se probó con Safranina, solución de Lugol y Carmín Acético en solución de vaselina.

Se probaron dos diluyentes: 1-2 gotas de agua y 1-2 gotas de glicerina. Se tomó con un pincel un poco de polen y se lo colocó sobre un portaobjetos. Se colocaron 1-2 gotas del colorante y se agregó 1-2 gotas de cada diluyente. Se observó a la lupa con aumento de 1x. Se buscaron 5 campos al azar y se efectuó la identificación y el conteo del número de granos de polen viable, no viable y subviable. El polen de la primera campaña se guardó en FAA.

En la segunda campaña se tomó de la mezcla utilizada en la polinización manual (alrededor de 50 flores masculinas de *C. moschata*) una muestra de polen, se utilizaron los mismos colorantes anteriores y se probaron dos más: Cloruro de Tetrazolio diacetato al 1 % en agua destilada (Oberle y Watson, 1953) y Colorante de Alexander (Alexander, 1969) (Tabla 1.2).

Según los resultados obtenidos en la primera campaña se optó por utilizar la glicerina como diluyente. También se evaluó el polen de la campaña anterior conservado en FAA utilizando la misma técnica de identificación y conteo.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Los conteos de granos de polen viable, no viable y subviable se consideraron como variables categóricas y se realizó un análisis de contingencia, para la obtención de frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje.

Tabla 1.2: Formulación del Colorante de Alexander (Alexander, 1969)

Componentes	Cantidad
Etanol 95 %	10 ml
Verde de Malaquita 1 % en etanol 95 %	5 ml
Fenol	5g
Acido fucsínico en agua 1 %	5 ml
Naranja G en agua 1 %	0,5 ml
Ácido Acético Glacial	2 ml
Glicerol	25 ml
Agua destilada	50 ml

2. ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS CON CORTES A MANO ALZADA

En el primer año se buscó una técnica de corte a mano alzada para colorear, observar y contar las distintas estructuras. Se ajustaron diversas técnicas.

2.1. GRANOS DE POLEN EN EL ESTIGMA

Se optó por las muestras recolectadas a los 2 días, ya que se habían diferenciado bien los granos de polen germinados y no germinados en el estigma. Se tomaron 2 ó 3 flores de cada grupo de líneas conservadas en FAA y se cortó con un bisturí una rama del estigma. Para ablandar las papilas del estigma se lavó con agua destilada, se colocó en un tubo Eppendorf seco, se agregó Na(OH) 1N, y se llevó a estufa a 60° C durante 2 horas. Luego se retiró, se enjuagó el tubo varias veces con agua destilada y se secó el sobrante con la punta de un papel.

El trozo de estigma se coloreó con 5 ó 6 gotas de colorante de Alexander en cada tubo, de manera de cubrirlo, durante 10 minutos. Se retiró y se recuperó el colorante usado. Se colocó la porción de estigma en una caja de Petri con un poco de agua destilada.

Para observarlo a la lupa se cortó longitudinalmente la rama del estigma y luego transversalmente. Se colocó la luz de la lupa lo más horizontalmente posible para observar la transparencia de los granos de polen.

Para observarlo al microscopio se cortó longitudinalmente la rama del estigma y se tomó con un bisturí una porción lo más delgada posible de ésta. Se colocó en un portaobjetos con una gota de agua (o glicerina 50 %) y se tapó con un cubreobjetos. Se eligieron 5 campos al azar y se identificaron los granos de polen.

El objetivo fue observar y contar el número total de granos de polen germinados y no germinados en cada grupo, para analizarlos estadísticamente y encontrar posibles diferencias entre ellos.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Los conteos de granos de polen germinados, no germinados y subgerminados se consideraron como variables categóricas y se realizó un análisis de contingencia, para la obtención de frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje.

2.2. TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO

Se optó por las muestras recolectadas a los 2 días, ya que se diferenciaban bien los tubos polínicos en la base del estilo. Se tomaron 2 ó 3 flores de cada grupo conservadas en FAA y se cortó transversalmente una rodaja de 5 mM de la base del estilo. Para ablandar los tejidos se colocó la porción de estilo en un tubo Eppendorf seco y se agregó HCl 1 N, se llevó a estufa a 60° C durante 1 hora. Luego se retiró y se lavó el HCl del tubo, se sacó el estilo y se retiró el tejido de la periferia bajo la lupa por medio de agujas, dejando sólo la parte central en forma de estrella. Esta estructura se colocó en un tubo Eppendorf seco, se agregó Na(OH) 1N (4 %), y se llevó a estufa a 60° C durante 4 horas. Se lavó el tubo, se retiró la estrella y se colocó en un portaobjetos.

Para colorear los tubos polínicos, se desplegó y se separó la estrella con dos agujas, de manera de que quede espacio entre las secciones. Se colocó 2 gotas de Colorante de Alexander durante 5 minutos. Se retiró el colorante sobrante absorbiéndolo con la punta de un papel. Se agregó una gota de glicerina al 50 %. Se tapó con un cubreobjetos haciendo un poco de presión y se observó al microscopio.

El objetivo fue observar y contar el número total tubos polínicos en el estilo para cada grupo, para analizarlos estadísticamente y encontrar posibles diferencias

entre ellos. Aunque se pudieron diferenciar los tubos del resto de las estructuras, la gran cantidad de tubos superpuestos y rotos hizo que el conteo fuera muy difícil, por lo que se optó por continuar este estudio acondicionando las muestras para cortarlas con micrótopo, ajustar una técnica de coloración y observarlas al microscopio óptico.

2.3. ÓVULOS DE 2 Y 3 DÍAS DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

Con el objetivo de identificar y contar óvulos fecundados y no fecundados en el ovario, durante 2006 se tomaron 4-5 flores de cada grupo de líneas y se observaron los óvulos a la lupa. Se eligieron flores de 2 y 3 días de polinizadas ya que se obtuvieron muy pocas flores con más de 5 días de polinizadas. En la lupa sin colorantes podían diferenciarse óvulos con el pico nucelar transparente y otros con el pico nucelar oscuro y macizo. Ésto se relacionó a óvulo fecundado y no fecundado respectivamente. Aunque no se tenía una flor autopolinizada conservada para diferenciarla.

En los cortes a mano alzada se tomaron 2-3 rodajas de la parte media del ovario de 4-5 flores por grupo de líneas, de los que se tomaron 13 ó 14 óvulos por flor. A cada óvulo se le hizo un corte longitudinal y se los colocó en la lupa. De éstos se eligieron 10 de cada flor. Se los colocó en un portaobjetos y se observó a la lupa y al microscopio. Se observaron alrededor de 350 óvulos polinizados con *C. moschata*.

Por esta razón durante 2007 se hicieron otros cruzamientos de *C. maxima* x *C. maxima*, para observar la forma y el tipo de degradación del pico nucelar en una polinización natural y poder compararlos con los picos nucleares degradados en un cruzamiento interespecífico. Se tomaron de 2-3 flores autopolinizadas por grupo de líneas, y de cada flor se tomaron varias rodajas de la parte media del ovario, de las que se extrajeron 13-14 óvulos por flor. De éstos se eligieron 10 de cada flor. Se observaron alrededor de 210 óvulos autopolinizados.

Se buscó y ajustó una técnica de corte y coloración. Se cortó transversalmente una sección de una rodaja de la parte media del ovario, de manera de sacar dos medios carpelos. Para ablandar los tejidos y separar los óvulos, se colocó la porción de ovario en un tubo de ensayo seco y se agregó HCl 1N, se llevó a estufa a 60° C durante 1 hora. Luego se retiró y se lavó, se colocó en una caja de Petri y con dos agujas se separaron 10 óvulos.

Se retiró el tegumento de los óvulos, se colocó en un portaobjetos excavado y se agregó 2 gotas de Colorante de Alexander durante 5 minutos, se tapó con un cubreobjetos y se observó microscopio.

Para poder confirmar que los picos nucelares vistos degradados y transparentes a la lupa corresponden a óvulos fecundados, se optó por continuar este estudio acondicionando las muestras para cortarlas al micrótopo, ajustar una técnica de coloración y observarlas al microscopio óptico.

3. ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS CON CORTES AL MICRÓTOMO

Con el objetivo de identificar con más detalle algunas estructuras que no pudieron estudiarse en cortes a mano alzada, se ajustó una técnica para la obtención de preparados que cortados con el micrótopo, pudieran ser observados al microscopio óptico.

Se preparó material de estilos y ovarios de los 5 grupos de líneas, de las autopolinizaciones, y de los cruzamientos recíprocos, de 2, 3, 4, 11 y 27 días luego de la polinización, de los ciclos 2005/06 y 2006/07, los que dieron un total de 97 preparados (Tabla 1.4). Se ajustó una técnica de acondicionamiento que consta de 4 pasos:

- Deshidratado.
- Inclusión en parafina.
- Cortes con micrótopo.
- Coloración.

3.1. DESHIDRATACIÓN

El objetivo de este paso fue el de acondicionar el material vegetal para ser incluido en parafina. Para esto es necesario deshidratar el material en forma paulatina (agregado de alcohol y xileno en concentraciones crecientes) para reemplazar los lugares ocupados por el agua con parafina. Debe hacerse en un lugar limpio o si se dispone, bajo una campana, ya que si la parafina está sucia no se logran observar los cortes. Se debe disponer de una botella plástica para los descartes de líquido y un frasco para los descartes de parafina. El protocolo seguido en el Instituto Darwinion es el siguiente:

1. Cortar una porción de 5 mM de la parte basal del estilo. En el caso de los óvulos cortar medios carpelos que contengan al menos 3 óvulos, de 5 mM

de espesor. Sin lavar, colocar en un frasco pequeño de vidrio, con etanol 70 %. Dejar 2 horas.

2. Vaciar el líquido anterior y colocar etanol 80 % por 2 horas.
3. Vaciar el líquido anterior y colocar etanol 96 % y unas gotas de fast green o de algún azul (azul de metileno, azul de algodón, etc) por 2 horas.
4. Vaciar el líquido anterior y colocar etanol 100 % por 2 horas (tener cuidado de usar una pipeta seca para no hidratar el material).
5. Vaciar el líquido anterior y colocar etanol 100 % por 2 horas (llenar bien los frascos y no dejar más de ese tiempo).
6. Vaciar la mitad del líquido anterior y agregar xileno 100 %, dejar 2 horas (se forma una mezcla de xileno 100 % : etanol 100 % en proporción 1:1).
7. Vaciar el líquido anterior y agregar xileno 100 % por 2 horas.
8. Repetir el paso 7.

En este paso el material debe quedar celeste translúcido, color ámbar o caramelo, de aspecto vidrioso, si no es así volver a repetir desde el paso 4, ya que esto indica que el material no se deshidrató convenientemente.

Colocar parafina en un vaso en estufa a 60 ° C y taparlo con una caja de Petri, (la parafina desprende vapores que estropean la estufa)

9. Sacar una parte del xileno y reemplazar por perlas de parafina (no deben tener tierra), dejar 2 horas.
10. Colocar los frascos en una estufa a 60 ° C, por 2 horas.
11. Sacar una parte de la mezcla fundida y reemplazar por parafina fundida, dejar 2 horas.
12. Repetir. (Se va poniendo poca parafina, sólo para cubrir el material, ya que esta parafina se descarta).
13. Repetir (Se puede repetir una vez más).
14. Sacar toda la mezcla fundida y reemplazar por parafina pura fundida, dejar 2 horas.
15. Repetir.

3.2. INCLUSIÓN EN PARAFINA

Para este paso se debieron preparar:

- Cajas de papel (se hacen con rectángulos de papel con un lado plastificado) y trozos de papel para las rotulaciones.
- Parafina fundida.
- Bandeja de bordes bajos con agua y hielo.

- Ansa o aguja gruesa (para calentar).
- Mechero de alcohol.
- Trozo de madera (para mantener la temperatura)

Sobre el trozo de madera se colocan las cajas de papel y se vacía el contenido de los frascos en las cajas, se agrega la parafina fundida hasta cubrir bien el material, con el ansa caliente se acomodan los trozos de material y se agrega el rótulo. Los trozos que van en el mismo portaobjetos se colocan próximos o agrupados. Se ponen las cajas en la bandeja de agua y hielo, ya que debe solidificar rápido, cuando se solidifique se hunde la caja en el agua, cuando está bien sólido se despega y se desecha el papel.

Es importante que la parafina se solidifique rápido, para que se cristalice correctamente. Se obtuvieron así jabones rotulados que pueden conservarse por mucho tiempo.

3.3. CORTES CON MICRÓTOMO

Se deben tener preparados pequeños tacos de madera. Se cortaron los jabones en los trozos que iban al micrótomó, se calentó el jabón del lado más alejado del material y con el ansa se pegó al trozo de madera.

Se utilizó un micrótomó rotatorio, de navaja fija y tacos móviles. Se utilizó:

- Albúmina de Meyer (Mezclar una clara de huevo fresca y glicerina 1:1, agregar 1 g de salicilato de sodio, batir y filtrar, guardar en un frasco).
- Estufa a 40° C.
- Portaobjetos con bordes esmerilados.
- Cubreobjetos.
- Pincel y espina.
- Cartón negro.

Procedimiento:

El protocolo utilizado en el Instituto Darwinion es el siguiente:

1. Tallar los tacos de manera que el bloque de parafina quede de forma trapezoidal, con las bases paralelas a la navaja, y la base mayor sea la que reciba el golpe de la navaja, para que las tiras sean fáciles de colocar en los portaobjetos.
2. Colocar el taco en la mordaza, con los tornillos dejarlo lo más perpendicular posible a la navaja.
3. Elegir el grosor de corte, en este caso de 10 a 20 micras.

4. Elegir el ángulo de la navaja (si está muy perpendicular se rompen los cortes; si está muy paralelo, se arrastran o salen discontinuos) Se trabajó con 10°.
5. Hacer los cortes girando el tornillo (si los cortes se enrulan al salir, la navaja se desafiló o la parafina está muy fría) Retroceder el tornillo cuando ya no avanza.
6. Retirar con un pincel y una espina de madera las tiras de preparado y se las coloca en un cartón negro con la parte brillante hacia abajo.
7. Extender Albúmina de Meyer en el portaobjetos y agregar unas gotas de agua destilada.
8. Colocar las tiras con la parte brillante hacia abajo, no poner muchas para poder cubrirlos bien con el cubreobjetos.
9. Poner los preparados sobre la estufa para que los cortes se estiren bien.
10. Observar al microscopio, los cortes se ven por un tiempo breve.

3.4. COLORACIÓN

Se utilizó la técnica de coloración de Safranina-Fast green (Ruzin, 1999)

Procedimiento:

1. Desparafinizar en Histo-Clear o Xileno y llevar los portaobjetos hasta EtOH 70 % (Alcohol etílico) usando una serie graduada de EtOH (Xileno, Xileno : EtOH, EtOH 100 %, 96 % y 70%).
2. Teñir con solución de Safranina O por 2-24 horas. En este caso se usaron 2 horas.
3. Eliminar el exceso de coloración con agua destilada por unos momentos. Se puede utilizar agua corriente teniendo cuidado de no desalojar las secciones. Una buena técnica es agregar el agua a través de un tubo flexible en la parte inferior del recipiente de coloración.
4. Deshidratar 10 segundos con EtOH 95 % más ácido pícrico al 0,5 %. El ácido pícrico causa la diferenciación de la Safranina O.
5. Lavar de 10 segundos a 1 minuto (no más) en EtOH 95 % + 4 gotas de hidróxido de amonio por 100 ml para parar la acción del ácido pícrico. El lavado excesivo de EtOH quitará totalmente la coloración de Safranina O.
6. Sumergir brevemente (10 seg) en EtOH 100 % para acabar la deshidratación.
7. Contrateñir 10-15 segundos en solución de Fast Green FCF. Se prueba la coloración en un solo portaobjetos y se diluye el Fast Green si está muy concentrado.

8. Como la solución de Fast Green se evapora con el uso, agregar solvente adicional, no la solución completa, para mantener la concentración correcta.
9. Lavar el exceso de Fast Green con la “Solución clarificadora usada” (ver tabla 1.3). Se puede utilizar un tarro de Coplin para algunos portaobjetos o un plato de coloración para muchos portaobjetos.
10. Lavar los portaobjetos en Solución clarificadora sumergiendo las secciones por 5-10 segundos.
11. Quitar la Solución clarificadora sumergiendo por algunos momentos en xileno más 2-3 gotas EtOH 100 % (para quitar el agua residual).
12. Hacer dos cambios de xileno.
13. Mantener los portaobjetos en la solución final de xileno mientras se los cubre de uno a la vez. No permitir que los portaobjetos se sequen antes de poner el cubreobjetos, porque puede haber daño de tejido.

Tabla 1.3: Formulación de los compuestos utilizados en la coloración de Safranina-Fast Green (Ruzin, S. 1999)

Solvente de Safranina O	Solvente de Fast Green
Metil cellosolve.....2 vol	Metil cellosolve.....1 vol
EtOH 100%1 vol	EtOH 100%.....1 vol
Agua destilada1 vol	Metil salicilato.....1 vol
Acetato de sodio.....1% p/v	
Formol 2% v/v	
Solución colorante Safranina O	Solución colorante Fast Green FCF
Safranina O1.0% p/v	Fast Green FCF.....0,05% p/v
Solución clarificadora	Solución clarificadora usada
Metil salicilato.....2 vol	“Used” clearing solution.....2 vol
EtOH 100%.....1 vol	EtOH.....1 vol
Xileno.....1 vol	Xileno.....1 vol

Para poder observar estos preparados se debió esperar unos meses hasta que el xileno se evapore completamente. Pasado ese tiempo se lavaron los portaobjetos con agua y detergente.

Se hicieron 97 preparados, como se indica en la tabla 1.4.

Tabla 1.4: Cantidad de portaobjetos preparados.

Grupos de líneas	Días después de polinización	Cantidad de preparados	
		Óvulos	Estilos
Grupo 1	2	4	2
	3	4	2
Grupo 2	2	4	2
	3	4	2
Grupo 3	2	7	2
	3	4	2
Grupo 4	2	4	2
	3	4	2
Grupo 5	2	4	2
	3	4	2
Autopolinizados	3	9	2
	4	4	
Recíprocos		5	
Híbridos	11	10	
	27	4	
Subtotal		75	22
Total de preparados			97

En el Instituto Darwinion se observaron los preparados y se sacaron fotografías en un microscopio óptico Nikon FXA con sistema fotográfico digital Nikon NIS-element.

De los cortes de óvulos se analizaron todos los portaobjetos preparados, se eligieron las imágenes más representativas, se analizaron las estructuras vistas y se discutieron los posibles hechos ocurridos en la polinización.

De los cortes de bases de estilos se optaron por los de 3 días de polinización, donde se tomaron 3 al azar, tanto de los grupos de líneas como de las autopolinizaciones y se contó el número total de tubos polínicos con citoplasma que atraviesan el estilo. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Se realizó un diseño anidado, en donde el factor preparado se encuentra anidado dentro del factor grupo, según el modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{j(i)} + \varepsilon_{ijk}$$

En donde:

y = variable dependiente para un preparado i, de un grupo j, y en una repetición k

μ = corresponde a la media general

α = parámetro correspondiente al grupo.

β = parámetro correspondiente al preparado, anidado al grupo.

ε = término de error aleatorio asociado a la observación $Y_{(ijk)}$

Se realizó el análisis de la varianza de la variable “número de tubos polínicos” y el análisis de comparación de medias por Test de Tukey ($\alpha= 0,05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron en la lupa grandes cantidades de polen en el estigma de las flores después de 24 horas de polinización, y algunos de los granos emitiendo el tubo polínico. En cortes de estilo de flores después de 24 y 48 horas de polinizadas se observaron muchos tubos polínicos atravesando el estilo. En cortes de ovarios de flores luego de 3 días de la polinización, se observaron picos nucleares penetrados por el tubo polínico y otros no penetrados. En frutos de 10 y 11 días de polinización se observaron a la lupa semillas inmaduras sin embrión, aunque con cubiertas seminales y endosperma de similares características a una semilla normal, otras con embriones muy pequeños o de cotiledones muy desiguales y otros con embriones bien formados, con variabilidad de resultados según las líneas maternas utilizadas.

1. TEST DE VIABILIDAD DE POLEN

De los colorantes probados en la campaña 2005/06 se pudo diferenciar con mayor claridad los granos de polen usando la solución de Lugol en vaselina. Se observó mejor tinción cuando se utilizó glicerina en vez de agua como diluyente de los colorantes, por efecto del *pollenkitt* presente en el polen de *Cucurbita moschata*, que según Nepi y Franchi (2000) es disuelto por solventes lípidos.

Por esta razón en la campaña 2006/07 se utilizó solamente glicerina como diluyente. De los cinco colorantes utilizados se obtuvieron buenos resultados con Carmín acético, Cloruro de Tetrazolio y Colorante de Alexander, ya que con éstos se pudieron diferenciar mejor los granos de polen viables, no viables y subviables.

Con el Colorante de Alexander los granos de polen vivos o viables se vieron rojos oscuros y grandes, los granos no viables o muertos se vieron transparentes y más pequeños, a veces con forma de riñón o abollados. Los de color y tamaño intermedio se consideran subviables.

Con el Cloruro de Tetrazolio los granos de polen viables se observaron rojos o anaranjados y de mayor tamaño, los no viables transparentes y más pequeños, y los de color y tamaño intermedio se consideraron subviables.

El polen conservado en FAA se colorea y se observa muy similar al fresco. Tanto con el Cloruro de Tetrazolio como con el Colorante de Alexander los granos viables se ven marrones oscuros grandes y opacos, los no viables más pequeños y menos coloreados, y los subviables de forma y color intermedio.

Los resultados del análisis de contingencia de las variables categóricas “granos de polen viables”, “no viables” y subviables”, según el colorante usado, se presentan en la tabla 1.5.

Tabla 1.5: Frecuencias y estadísticos para las variables categóricas “granos de polen viables”, “no viables” y “sub viables” de *Cucurbita moschata*, según el colorante usado, ciclo 2006/07.

Colorantes	Frecuencias absolutas Granos de polen			Frecuencias relativas Granos de polen			Total	X ² p-valor
	Viables	No Viables	Sub viables	Viables	No Viables	Sub viables		
Col. de Alexander	123	12	2	0,90	0,09	0,01	137	0,1453
Cloruro de Tetrazolio	159	15	10	0,86	0,08	0,05	184	
Total	282	27	12					

Según el p-valor obtenido se concluye que no hay diferencias entre el uso de un colorante y otro. Cuando se analiza sin agrupar por colorantes, se obtienen los porcentajes de viabilidad de polen, que se presentan en la tabla 1.6.

Tabla 1.6: Frecuencias y estadísticos para las variables categóricas “granos de polen viables”, “no viables” y “sub-viables” de *Cucurbita moschata*, ciclo 2006/07.

Granos de Polen	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas (%)	X ² p-valor
Viables	282	87,85	<0,0001
No Viables	27	8,41	
Sub-viables	12	3,74	
Total	321	100	

Se observó un muy alto porcentaje de viabilidad de polen, con ambos colorantes utilizados, superior al 87 %. Se confirma a *C. moschata* como donante de polen de buena calidad (Della Gaspera, 2005).

2. ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS CON CORTES A MANO ALZADA

2.1. GRANOS DE POLEN EN EL ESTIGMA

En la observación a la lupa de los cortes a mano alzada los granos de polen germinados se vieron transparentes, de color azul claro y a veces son más grandes; los granos no germinados se vieron opacos y de color azul oscuro. Algunos granos presentaron color violeta en su interior, éstos tampoco han germinado. Hay algunos granos subgerminados, de color y tamaño intermedio.

En la vista al microscopio (4x y 10x) se observaron los tres tipos de granos de polen como en la lupa, pero además se vieron algunos tubos polínicos en el interior del estigma y algunos granos con el tubo polínico emergiendo. (Figura 1.14)

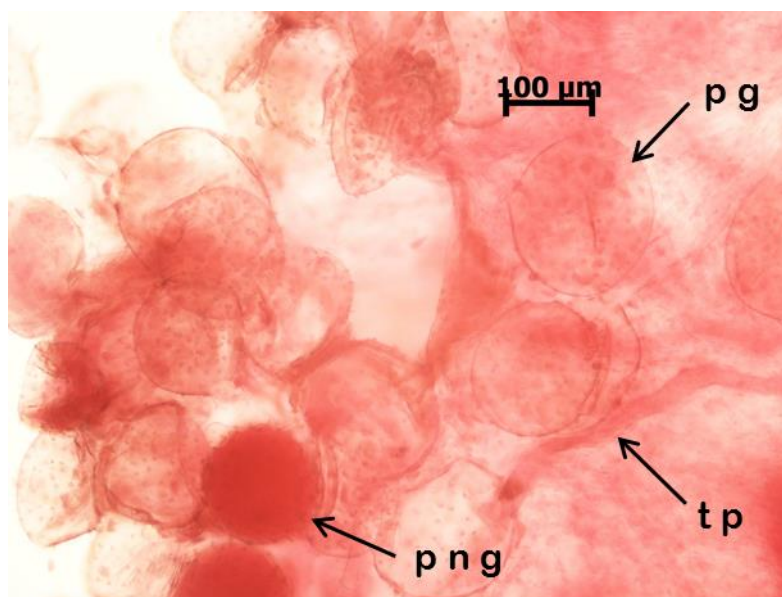


Figura 1.14: Granos de polen en el estigma luego de 2 días de polinización en un cruzamiento híbrido de *C. maxima* x *C. moschata*. Corte a mano alzada, colorante de Alexander. p n g: polen viable no germinado, p v g: polen viable germinado, t p: tubo polínico.

El resultado del análisis de contingencia de las variables categóricas “granos de polen germinados”, “no germinados” y subgerminados”, según los grupos de líneas, se presentan en la tabla 1.7.

Tabla 1.7: Frecuencias y estadísticos para las variables categóricas “granos de polen germinados”, “no germinados” y “subgerminados”, en cruzamientos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*.

Grupos	Frecuencias absolutas Granos de polen			Frecuencias Relativas Granos de polen			X ² p-valor
	Germ.	No germ.	Subgerm.	Germ.	No germ.	Subgerm.	
1	54	35	18	0,50	0,33	0,17	<0,0001
2	119	21	17	0,76	0,13	0,11	
3	95	50	12	0,61	0,32	0,08	
4	72	33	6	0,65	0,30	0,05	
5	122	101	29	0,48	0,40	0,12	
Total	462	240	82	0,59	0,31	0,10	

Según los datos obtenidos en los cortes de estigma, se encontraron diferencias entre grupos de líneas, los granos de polen germinados estuvieron entre el 48 y el 76 %, los valores superiores correspondieron al grupo 2 y 3 y el menor al

grupo 5. Los granos de polen no germinados fueron del 13 al 40 %, el valor inferior correspondió al grupo 2 y el superior al grupo 5. Al parecer el grupo 2 tendría menos problemas de compatibilidad en los cruzamientos, por lo menos en este nivel estigmático de la polinización.

Se concluye que grandes cantidades de granos de polen llegaron al estigma, aunque no pudo hacerse un conteo total, debido a la gran cantidad de granos superpuestos en cada corte.

No se encontrarían problemas de incompatibilidad ni barreras para el crecimiento de los tubos polínicos a este nivel estigmático.

2.2. TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO

Se tomaron 4 flores de cada grupo de líneas, luego de 2 días de polinizarlos con *C. moschata*. Al desplegar las estructuras radiadas obtenidas de los cortes a mano alzada se observaron los tubos polínicos en vista longitudinal, es decir como finos conductos de color oscuro entremezclados entre sí, que atraviesan tejidos de células isodiamétricas (4x y 10x). No fue posible hacer un conteo debido a la gran cantidad de tubos superpuestos y rotos, encontrados en los cortes. (Figura 1.15).

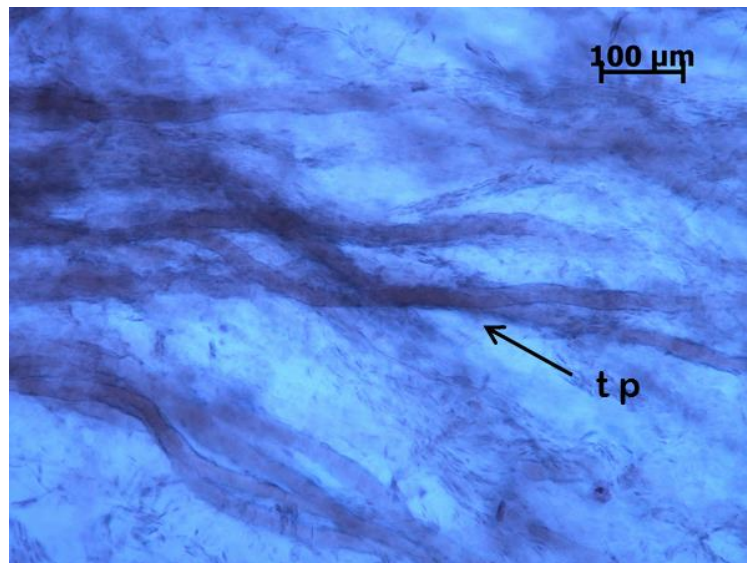


Figura 1.15: Tubos polínicos en la base del estilo, luego de 2 días de polinización, en un cruzamiento híbrido de *C. maxima* x *C. moschata*. Corte a mano alzada, colorante de Alexander (filtro azul).

Se concluye que grandes cantidades de tubos polínicos atraviesan la base del estilo de las flores de *C. maxima*, no se observaron barreras para el crecimiento de los tubos.

2.3. ÓVULOS DE 2 Y 3 DÍAS DESPUÉS DE LA POLINIZACIÓN

En los cortes a mano alzada se tomaron rodajas de la parte media del ovario de las flores de cada grupo de líneas autopolinizadas de *Cucubita maxima*, y de las polinizadas con *C. moschata* luego de 2 días de polinización. De cada flor se tomaron 13-14 óvulos. A cada uno se le hizo un corte longitudinal y se eligieron 10 por grupo, los que tenían el pico nucelar más entero. Se los colocó en un portaobjetos y se observó a la lupa y al microscopio. Se observaron alrededor de 600 óvulos.

Lo que se observó fue lo siguiente:

- Óvulos con el pico nucelar macizo y entero, es decir se observó un tejido uniforme de células unidas entre sí, sin parte libre entre ellas (10x) Esta disposición correspondería a óvulos no fecundados. (Figura 1.16).
- Óvulos en los que el pico nucelar se vió abierto en dos, como un cáliz, más corto que los anteriores, a veces con un tejido más flojo adentro, o sin tejido, como una zona angosta libre de células, de aspecto digerido o lisado en la línea media. Algunos presentaban incluso el tubo polínico en la línea media, entre las estructuras lisadas. Esta disposición se asoció a óvulos fecundados. (Figura 1.17 y 1.18).
- Óvulos con el pico nucelar macizo, pero con una rayita, o una mancha longitudinal a lo largo del pico, o incluso picos divididos en algunas partes en 2 ó 3 tiras. Estas estructuras no pudieron asociarse a óvulos fecundados o no.



Figura 1.16: Pico nucelar sin penetración del tubo polínico, en una polinización híbrida de *C. maxima* x *C. moschata* después de 3 días de polinización.

También surgió el inconveniente de que los óvulos a partir de los 3 días de la polinización fueron muy grandes para ser vistos al microscopio e incluso a la lupa,

ya que la luz no podía atravesar la muestra debido a la gran cantidad de tejido que presentaba un óvulo entero. Al intentar aplastarlos se rompían los picos nucleares y no se distinguían las estructuras, que presentaban disposiciones de aspecto intermedio, muy difíciles de poner en uno u otro rubro.

Al no poder llegar a una división concluyente entre óvulos fecundados y no fecundados, y para poder afirmar que los picos nucleares vistos transparentes a la lupa corresponden a óvulos fecundados, se optó por hacer otro tipo de tratamiento a las muestras para generar los cortes al micrótopo.

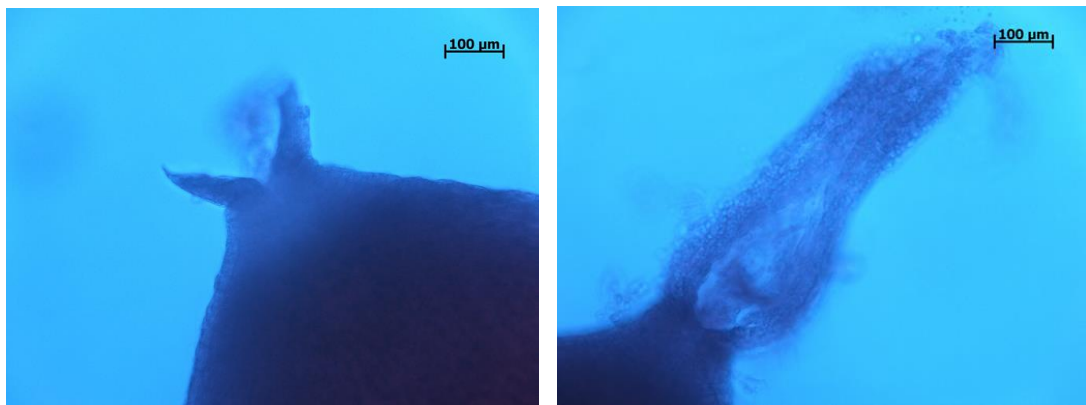


Figura 1.17: picos nucleares de óvulos autopolinizados de *C. maxima* después de 3 días de polinización, que indican la penetración del tubo polínico.

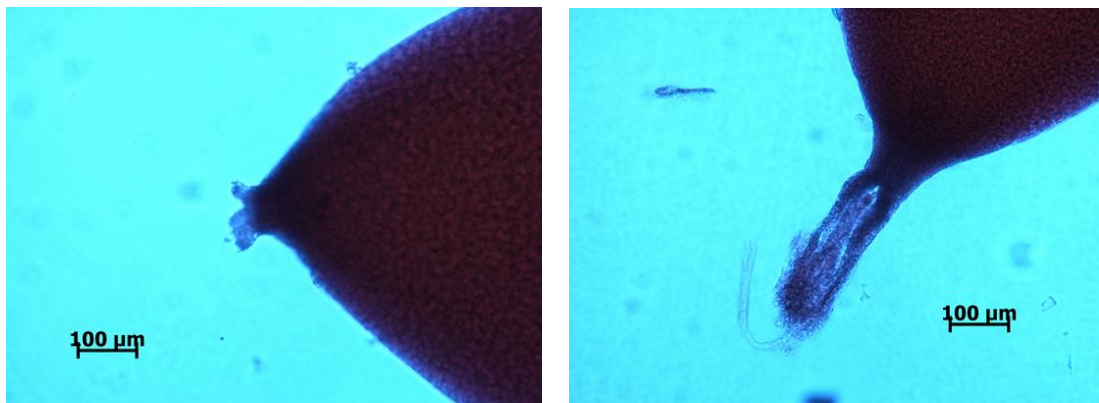


Figura 1.18: Picos nucleares de polinizaciones híbridas de *C. maxima* x *C. moschata* después de 3 días de polinización.

Con estas observaciones sólo se pudo suponer que el tubo polínico ha penetrado y fecundado el óvulo; también podían observarse algunos óvulos con el pico nuclear opaco, que indica que no hubo fecundación. Esto es así por lo menos para la autopolinización o la polinización intraespecífica (Pozner, 1993).

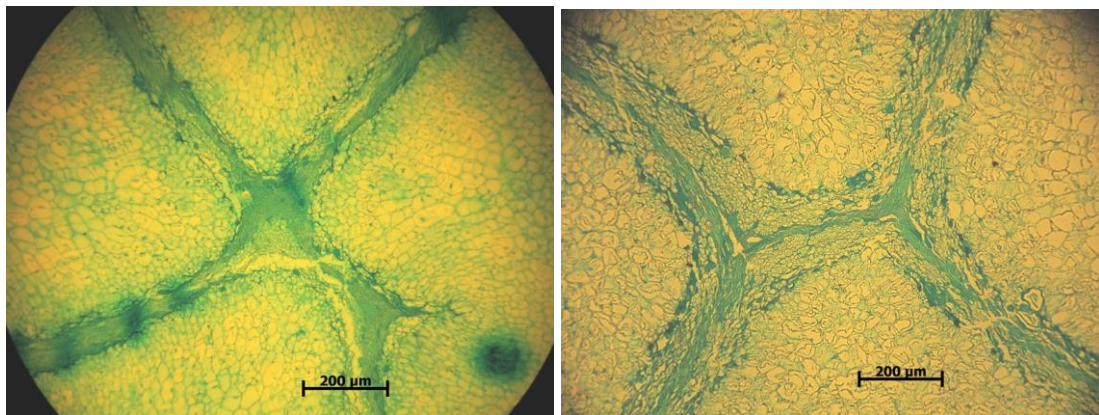
Trabajando con óvulos enteros no se encontraron diferencias visuales entre los de *C. maxima* x *C. maxima* y los del cruzamiento híbrido.

3. ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS CON CORTES AL MICRÓTOMO

3.1. TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO

En los preparados hechos con micrótopo puede decirse que tanto en la autopolinización de *C. maxima* como en el híbrido, *C. maxima* x *C. moschata*, gran cantidad de tubos polínicos atravesaron la base del estilo. Los tubos polínicos aparecen en el 100 % de los preparados, y no se encontraron diferencias entre grupos de híbridos ni entre éstos y la autopolinización.

Según la figura 1.19 puede verse en verde el tejido de transmisión del estilo aplastado hacia el centro de la estructura de transmisión. Como el mecanismo de crecimiento del tubo polínico consiste en mantener el citoplasma y las gametas en el extremo apical del tubo, mientras se va tabicando y vaciando el resto del tubo polínico, las células que aparecen vacías corresponderían a tubos que ya han atravesado el estilo y a esa altura se encuentran vacíos, estando el citoplasma y las gametas mucho más profundo en el ovario. Las células llenas corresponderían a los tubos polínicos rezagados que a esa altura de corte todavía tienen el citoplasma y las gametas. Pueden apreciarse gran cantidad de tubos polínicos vacíos, y algunos aún llenos. Esto se observó tanto a los 2 como a los 3 días después de la polinización, y tanto en el híbrido como en la autopolinización de *C. maxima*. Los tubos tuvieron buena velocidad de crecimiento, ya que a los 2 y 3 días después de la polinización, la gran mayoría ya había pasado hacia el ovario.



A

B

Figura 1.19: Corte de la base del estilo de *C. maxima* dos días después de la polinización. A: Híbrido, B: autopolinizado.

Esto parecería indicar que no se observan problemas de incompatibilidad ni barreras a este nivel para el proceso de desarrollo de los tubos polínicos.

Con los preparados de estilo se tomó un preparado por grupo y se contaron el número de tubos con citoplasma que atravesaban el estilo en 6 campos al azar, y se realizó el ANAVA y el test de Tukey (0,05)

Tabla 1.8: Medias y desvíos estándar del número de tubos polínicos con citoplasma en cortes de estilos luego de 2 días de polinización. En columna: Letras distintas indican diferencias significativas de medias ($p \leq 0,05$)

Grupos	N	Número de tubos polínicos	
1	6	34,50 ± 20,09	a
2	6	22,33 ± 3,39	a
3	6	49,67 ± 8,94	ab
4	6	91,67 ± 16,37	bc
5	6	54,00 ± 5,06	abc
Autopolinizados	6	97,83 ± 9,28	c
C. V. %	36	14,95	

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la autopolinización y los grupos de líneas de cruzamiento híbrido. El mayor valor correspondió a la autopolinización, al que le siguieron los grupos 4 y 5. El menor valor correspondió al grupo 2 (Tabla 1.8).

Algunos puntos a ajustar para futuros estudios podrían ser: incluir en el muestreo cortes de estilo de *C. maxima* sin polinizar, y observar cortes de estilo a 8, 12 y 24 h después de la polinización. En este caso se podría utilizar otro colorante, como la fucsina básica y azul de algodón, o el colorante de Alexander, ya que la parte viva de los tubos estaría pasando en ese momento por la base del estilo. (Estos muestreos fueron realizados, y los frutos se encuentran conservados en FAA, pero no pudieron ser acondicionados para ser observados al microscopio). La técnica de fijación y coloración resultó apropiada y podría seguir utilizándose sin mayores cambios.

3.2. ÓVULOS DE 2 Y 3 DÍAS

Se analizaron todos los portaobjetos preparados correspondientes a cada grupo de líneas y a las autopolinizaciones. En las figuras 1.20 y 1.21 se puede observar una típica polinización, el tubo polínico al entrar al pico nucelar forma una lisis generalizada, que se observa al microscopio como un espacio vacío, sigue a esta "bolsa" algunos restos de pico nucelar, si se continúa viendo con un mayor

aumento se puede observar el “tubo de acoplamiento” y muy cerca de éste, los núcleos masculinos, que se reconocen como cuerpos oscuros.

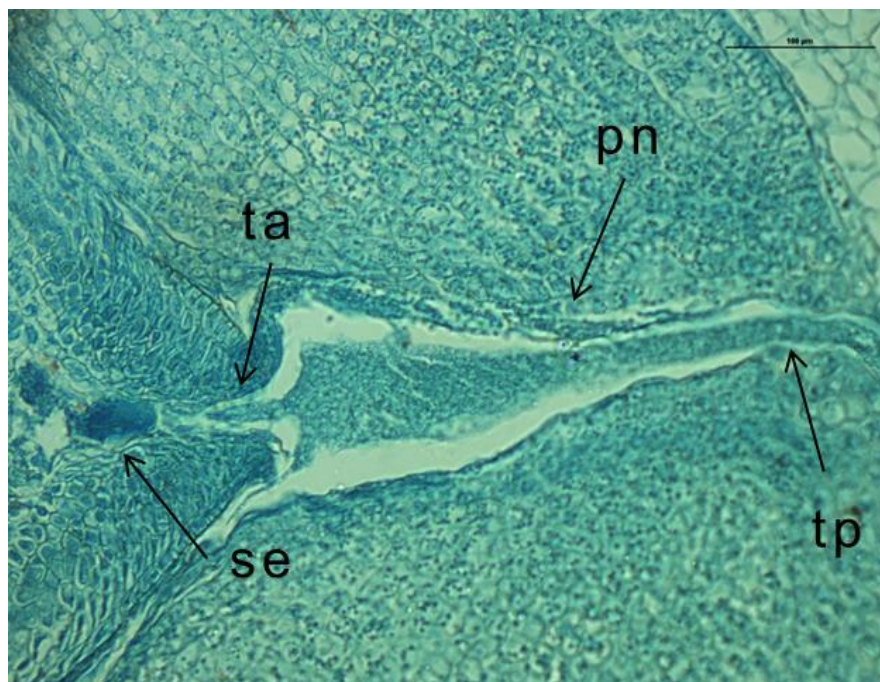


Figura 1.20: Cruzamiento híbrido. Se observa el tubo polínico (t p), la lisis del pico nucelar (p n), el tubo de acoplamiento (t a) y el saco embrionario (s e). La escala corresponde a 100 µm.

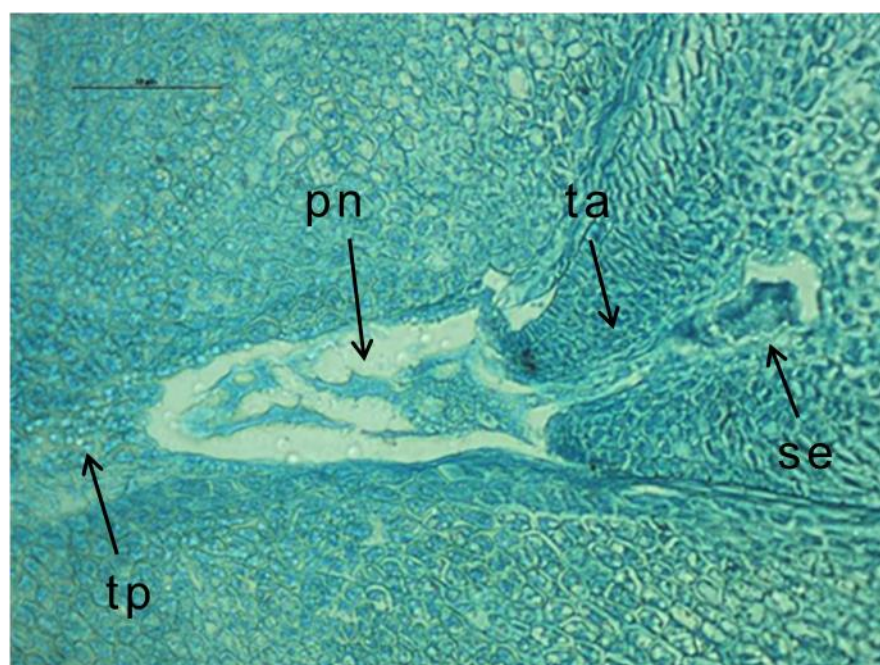


Figura 1.21: Autopolinización. Se observa la entrada del tubo polínico (t p), la lisis del pico nucelar (p n), el tubo de acoplamiento (t a) y el saco embrionario (s e). La escala corresponde a 100 µm.

En los preparados observados a los 2 y 3 días de la polinización las células se vieron retraídas y separadas de su pared celular, esto estaría indicando una deshidratación muy brusca del material. Al parecer el FAA (con alcohol 95 %) fue muy agresivo y deshidrató muy bruscamente los cortes de ovarios. Esto obstaculizó la interpretación de los preparados.

Se encontraron gran cantidad de sacos embrionarios abortados o muertos, esto es independiente de la llegada o no del tubo polínico. En la figura 1.22 puede observarse en el óvulo una zona azul oscura, donde no pueden apreciarse núcleos u otra estructura de referencia. Esto indicaría un saco embrionario no fecundado. Se observaron también muchos gránulos de almidón, esto en Cucurbitáceas está asociado a células que se están muriendo, o tejido muerto, lo que está indicando problemas en la fecundación.

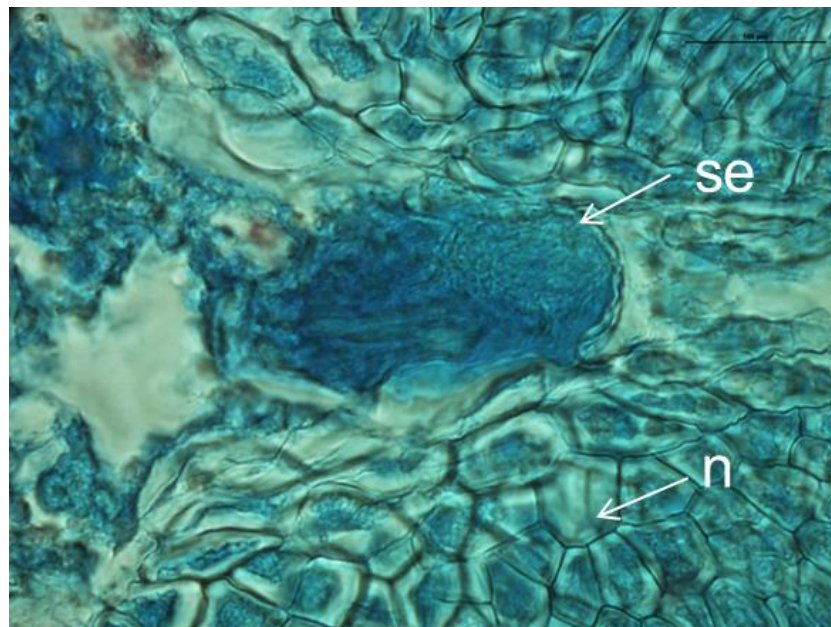


Figura 1.22: Saco embrionario híbrido abortado, luego de 2 días de polinización. La escala corresponde a 20 μ m. se: saco embrionario, n: nucela.

El tubo polínico atraviesa la micrópila, llega al pico nucelar, crece dentro del pico y forma una bolsa de lisis similar al de una autopolinización, forma incluso el tubo de acoplamiento y toma contacto con una de las sinérgicas del saco embrionario, se produce la descarga de las gametas, pero las gametas aparentemente no llegan a unirse a la ovocélula ni a la célula media. Esta etapa de la fecundación no pudo observarse en ningún preparado.

Esta barrera, tan cercana a la singamia, podría ser la causante de las semillas vanas que ocurren en gran cantidad en el híbrido, ya que la descarga de las

gametas y la anterior polinización, estaría generando suficientes movimientos de hormonas como para establecer el fruto.

Lo que debería observarse como una cigota bien formada, sobre todo al tercer día de la polinización, es una estructura similar a una cigota, pero muy retraída y difícil de interpretar, por la no observación de núcleos bien definidos, vacuolas, y otros. Estas observaciones parecen señalar que lo que actúa en este tipo de fecundaciones son barreras postcigóticas muy tempranas.

Al parecer el momento de la unión de las gametas para *C. maxima* es alrededor del tercer día después de la polinización. Esto no diferiría con respecto al híbrido.

3.3 CRUZAMIENTO RECÍPROCO

Del cruzamiento recíproco se obtuvieron cuatro frutos, todos con semillas vanas. Al analizar los preparados se observan óvulos achatados, comprimidos, en el lugar donde debería estar el óvulo no hay nada. Los óvulos están colapsados. (Figura 1.23)

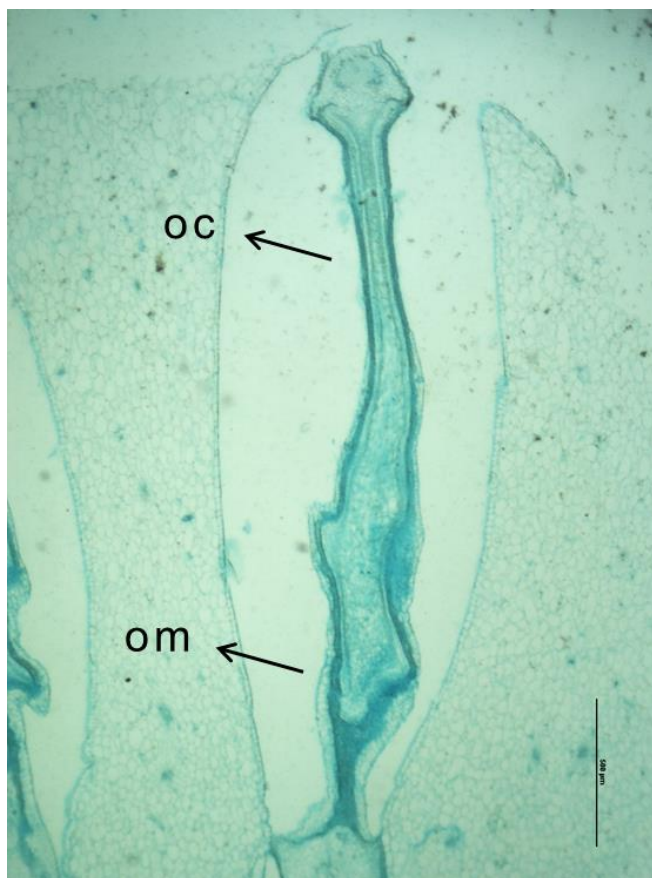


Figura 1.23: Cruzamiento recíproco de *C. moschata* x *C. maxima*. Embrión de 11 días se observa el óvulo colapsado. La escala corresponde a 500 μm . oc: óvulo, región calazal; om: óvulo, región micropilar.

3.4 SEMILLAS DE 27 DÍAS

Tal como ocurre en las polinizaciones naturales de las Cucurbitáceas, el embrión híbrido no acompaña el crecimiento de la semilla y ocupa una pequeña parte de ella. El resto está ocupado por el endosperma tabicado y restos de nucela. Se observan los primordios de cotiledones y la radícula incipiente.

En todos los embriones observados no se vieron malformaciones en este nivel de la formación del embrión (figura 1.24).

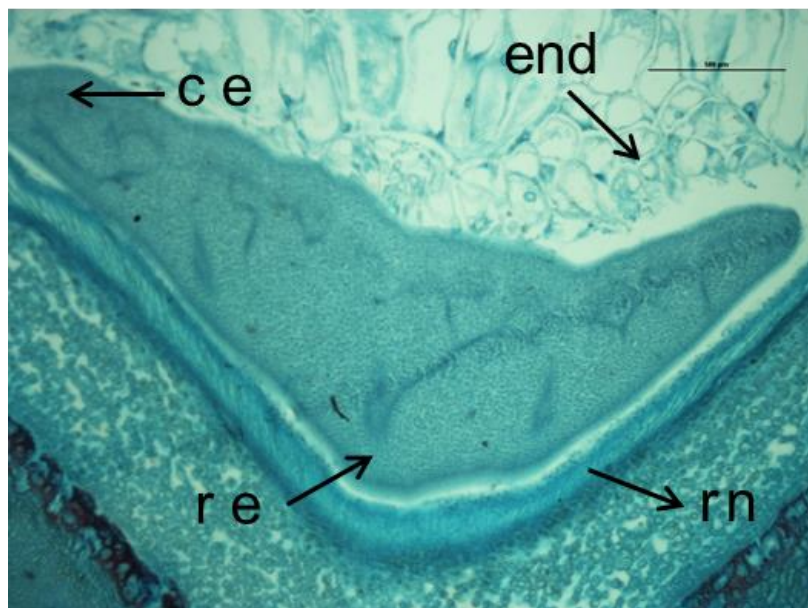


Figura 1.24: Embrión híbrido de 27 días. La escala corresponde a 500 μm . end: endosperma; ce: cotiledones del embrión; re: radícula del embrión; rn: restos de nucela.

La técnica de fijación resultó apropiada aunque podrían ajustarse algunos puntos como: no utilizar FAA como fijador, o hacerlo con alcohol más diluido, como ser alcohol 50°. Otra manera puede ser sumergir previamente los cortes en alcohol 50° y luego pasarlos a FAA, de esta forma evitar una deshidratación brusca de las células. La técnica de coloración resultó apropiada y podría seguir utilizándose sin cambios.

CONCLUSIONES. APORTES

Se confirma a *Cucurbita moschata* como especie conectora cuando se la utiliza como dadora de polen, por el alto porcentaje de viabilidad encontrado en las muestras de polen tomadas el día de la polinización a campo en las dos campañas estudiadas, resultado concordante con los presentados por Robinson (1999) y Bisognin (2002).

Se confirma igualmente la capacidad de cruzamiento como dadora de polen con *Cucurbita maxima*, como lo expresado por Whitaker y Robinson (1986) ya que pudieron observarse:

- Alta frecuencia de granos germinados en el estigma, en los 5 grupos de líneas estudiados, en mayor medida en los grupos 2 y 3.
- Grandes cantidades de tubos polínicos atravesando el canal estilar de *C. maxima*, en forma similar a los observados para las autopolinizaciones, que fue la que presentó mayor cantidad de tubos polínicos en la base del estilo, seguido de los grupos de líneas 4 y 5.

Se confirma la poca aptitud de *C. maxima* como donante de polen, ya que al utilizar *C. moschata* como línea madre y *C. maxima* como padre, es decir el cruzamiento recíproco, se obtienen muy pocos frutos, y la mayoría aborta a los pocos días. Las observaciones al microscopio muestran semillas de poco grosor, retraídas en las cavidades del ovario. Resultados similares a los obtenidos por Baggett (1979) y Sisko *et al.* (2003).

La técnica de fijación y coloración aplicadas sobre estas especies por primera vez en la Argentina para su observación al microscopio óptico resultaron apropiadas y podrían seguir utilizándose sin mayores cambios.

Este estudio muestra por primera vez la formación de una ampolla o bolsa en el pico nucelar del óvulo, causada por la penetración del tubo polínico, como así también la formación de un tubo de acoplamiento para la descarga de gametas masculinas, en las autopolinizaciones de *Cucurbita maxima*, estructuras similares encontradas por Pozner (1993) en especies silvestres de otros géneros de *Cucurbitaceae*.

Estas estructuras a nivel del pico nucelar también son observadas en los cruzamientos interespecíficos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata*, aunque esto no implicaría una fecundación viable, ya que las cigotas luego de 2 y 3 días después

de la polinización se observan retraídas, con estructuras no bien definidas y con alta frecuencia de gránulos de almidón, lo que indicaría un embrión abortado. Lamentablemente no pudieron verse cigotas vivas en los cortes estudiados.

Esto parece señalar que lo que actúa en este tipo de fecundaciones son barreras postcigóticas muy tempranas, ya que todo el proceso de polinización se lleva a cabo en forma similar al de las autopolinizaciones, y el proceso se detiene momentos después de la descarga de las gametas, luego de la unión de los núcleos del gametofito masculino con la ovocélula, ya que las cigotas se han formado, pero se ven retraídas y abortadas.

El momento de la unión de las gametas para *C. maxima* es alrededor del tercer día después de la polinización. Esto no diferiría con respecto al híbrido.

En la observación de cortes a mano alzada de óvulos de 2 ó 3 días de polinización no es posible asegurar que ha sido fertilizado o no, ya que la lisis del pico nucelar observado en muchos de ellos no indica necesariamente una fecundación viable, y se da en forma similar tanto en las autopolinizaciones como en los cruzamientos. Las barreras a la fecundación aparecen en un momento más avanzado del proceso de fecundación, muy próximo a la unión de las gametas o inmediatamente después, ya que no pudieron observarse cigotas vivas. Este proceso sólo puede observarse al microscopio.

En semillas híbridas de 27 días se observan embriones bien formados y con el endosperma similar al de las autopolinizaciones.

Como señala Futuyama (1998) sobre las barreras poscigóticas, la inviabilidad híbrida también oscila en un amplio rango, ya que se obtienen semillas híbridas, pero no en todos los casos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, M. P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technology* 41, 117-122.
2. Athanasios L. Tsivelikas, A.L., Koutita, O., Anastasiadou, A., Skaracis, G.N., Traka-Mavrona, E., Koutsika-Sotiriou, M. 2009. Description and Analysis of Genetic Diversity among Squash Accessions. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (2): 271-283.
3. Baggett, J. R. 1979. Attempts to cross *Cucurbita moschata* (Duch.) Poir. 'Butternut' and *C. pepo* L. 'Delicata'. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 2: 32-34.
4. Baranek, M. Stift, G. Vollmann, J. and Lelley, T. 2000. Genetic diversity within and between the species *Cucurbita pepo*, *C. moschata* and *C. maxima* as revealed by RAPD markers. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 23: 73-77.
5. Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Cienc. Rural* 32 (5): 715-723.
6. Castro, H. A. Galvez, M. J. González, S. R. y Villamil, C. B. 2006. Protein composition of *Cucurbita maxima* and *C. moschata* seeds. *Biologia Plantarum* 50 (2): 251-256.
7. Dathan, A.S.R. and D. Singh. 1990. Embriology of *Cucurbitaceae*. In: *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Bates, D.M; Robinson R.W. and Jeffrey, C. Eds. Cornell University Press. 185-208 pp.
8. Della Gaspera, P. 2005. Informe Técnico. Convenio Unilever-INTA. Programa de mejoramiento de zapallo para deshidratado. Pp 10-23.
9. Guha, J. and Sen, S. P. 1998. Physiology, biochemistry and medicinal importance. Chapter 7. In *Cucurbits*. N. M. Nayar and T. A. More ed. Science publishers Inc. U. S. A. Pp. 197-127.
10. Hayes, C. N. Winsor, J. A. Stephenson, A. G. 2005. A comparison of male and female responses to inbreeding in *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (*Cucurbitaceae*). *American Journal of Botany*, 92: 107-115.
11. Hayward, 1938. The estructura of economic plants. Mac Millan Company. Pp 581-620.
12. Holle, M. 1983. Overview - The *Cucurbita* Species. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 6: 77-78.
13. Johannsson, M. H. Stephenson, A. G. 1998. Effects of temperature during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (*Cucurbitaceae*). *International Journal of Plant Sciences* 159 (4): 616-626.
14. Leclerc, R. F. Siegel, A. 1987. Characterization of repetitive elements in several *Cucurbita* species. *Plant Molecular Biology* 8 (6): 497-507.
15. Lira - Saade, R. 1995. Estudios taxonómicos y ecogeográficos de las *Cucurbitaceae* latinoamericanas de importancia económica. *Systematic and ecogeographic studies on crop genepools*. 9. IPGRI. Pp. 1-53.
16. Nair, P. K. K. and R. Satheesh, 1998. Palynology. Chapter 6. In *Cucurbits*: Nayar, N. M. More, T. A. ed. Science publishers Inc. Pp. 85-95.

17. Nayar, N. and M. More, T. A. 1998. Cucurbits. Science publishers Inc. U. S. A. Pp 1-340
18. Nepi, M. Franchi, G. G. 2000. Cytochemistry of mature angiosperm pollen. Plant Systematics and Evolution. 222: 45-62.
19. Nepi, M. y Pacini, E. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. Annals of Botany 72 (6): 527-536.
20. Oberle, G. D., and Watson, R. 1953. The use of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens. Proceedings of the American Society for Horticultural Science 61: 299-303.
21. Pasha M. K. and Sen S. P. 1998. Numerical and chemical approaches to taxonomy and relationships. Chapter 2. In Cucurbits: Nayar, N. M. More, T. A. ed. Science publishers Inc. Pp. 19-32.
22. Pozner, R. 1993. Sistemas reproductivos en *Cucurbitaceae* argentinas. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, pp. 1-220.
23. Puchalski, J. T. y Robinson, R. W. 1978. Comparative electrophoretic analysis of isozymes in *Cucurbita* Species. Cucurbit Genetics Cooperative Report 1: 28.
24. Puertas, M. J. 1992. Genética, fundamentos y perspectivas. Mc Graw-Hill. Madrid. Interamericana de España. Pp. 41-49.
25. Quesada, M. Winsor, J. A. Stephenson, A. G. 1996. Effects of pollen selection on progeny vigor in a *Cucurbita pepo* x *C. texana* hybrid. Theoretical and Applied Genetics 92 (7):885-890.
26. Richards, A. J. 1997. Plant breeding systems (cap 3 y 4). Second edition. Chapman and Hall. Department of Agricultural and Environmental Science. University of Newcastle upon Tyne. UK. Pp 513.
27. Robinson, R. W. 1999. Rationale and methods for producing hybrid Cucurbit seed. In Hybrid Seed Production in Vegetables: Rationale and Methods in Selected Crops. Journal of New Seeds. Amarjit S. Basra. ed. 1 (3-4). 1-47.
28. Robinson, R.W., Munger, H.M., Whitaker, T.W., et al. 1976. Genes of *Cucurbitaceae*. HortScience 11 (6): 554-568.
29. Ruzin, Steven E. 1999. Plant microtechnique and microscopy. Biological Imaging Facility, University of California, Berkeley. New York, Oxford. Oxford University Press. Pp. 94-95.
30. Sharma, B. R. and Tarsem Lal. 1998. Improvement and cultivation: *Cucurbita* and *Benincasa*. Chapter 9. In Cucurbits: Nayar, N. M. More, T. A. ed. Science publishers Inc. Pp. 155-168.
31. Shifriss, C. Cohen, S. 1974. An evaluation of F2 populations from a cross between *Cucurbita pepo* L. and *C. moschata* Dutch. for resistance to cucumber mosaic virus. Euphytica 23 (2): 333-336.
32. Shridar, S. and D. Singh. 1990. Palynology of the indian *Cucurbitaceae*. In: Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*. Bates, D.M; Robinson R.W. and Jeffrey, C. Eds. Cornell University Press. 200-208 pp.
33. Singh, A. K. 1990. Cytogenetics and evolution in the *Cucurbitaceae*. En Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*. Bates, D.M; Robinson R.W. and Jeffrey, C. Eds. Cornell University Press. 14-16 pp.
34. Singh, D. and A. S. Dathan. 1998. Morphology and embryology. Chapter 5. In Cucurbits: Nayar, N. M. More, T. A. ed. Science publishers Inc. Pp. 67-84.

35. Sisko, M. Ivancic, A. and Bohanec, B. 2003. Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo rescue technique. *Plant Science* 165: 663-669.
36. Weiling, F. 1953. *Beobachtungen an Kürbisartbastarden*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 66: 369-378.
37. Whitaker, T. W. Bemis, W. P. 1975. Origin and evolution of the cultivated *Cucurbita*. *Bull Torrey Bot. Club.* 102: 362-368.
38. Whitaker, T. W. Davis, G. N. 1962. *Cucurbits. Botany, cultivation, and utilization*. World Crops Books. London, Leonard Hill (Books) limited. Inter science publishers, Inc. New York. Pp 210.
39. Whitaker, T. W. Robinson, R. W. 1986. Squash breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. Edited by Mark J. Basset. The AVI Publishing Company Inc. Connecticut. USA. Pp. 209-242.
40. Yamane, Y. 1950. Chromosome numbers in the genus *Cucurbita*. *Rep. Kihara Inst. Biol. Rest. (Seiken Zihô)* 4: 72-74.

CAPÍTULO 2

**LOS HÍBRIDOS EN *Cucurbita*. CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS DE
C. maxima X *C. moschata*. EMBRIONES EN DESARROLLO Y A
TÉRMINO.**

RESUMEN

Se analizaron las diferentes metodologías para superar la incompatibilidad al realizar cruzamientos interespecíficos entre *Cucurbita maxima* x *C. moschata*. La técnica de polinización de una sola flor directa es analizada en contraste con el uso de una mezcla de polen, no se encontraron diferencias entre ambos tratamientos. Se analizaron y se midieron variables morfológicas de los embriones en semillas en formación de frutos de 27 días de desarrollo después de la polinización y en frutos maduros a término (60 días luego de la polinización), de los diferentes grupos de líneas maternas. Los grupos 1 y 5 resultan superiores. Se observaron y midieron las frecuencias de aparición de embriones deformes y los tipos de malformación más frecuentes, según los grupos de líneas y los ciclos de cultivo, donde resultan superiores los grupos 5 y 3. Se discute el posible efecto de las condiciones ambientales en la aparición de malformaciones de los embriones.

ABSTRACT

Diferent methodologies performed to overcome incompatibility among crosses between *Cucurbita maxima* x *C. moschata* crosses were analyzed. Single flower pollination technique is analyzed in contrast to the use of a pollen mixture; no differences were found between both treatments. Morphological variables of the embryo of seeds obtained from fruits of 27 days of development after pollination, and in mature fruits (60 days after pollination) were analyzed and measured. These variables were compared among groups of maternal lines; the most efficient were groups 1 and 5. The frequency of deformed embryos and the most frequent types of malformations were observed and measured according to the groups of maternal lines and crop cycles; of these, the best were groups 5 and 3. Possible effect of environmental conditions on the appearance of embryo malformations is discussed.

INTRODUCCION

Híbridos interespecíficos. *Cucurbita maxima* x *C. moschata*

Los cruzamientos interespecíficos son usados en las Cucurbitáceas para transferir características deseables de progenitores silvestres o de genotipos cultivados relacionados. Si las especies presentan dificultad para cruzarse, se pueden utilizar especies “puente” como por ejemplo *C. lundelliana* y *C. moschata*. *C. moschata* fue también usada como puente para transferir resistencia a enfermedades (mildew y CMV), buena calidad de frutos y resistencia a insectos, de *C. martinii* a *C. pepo* (Whitaker y Robinson, 1986; Bisognin, 2002) Otra estrategia consiste en mejorar la eficacia del cruzamiento mediante el cultivo de embriones (Robinson, 1999).

La selección por *pedigree* es frecuentemene usada para desarrollar líneas parentales consanguíneas para posteriormente generar los cultivares híbridos de Cucurbitáceas. Una sola semilla puede ser usada para este propósito. El método de retrocruza ha sido usado para agregar resistencia a enfermedades y ginoecia. La selección recurrente puede ser usada para desarrollar líneas consanguíneas que se han mejorado para caracteres de baja heredabilidad (Robinson, 1999).

Se han producido híbridos interespecíficos en los géneros *Cucurbita*, *Cucumis*, *Citrullus* y *Luffa*. La hibridación interespecífica ha sido exitosamente usada en el mejoramiento de *Cucurbita*, el cual incluye el desarrollo de cultivares híbridos entre *C. maxima* y *C. moschata* (Bisognin, 2002). Algunos ejemplos encontrados en la bibliografía son los trabajos de Shifriss y Cohen (1974) donde una variedad de *Cucurbita moschata* resistente al CMV, fue cruzada con *C. pepo* y dio como resultado híbridos parcialmente fértiles con un set de semillas F2.

El cruzamiento entre *C. maxima* y *C. moschata* es mencionado por Whitaker y Davis (1962) diciendo que el conjunto de frutos obtenidos es generalmente bajo para muchos cruzamientos entre estas dos especies, que el fruto ocasionalmente producido puede tener poca o ninguna semilla, y el híbrido presenta usualmente alta esterilidad. Whitaker y Robinson (1986) reportan que este cruzamiento se realiza para combinar la buena calidad de pulpa de *C. maxima* y la resistencia a insectos de *C. moschata*. Aunque posteriormente Robinson (1999) señala que es posible obtener este híbrido, pero frecuentemente su obtención no es fácil.

Los frutos de estos híbridos combinan los caracteres favorables de ambas especies, y muestran una considerable heterosis para la ginoecia o grado de expresión sexual femenina y para el rendimiento. La dificultad del cruzamiento

depende de las particularidades de las entradas o líneas usadas como parentales (Robinson, 1999). Otro de los inconvenientes que ocurren comúnmente en los F1 es la esterilidad y el pobre desarrollo de semillas. Generalmente los embriones no abortan, pero el tejido nutritivo de las semillas normalmente falla (Robinson, 1999). Posteriormente los análisis de proteínas con electroforesis demostraron el alto parecido entre estas dos especies (Castro *et al.* 2006).

Los híbridos interespecíficos entre *C. maxima* y *C. moschata* fueron desarrollados para incrementar la calidad del fruto. El primer zapallo comercial liberado con éxito resultado de este cruzamiento fue el cultivar “Tetsukabuto”, donde la producción económica de semillas se debe aparentemente a la buena aptitud combinatoria, resultado de la selección de líneas parentales que producen mejor semilla híbrida que cualquier otra combinación (Bisognin, 2002; Robinson, 1999). El cultivar “Tetsukabuto” es un cruzamiento entre *C. maxima* cv. Delicious y *C. moschata* cv. Kurokawa n° 2, usando *C. maxima* como parental materno. (Robinson y Decker-Walters, 1997). Ambas especies producen más flores masculinas que femeninas en la misma planta, pero el híbrido interespecífico es ginoécico o predominantemente femenino. Este es considerablemente productivo, presumiblemente debido a la heterosis y a la abundancia de flores carpeladas. Este vigor es tan excepcional, que suelen usarse de pie de injerto en especies de pepino, sandía y melón (Robinson, 1999).

Aunque los cruzamientos recíprocos son frecuentemente similares, en algunos casos es preferible una línea materna que otra para producir semilla híbrida. Una de las líneas parentales suele ser mejor para producir semilla que otra y los parentales suelen diferir por diferencias en herencia citoplasmática (Robinson, 1999).

Kwack y Fujieda (1985) realizaron cruzamientos interespecíficos para obtener líneas de alta feminidad, y encontraron que los cruzamientos de *C. pepo* con *C. maxima* muestran reducida compatibilidad en comparación de los cruzamientos entre *C. moschata* con *C. maxima*. Estos autores desarrollaron líneas PM (Pepo-Moschata) que fueron cruzadas con polen de dos cultivares de *C. maxima*; en el primer caso se produjeron pocas semillas con embriones totalmente desarrollados, mientras que en el otro se produjeron semillas sin embriones. Este resultado pudo deberse a la utilización de *C. maxima* como padre y no como línea madre. Las observaciones realizadas con microscopio de fluorescencia del desarrollo del tubo polínico mostraron que los tubos polínicos en el primer caso penetraban más profundamente en el canal estilar que en el segundo. En ese sentido la selección

por el crecimiento del tubo polínico aumentaría las posibilidades de una progenie híbrida viable.

Utilizando la selección por velocidad de crecimiento del tubo polínico, Quesada *et al.* (1996) estudiaron el vigor de la progenie del híbrido entre *Cucurbita pepo* y *C. texana*, cortando el estilo de las flores a las 12-15 horas después de polinización, para permitir que sólo los tubos con mayor velocidad de crecimiento fertilicen los óvulos, demostrando que la selección por velocidad de crecimiento del tubo polínico (selección en el microgametófito) lleva a un incremento correlativo en el vigor de la progenie (esporófito).

En otro estudio basado en el crecimiento del tubo polínico (Kho *et al.* 2005), se realizó un dialelo sobre 10 especies silvestres y cultivadas de *Cucumis*, intentando ampliar el conocimiento sobre la localización de las barreras al crecimiento del tubo polínico en el estigma, el estilo y el ovario; se examinó el comportamiento del tubo polínico por microscopía Ultra Violeta (UV) tres días después de la polinización, y utilizaron una escala de 0 a 4, según el mayor o menor crecimiento del tubo polínico. Se encontraron que algunas líneas tenían mayor éxito en el cruzamiento que otras, y que esto podía estar ligado a parentescos entre las especies.

Una implicancia agronómica importante que resulta de esto es el especial cuidado que se debe tener en evitar el polen de las líneas maternas cuando se produce semilla del híbrido interespecífico. Los tubos polínicos de las líneas maternas crecen más rápido en el estilo que los tubos de las otras especies y la competencia de las gametas resultará en una desproporcional contaminación de la semilla híbrida con las de las líneas maternas si se produce alguna autofecundación o hermanofecundada (Robinson, 1999).

En este sentido Dadlani y More (1998) mencionan como estrategias en la producción de semillas híbridas además de la polinización artificial mediante el cierre de las flores antes de su apertura y posterior polinización manual, la emasculación de las flores estaminadas en las líneas madres, el uso de líneas ginomonoicas plantadas alternativamente a las líneas padres, y el uso de líneas inducidas a la ginoecia mediante ácido giberélico o nitrato de plata, entre otros. Este último tratamiento sólo mencionado para pepino y melón.

En resumen, Whitaker y Robinson (1986) señalan que a pesar de existir estudios sobre hibridaciones interespecíficas en *Cucurbita*, este proceso en su

mayor parte no ha sido comprendido totalmente. Con respecto a las especies anuales de *Cucurbita*, se mencionan tres conclusiones:

a) Se pueden obtener híbridos F1 de cruzamientos interespecíficos, aunque usualmente con dificultad. Los híbridos presentan normalmente alta esterilidad debido a la poca habilidad de la flor estaminada de producir polen.

b) Los datos disponibles sugieren que si comparamos las relaciones de las 4 especies anuales cultivadas: *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo*, y *C. argyrosperma* con una rueda, *C. moschata* sería el centro y las otras especies serían los rayos.

c) No hay evidencia de hibridación espontánea entre estas 4 especies, a pesar del hecho de que puedan estar creciendo contiguas en campos o jardines por muchas generaciones (Robinson, 1999).

Tecnologías para superar la incompatibilidad en *Cucurbita maxima* x *C. moschata*

El flujo génico entre especies a través de las gametas está limitado por barreras externas e internas a la hibridación. Las barreras externas son, entre otras, el aislamiento geográfico, la floración no simultánea, o la adaptación a nichos ecológicos diferentes. Las barreras internas, por otro lado, residen en los mismos tejidos del individuo y pueden ser precigóticas y postcigóticas (Futuyma, 1998).

La producción de híbridos interespecíficos es una importante fuente de variación en el mejoramiento de las plantas. Pero muchos cruzamientos interespecíficos son incompatibles. En las angiospermas, los mecanismos precigóticos son complejos e incluyen barreras en la polinización. Las barreras precigóticas actúan a nivel de polen-pistilo afectando la germinación de los granos de polen en el estigma o el crecimiento del tubo polínico a lo largo del estilo. Los mecanismos postcigóticos provocan el no desarrollo o aborto del embrión por diferentes causas y aborto del endosperma, y en diferentes momentos. Una de las barreras postcigóticas más importantes es el colapso del endosperma híbrido. (Camadro *et al.* 2004)

Esta incompatibilidad debida a barreras pre y postcigóticas podrían ser superadas con distintas tecnologías. No hay muchos trabajos referidos a este tema para Cucurbitáceas. En el género *Lilium*, Facciuto (2005) *et al.* señalan que cuando actúan las barreras precigóticas no se produce crecimiento del tubo polínico; mientras que las barreras postcigóticas pueden ocasionar ruptura cromosómica, degeneración del endosperma o incompatibilidad embrión-endosperma. Algunas

técnicas tales como cortado del estigma, el injerto de estilo y la polinización *in vitro* han sido desarrolladas para superar las barreras precigóticas. Para el caso de barreras postcigóticas se utilizan métodos como el rescate de embriones, discos de ovarios y cultivo de óvulos.

El cultivo de embriones es mencionado en un trabajo de Weiling (1966) donde es utilizado para obtener descendencia en cruzamientos de *Cucurbita maxima* x *C. pepo* y estudiar la herencia de un carácter de la semilla. El cultivo *in vitro* de embriones es propuesto por Ondrej *et al.* (1999) para obtener semillas en cruzamientos interespecíficos en *Cucumis*, ya que el embrión híbrido interrumpe su crecimiento alrededor de los 7 días. Algo similar a lo observado en los cruzamientos de *Cucurbita maxima* x *C. moschata* en la EEA La Consulta, donde los frutos híbridos abortaban luego de 10 o 12 días después de la polinización, aunque esto varió con el año y con las líneas usadas (Della Gaspera, comunicación personal). En *Cucurbita*, Sisko *et al.* (2003) utilizan el rescate de embriones en la búsqueda de híbridos interespecíficos mediante el análisis del tamaño del genoma. Bagget (1979) también sugiere el cultivo de embriones para superar embriones mal desarrollados al cruzar especies de *Cucurbita* y señala que la probabilidad de éxito varió con el cultivar usado. El cultivo de óvulos y anteras ha sido intentado con éxito por Shail y Robinson (1987) para *C. melo* y *C. pepo* y el híbrido interespecífico fue obtenido cultivando embriones de fruta madura. Esto unido a la selección de líneas y la prueba de compatibilidad es al parecer, la estrategia más conveniente en la producción de híbridos en este género.

Al parecer es suficiente el estímulo de la llegada del tubo polínico de la especie cruzada para desencadenar el mecanismo de formación de la semilla, ya que los tegumentos, ambos tejidos maternos, desarrollan las cubiertas seminales, y esto podría ser la causa de la formación de las semillas vanas.

Para superar esta incompatibilidad se propone la conocida estrategia de selección de líneas pero basadas en la observación del embrión en diferentes momentos de su desarrollo, y el rescate de embriones. Esto unido a las técnicas usuales de polinización manual y el uso de *C. moschata* como dadora de polen.

Hipótesis

- *C. maxima* presenta líneas con mayor aptitud combinatoria o afinidad al cruzamiento con *C. moschata*.

Objetivo específico

- Identificar grupos de líneas de mayor aptitud combinatoria para la obtención de semilla híbrida en cruzamientos interespecíficos entre *C. maxima* y *C. moschata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos a campo se realizaron en la Estación Experimental Agropecuaria La Consulta INTA, situada en el departamento de San Carlos, Mendoza, Argentina (950 msnm; 33° 42' S y 69° 04' O). Se utilizaron líneas de *Cucurbita maxima* y *Cucurbita moschata* cv. Paquito durante tres ciclos de cultivo: 2005/06, 2006/07 y 2008/09.

Los estudios de laboratorio de los materiales recolectados se realizaron en el Laboratorio de Semillas José Cnkro de la EEA La Consulta INTA (La Consulta, Mendoza), en el laboratorio de Botánica Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (Chacras de Coria, Mendoza), y en el Laboratorio de Veterinaria de la EEA San Luis INTA (Villa Mercedes, San Luis).

1. POLINIZACIÓN MANUAL DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

Las líneas de *C. maxima* (♀) se reunieron en 5 grupos según sus características morfológicas y de origen, considerando cada línea como una unidad de muestreo, y se polinizaron con una mezcla de polen de flores de líneas de *C. moschata* cv. Paquito. Las líneas de *C. moschata*, utilizadas como padre, son muy similares entre sí y se tomaron como un solo grupo.

Se tomaron muestras de flores polinizadas y frutos correspondientes a tres campañas o ciclos de cultivo: 2005/06, 2006/07 y 2008/09. (Tabla 1.1, Cap. 1)

En los ciclos 2005/06 y 2006/07 se utilizó una mezcla de polen. La mañana de la polinización se recolectó alrededor de 80 flores masculinas, se les retiró el cáliz y corola, se desprendió el polen de cada flor con ligeros golpes de lápiz y se lo recogió sobre una caja de Petri limpia. Luego con un pincel se colocó la mezcla de polen sobre cada flor femenina, atando la corola e identificando la flor. En el ciclo 2008/09 se utilizó el método de flor directa.

En el primer año se aseguraron y polinizaron alrededor de 30 flores por grupo de líneas madres y no se obtuvieron frutos a madurez comercial. En el segundo año se aseguraron cerca de 20 flores por grupo y se recolectaron frutos a los 27 días y a término de maduración. En el ciclo 2008/09 los frutos fueron dejados en la planta hasta su madurez comercial. Los frutos pequeños fueron cortados en secciones y conservados en frascos de plástico con FAA. A los frutos a término, debido a su gran tamaño, se les extrajo la totalidad de las semillas y se las conservó en FAA.

2. PRUEBA DE LA TÉCNICA DE POLINIZACIÓN

Con el objetivo de conocer cómo influye la técnica de polinización en la producción de semillas, y para reducir las posibles fuentes de variabilidad, se hizo un ensayo durante 2007. Se utilizaron dos técnicas de polinización, flor directa y mezcla de polen, y 3 operarios. La mezcla de polen se hizo de alrededor de 40 flores masculinas. Se polinizaron 3 flores por técnica y por operario, consideradas como unidad de muestreo, pero no todas llegaron a formar fruto, y no se pudo contar con un operario en una combinación, por lo que el ensayo quedo definido de la siguiente manera:

Tabla 2.9: Flores polinizadas y frutos obtenidos en la prueba de polinización.

	Técnica de flor directa				Técnica de mezcla polen			
	Flores Aseg.	Frutos Obten.	Semillas por fruto	N	Flores Aseg.	Frutos Obten.	Semillas por fruto	N
Operario 1	4	3	11	33	0	0	0	0
Operario 2	4	2	11	22	4	3	11	33
Operario 3	4	2	11	22	4	2	11	22
Total por técnica	12	7		77	8	5		55

Los frutos obtenidos fueron cosechados a término y la semilla fue guardada seca en bolsas de papel.

De cada bolsa se extrajeron 11 semillas al azar, se las ablandó durante 24 horas en agua corriente. Se cortó transversalmente cada semilla con un bisturí y se observó en una lupa Nikon con aumento de 1X y 2,5X. Las mediciones se hicieron con una regla graduada a 0,5 mM. Se midieron longitud de semilla, longitud de embrión, de cotiledón y de radícula, ancho, porcentaje de llenado, y presencia o ausencia de malformaciones.

Se realizó un diseño anidado, en donde el factor operario se encuentra anidado dentro del factor polinización.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Se realizó el análisis de la varianza de las variables medidas y el análisis de comparación de medias por DGC ($\alpha= 0,05$)

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme”, se hizo un análisis de contingencia, clasificando por grupos de líneas, para la obtención de frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje.

3. SEMILLAS DE 27 DÍAS

Se observaron a la lupa semillas provenientes de frutos recolectados a los 27 días luego de la polinización, conservados en FAA. Estos corresponden solamente al segundo ciclo de cultivo (2006/07). De cada grupo se tomaron semillas al azar, con un bisturí se cortó longitudinalmente la semilla y se observó a la lupa con un aumento de 0,37 a 2,5X, sin colorantes.

Las mediciones se hicieron con una regla graduada a 0,5 mM. Se midieron longitud de semilla, longitud de embrión, de cotiledón y de radícula, ancho, porcentaje de llenado, y presencia o ausencia de malformaciones.

Se realizó un diseño anidado, en donde el factor línea se encuentra anidado dentro del factor grupo.

Tabla 2.10: Frutos y semillas analizadas a los 27 días de polinización. Ciclo 2006/7

Ciclo	Grupos	Líneas sembradas	Líneas analizadas	Semillas analizadas por fruto	N
2006/7	1	16	8	30	30
	2	6	2	30	30
	3	8	5	30	30
	4	7	2	30	30
	5	7	3	30	30

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Se realizó el análisis de la varianza de las variables medidas y el análisis de comparación de medias por DGC ($\alpha= 0,05$)

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme”, se hizo un análisis de contingencia, según los grupos de líneas, para la obtención de frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje.

4. SEMILLAS A TÉRMINO

En la campaña 2006/07 los frutos fueron cosechados y la semilla conservada en bolsas de papel y corresponden a las mismas bolsas guardadas de la prueba de las distintas técnicas de polinización. Se tomaron 10 semillas maduras al azar de cada bolsa, y 3 bolsas de cada grupo. Para ablandar las semillas y poder cortarlas fueron puestas previamente en agua durante 24 horas. En la campaña 2008/09 los frutos fueron cosechados y la semilla se conservó en FAA, se tomaron 10 semillas al azar de cada fruto, y 3 frutos de cada grupo.

Las semillas se cortaron longitudinalmente y se hicieron las siguientes mediciones: longitud de semilla, longitud de embrión, longitud de radícula, longitud y ancho de cotiledón, porcentaje de llenado, y presencia o ausencia de malformaciones. Las mediciones se hicieron con una regla graduada a 0,5 mM.

Se observaron a la lupa semillas a término y sin colorantes, de dos campañas y preservadas de distinta manera. Se realizó un diseño anidado, en donde el factor línea se encuentra anidado dentro del factor grupo.

Tabla 2.11: Frutos y semillas analizadas en frutos a término.

Ciclo	Grupos	Líneas analizadas	Frutos analizados	Semillas analizadas por fruto	N
2006/7	1	8	9	11	99
	2	2	3	11	33
	3	5	5	11	55
	4	2	3	11	33
	5	3	3	11	33
2008/9	1	2	3	10	30
	2	2	3	10	30
	3	3	3	10	30
	4	1	3	10	30
	5	3	3	10	30

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con Infostat/P V2008. Se realizó el análisis de la varianza de las variables medidas y el análisis de comparación de medias por test de Tukey ($\alpha= 0,05$)

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme”, se hizo un análisis de contingencia, estratificando por cosecha y luego por grupo, para la obtención de frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje.

Para el cruzamiento recíproco, en la campaña durante 2005/06 se cruzaron 5 flores de *C. moschata* con el polen de *C. maxima*. Los frutos se pudrieron a los pocos días. Por lo que en 2006/07 se hizo nuevamente y se los recolectó antes de su pudrición, a los 10 días luego de la polinización, y fueron conservados en FAA. Estas muestras fueron acondicionadas para cortarlas con micrótopo y observarlos al microscopio óptico.

Tabla 2.12: Resumen del material recolectado.

Grupos maternos	Ciclo 2005/06		Ciclo 2006/07		Ciclo 2008/09
	Flores aseguradas	Frutos recolectados en buen estado	Flores aseguradas	Frutos recolectados en buen estado	Frutos maduros recolectados
G 1	37	13	24	5	5
G 2	30	11	15	5	4
G 3	30	14	22	6	4
G 4	31	14	18	6	3
G 5	30	16	14	5	3
Prueba de polinización	0	0	20	12	0
Auto polinizados	0	0	12	9	0
Recíprocos	10	4	5	1	0
Total	168	72	130	49	19

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. POLINIZACIÓN MANUAL DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS

En la primer campaña se aseguraron gran cantidad de flores, pero sólo se pudo recolectar en cantidad suficiente hasta los muestreos de 2 días, con porcentajes de cuaje del 50-70 %. A partir de allí se encontraban muchos frutos pequeños, abortados o en estado de descomposición. Pese a haber planificado tener frutos para recolectar hasta los 50 días, sólo se pudieron recolectar hasta los 10 días, y muchos de ellos en mal estado, porque no quedaban más en el campo. A partir de los 3 días los porcentajes de cuaje bajaron al 0-30 %. Esto indica muchas flores perdidas a partir de los 3 días.

En la segunda campaña se aseguraron nuevamente muchas flores, y también se perdieron muchas, aunque no tantas, los porcentajes de cuaje fueron del 17-55 %. Aunque tampoco se pudieron llegar a recolectar frutos de más de 27 días. Por esta razón se agregó una tercera campaña, con la recolección de frutos a término. A razón de 3 a 5 por grupo.

Estas diferencias entre campañas se pudieron deber a diferencias estacionales o anuales que afectaron el cuajado de las flores o la viabilidad del polen (Johannsson y Stephenson, 1998).

2. PRUEBA DE LA TÉCNICA DE POLINIZACIÓN

Al hacer el ANAVA a los datos obtenidos, no se observaron diferencias entre la polinización de flor directa y la de mezcla de polen, como puede observarse en la tabla 2.13.

Tabla 2.13: Medias y desvíos estándar para los tipos de polinización. Ciclo 2006/7. En filas: letras distintas indican diferencias significativas de medias ($p \leq 0,05$).

	Tipo de polinización		
	Flor Directa	Mezcla de Polen	C. V. %
Longitud semilla mM	1,74 ± 0,09 a	1,73 ± 0,11 a	4,73
Longitud embrión mM	1,25 ± 0,21 a	1,23 ± 0,19 a	16,15
Longitud cotiledón mM	1,09 ± 0,19 a	1,05 ± 0,20 a	18,05
Longitud radícula mM	0,16 ± 0,04 a	0,16 ± 0,03 a	21,59
Ancho embrión mM	0,80 ± 0,13 a	0,79 ± 0,13 a	16,23
% llenado	79,42 ± 23,30 a	73,82 ± 26,60 a	30,89

Con respecto a los operarios, se vieron diferencias sólo en 2 de las 6 variables estudiadas, longitud de semilla y porcentaje de llenado.

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme” se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje, y el p-valor obtenido en el test de chi-cuadrado. El p-valor indica que no hay relación entre la técnica de polinización y la frecuencia de aparición de embriones deformes o no deformes, como se ve en la tabla 2.14.

Tabla 2.14: Frecuencias y estadísticos de la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”. FD: flor directa. MP: mezcla de polen.

Polinización	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
FD	44	57	33	43	77	0,7291
MP	33	60	22	40	55	
Total	77		55		132	

La polinización con flor directa se puede considerar de la misma calidad que la hecha con una mezcla de polen. Se valida el uso de esta técnica en las polinizaciones de híbridos.

3. SEMILLAS DE 27 DÍAS

En general los embriones en este estado no llegan a ocupar el 10 % de la semilla, ésta se encuentra ocupada casi completamente por una bolsa acuosa, el endosperma. En el extremo micropilar se encuentra el pequeño embrión, que en general tiene una longitud de 2 mM. La radícula tiene alrededor de 0,05 mM. (Figura 2.25). Los embriones aparecen muy pequeños no acompañando el desarrollo de la semilla, tal como lo describe Pozner (1993) para otros géneros de *Cucurbita*.

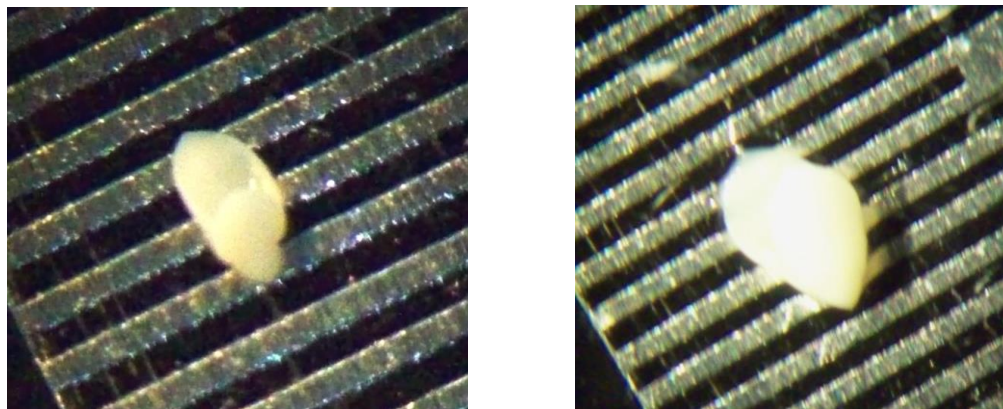


Figura 2.25: Embriones híbridos de semillas de 27 días. Las marcas en la regla corresponden a 0,5 mM.

En esta única campaña estudiada (Ciclo 2006/7) la deformación más común fueron cotiledones desiguales, es decir uno más largo que el otro, y embrión en posición atravesada, es decir su plano sagital desplazado 90° con respecto al plano sagital de la semilla. En menor medida se observaron cotiledones enrollados o plegados, y algunas semillas con endosperma que no ocupaba el 100 % de la semilla.

El análisis de la varianza y la comparación de medias pueden observarse en la tabla 2.15. Para la variable longitud de semilla los grupos 1 y 2 fueron estadísticamente superiores, para el resto de las variables fueron superiores los grupos 3 y 4.

Tabla 2.15: Medias y desvíos estándar de las variables medidas en embriones de 27 d. Ciclo 2006/7. En filas: letras distintas indican diferencias significativas de medias ($p \leq 0,05$).

	Grupos de líneas					C. V. %
	1	2	3	4	5	
Longitud semilla mM	1,76 ± 0,08 cd	1,81 ± 0,08 d	1,72 ± 0,07 c	1,56 ± 0,06 a	1,66 ± 0,06 b	4,1
Longitud embrión mM	0,17 ± 0,06 a	0,19 ± 0,05 a	0,36 ± 0,10 c	0,27 ± 0,10 b	0,14 ± 0,05 a	33,01
Longitud cotiledón mM	0,13 ± 0,05 a	0,14 ± 0,05 a	0,30 ± 0,09 c	0,21 ± 0,09 b	0,11 ± 0,03 a	36,52
Longitud radícula mM	0,04 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a	0,07 ± 0,03 b	0,05 ± 0,01 a	0,05 ± 0,01 a	31,22
Ancho embrión mM	0,10 ± 0,03 a	0,11 ± 0,04 a	0,24 ± 0,07 c	0,18 ± 0,07 b	0,10 ± 0,02 a	34,77
% llenado	8,50 ± 2,33 ab	9,83 ± 2,07 b	17,0 ± 4,66 d	13,97 ± 5,24 c	6,83 ± 3,14 a	32,92

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme” se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje, y el p-valor obtenido en el test de chi-cuadrado, que se presentan en la tabla 2.16. El p-valor indica que no hay relación entre grupos y la frecuencia de aparición de embriones deformes o no deformes en este momento del desarrollo del embrión.

Tabla 2.16: Frecuencias y estadísticos de la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”.

Grupo	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
1	15	50	15	50	30	>0,9999
2	17	57	13	43	30	
3	17	57	13	43	30	
4	16	53	14	47	30	
5	15	50	15	50	30	
Total	80		70		150	

4. SEMILLAS A TÉRMINO

En la campaña 2006/7 se observaron muchas malformaciones. Las más encontradas fueron cotiledones desiguales, es decir uno más grande, que ocupaba toda la semilla y a veces estaba plegado; y un cotiledón más pequeño que presentaba las venas bien marcadas, y le daban un aspecto de trilobado o tetralobado; otras veces tenía forma aguzada, enrollada hacia afuera o plegada (Figura 2.29). A veces el embrión se encontraba en posición atravesada, es decir su plano sagital desplazado 90° con respecto al plano sagital de la semilla (Figura 2.30). El embrión estaba separado de la semilla por una estructura transparente en forma de bolsa que envolvía al embrión, y podía encontrarse también entre ambos cotiledones. En general no había ausencia de embrión, sino que había un embrión muy pequeño en la proximidad de la micrópila (Figura 2.31). También se observó, aunque en poca frecuencia, cotiledones iguales pero pequeños, es decir bajo porcentaje de llenado (Figura 2.27).

Sin embargo, en la campaña 2008/9 se observaron mucha menos frecuencia de malformaciones que en la campaña 2006/7. Se vieron grandes cantidades de embriones bien formados (Figura 2.26), que ocupaban totalmente la semilla. Las malformaciones más comunes fueron los cotiledones desiguales, es decir uno bien formado, que llenaba toda la semilla, y el otro reducido. El endosperma

acompañaba el tamaño del embrión y no de la semilla y en algunos casos era difícil de desprender. El cotiledón más pequeño en general presentaba aspecto trilobado (Figura 2.28).



Figura 2.26: Semilla híbrida a término. Se observa el embrión bien formado y simétrico. Las marcas en la regla corresponden a 0,5 mM.

Cuando el embrión estaba subdesarrollado, estaba envuelto por una bolsa de aspecto acuoso. Se encontró también el embrión con aspecto de bolsa acuosa, transparente, con la radícula más oscura, adentro de la misma masa de células. Esta estructura en forma de bolsa de color marrón es el resto nucelar, es de naturaleza materna, no es el tegumento interno del óvulo, sino el tegumento interno de la semilla (Figura 2.27).



Figura 2.27: Semilla híbrida a término con embrión bien formado pero con poco llenado.



Figura 2.28: Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico, el más pequeño de margen trilobado.



Figura 2.29: Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón asimétrico, el más pequeño de aspecto aguzado.



Figura 2.30: Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón simétrico pero con el plano atravesado.



Figura 2.31: Semilla híbrida a término con embrión deforme. Cotiledón simétrico pero con el plano atravesado y de tamaño reducido.

También se observaron muchos embriones podridos en la campaña 2006/07, en algunos casos incluso se observaban hifas de hongos y olor a levadura. La podredumbre fue posterior a la formación del embrión, ya que éste estaba bien formado, pero con una coloración marrón, y aspecto blando y flojo. Esto se debió al distinto medio de conservación entre campañas, ya que en este caso fueron conservadas secas en bolsas de papel.

Se observó que en agua algunas semillas flotaban, se abrieron éstas especialmente pero no se pudo encontrar relación entre semillas que floten y semillas vanas.

En la tabla 2.17 se presenta el análisis de la varianza de las variables medidas para un diseño anidado (factor línea anidado al factor grupo) y el análisis de comparación de medias por test de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Tabla 2.17: Medias y desvíos estándar de las variables medidas en semillas a término. En filas: letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

	Cosecha	Grupos de líneas					C. V. %
		1	2	3	4	5	
Longitud semilla mM	2007	1,77 $\pm 0,08$ b	1,79 $\pm 0,11$ b	1,69 $\pm 0,07$ a	1,65 $\pm 0,07$ a	1,69 $\pm 0,07$ a	4,48
	2009	1,65 $\pm 0,10$ b	1,67 $\pm 0,09$ b	1,50 $\pm 0,10$ a	1,50 $\pm 0,09$ a	1,56 $\pm 0,08$ ab	5,65
Longitud embrión mM	2007	1,28 $\pm 0,21$ b	1,09 $\pm 0,41$ a	1,20 $\pm 0,12$ ab	1,23 $\pm 0,12$ b	1,29 $\pm 0,11$ b	17,22
	2009	1,32 $\pm 0,20$ b	1,32 $\pm 0,26$ b	1,21 $\pm 0,12$ a	1,21 $\pm 0,24$ a	1,31 $\pm 0,07$ b	15,38
Longitud cotiledón mM	2007	1,12 $\pm 0,19$ b	0,90 $\pm 0,37$ a	1,04 $\pm 0,11$ ab	1,07 $\pm 0,10$ b	1,12 $\pm 0,09$ b	17,92
	2009	1,14 $\pm 0,17$ b	1,14 $\pm 0,22$ b	1,03 $\pm 0,11$ a	1,00 $\pm 0,28$ a	1,11 $\pm 0,09$ ab	17,76
Longitud radícula mM	2007	0,16 $\pm 0,03$ b	0,14 $\pm 0,06$ a	0,16 $\pm 0,03$ b	0,16 $\pm 0,03$ b	0,17 $\pm 0,03$ b	22,28
	2009	0,20 $\pm 0,04$ a	0,18 $\pm 0,04$ a	0,18 $\pm 0,03$ a	0,17 $\pm 0,06$ a	0,19 $\pm 0,02$ a	21,78
Ancho embrión mM	2007	0,82 $\pm 0,12$ b	0,68 $\pm 0,27$ a	0,78 $\pm 0,09$ ab	0,80 $\pm 0,08$ b	0,85 $\pm 0,06$ b	16,86
	2009	0,82 $\pm 0,12$ b	0,77 $\pm 0,15$ ab	0,72 $\pm 0,07$ a	0,75 $\pm 0,21$ a	0,82 $\pm 0,06$ b	17,76
% llenado	2007	79,01 $\pm 20,25$ ab	63,64 $\pm 30,34$ a	81,27 $\pm 14,41$ b	83,41 $\pm 13,57$ b	87,73 $\pm 9,02$ b	23,35
	2009	97,88 $\pm 15,52$ a	97,50 $\pm 18,26$ a	96,17 $\pm 8,48$ a	93,33 $\pm 25,37$ a	100 ± 0 a	16,7

En el ANAVA realizado se observa en general diferencias estadísticamente significativas entre grupos, mientras que la variabilidad entre líneas de un mismo grupo no se presentó en igual medida. Esto está indicando que se realizó un buen agrupamiento de líneas (tabla 2.17).

En 2007 los grupos 1 y 2 fueron estadísticamente superiores en la variable longitud de semilla. Esta superioridad se mantuvo en el ciclo 2009. Con respecto a los embriones, la longitud fue superior en 2007 en los grupos 1, 4 y 5, mientras que en 2009 lo fueron el grupo 1, 2 y 5. Iguales resultados se mantienen para la variable longitud de cotiledón. Para la longitud de radícula no hay muchas diferencias, ya que en 2007 cuatro grupos son diferentes y en 2009 no hay diferencias entre grupos (tabla 2.17).

Para la variable ancho de embrión, en 2007 son estadísticamente superiores los grupos 1, 4 y 5, y en 2009 los grupos 1 y 5. Con respecto al porcentaje de llenado, los grupos 3, 4 y 5 fueron superiores en 2007. En 2009 sin embargo, no hubo diferencias entre grupos (tabla 2.17).

Para buscar una generalidad, son los grupos 1 y 5 los que más mantienen sus superioridades en las variables medidas y en las dos cosechas.

En la tabla 2.18 se presentan las frecuencias absolutas y relativas expresadas como porcentaje, para las variables categóricas “embrión deforme o ausente” y “no deforme”.

Tabla 2.18: Frecuencias y estadísticos para variables categóricas “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”, estratificado por ciclo de cosecha y por grupos de líneas.

grupo	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
1	69	53,9	59	46,1	128	<0,0001
2	46	77,9	13	22	59	
3	60	70,6	25	29,4	85	
4	43	69,3	19	30,6	62	
5	54	87,1	8	12,9	62	
Total	272	68,7	124	31,3	396	

Cosecha	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
2007	139	55,8	110	44,18	249	<0,0001
2009	133	90,5	14	9,52	147	
Total	272	68,7	124	31,31	396	

Cuando se clasificó por grupos de líneas, el p-valor obtenido indicó que hay relación entre la aparición de embriones deformes o no deformes y los grupos de líneas maternas. Los grupos que presentaron mayor frecuencia de embriones bien formados fueron los grupos 2 y 5, con más del 77 % de embriones bien formados (tabla 2.18).

Pero cuando se clasificó por ciclo de cultivo también se encontró una fuerte relación entre frecuencia de aparición de deformaciones y año. En el primer ciclo los embriones deformes y no deformes aparecen casi con la misma frecuencia, mientras que en el segundo ciclo hay más del 90 % de embriones bien formados (tabla 2.18).

En el análisis de la varianza, al observar las variables según el año, puede verse claramente una gran diferencia entre campañas. Mientras en la primera campaña el porcentaje de llenado no supera el 87 % en todos los grupos, y se

presentan un 44 % de embriones deformes o ausentes, en la campaña siguiente el porcentaje de llenado va de 93 a 100 % según el grupo, y se observan menos del 10 % de embriones deformes (tabla 2.19). Puesto que no hubo diferencias en espacio ni en manejo del cultivo, esto podría deberse a un efecto ambiental que estaría produciendo estos cambios en la aparición de malformaciones.

Debido a que la toma de datos para la variable porcentaje de llenado se hace de forma más rápida y estimativa, se aumentó el número de semillas analizadas, pasando de $n=10$ a $n=25$, en dos frutos para grupo y año estudiado, realizándose nuevamente un ANAVA para esta variable y un análisis de contingencia de frecuencia de aparición de embriones deformes o ausentes y no deformes.

Tabla 2.19: Medias y desvíos estándar del porcentaje de llenado en semillas a término. En columnas: letras distintas indican diferencias significativas de medias ($p \leq 0,05$)

Grupos de líneas	2007		2009	
	N	% llenado	N	% llenado
1	138	78,86 ab	60	98,79 a
2	61	68,03 a	60	98,57 a
3	83	79,94 ab	60	96,40 a
4	61	81,52 ab	70	92,86 a
5	72	85,34 b	60	100 a
Total	415		310	
C. V. %		23,82		15,71

En el ANAVA realizado se observa la misma tendencia del análisis anterior, con menor número de semillas analizadas, ya que en 2007 siguen siendo superiores las medias de los grupos 3, 4 y 5, pero en este caso el grupo 5 es estadísticamente superior. El grupo 2 continúa siendo el de menor llenado. En 2009 no se encontraron diferencias y hubo un porcentaje alto de llenado, superior al 92 %, en todos los grupos.

Para la variable categórica “embrión deforme o ausente” y “no deforme” se obtuvieron las siguientes frecuencias absolutas y relativas, expresadas como porcentaje, y el p-valor obtenido en el test de chi-cuadrado.

Tabla 2.20: Frecuencias y estadísticos para variables categóricas “embrión deforme o ausente” y “embrión no deforme”, estratificado por ciclo de cosecha y por grupos de líneas.

grupo	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
1	114	58	84	42	198	<0,0001
2	90	74	31	26	121	
3	109	76	34	24	143	
4	84	64	47	36	131	
5	114	86	18	14	132	
Total	511	70	214	30	725	

Cosecha	Embrión no deforme		Embrión deforme o ausente		Total	X ² p-valor
	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas %		
2006/7	232	56	183	44	415	<0,0001
2008/9	279	90	31	10	310	
Total	511	70	214	30	725	

Cuando se clasificó por grupos de líneas, el p-valor obtenido indicó que hay relación entre la aparición de embriones deformes o no deformes y los grupos de líneas maternas. Los grupos que presentaron mayor frecuencia de embriones no deformes fueron los grupos 5, 3 y 2 con más del 74 % de embriones bien formados, por lo que continúa la tendencia encontrada en el análisis anterior, con menor número de semillas analizadas (tabla 2.20).

Cuando se clasificó por ciclo de cultivo, también se encontró una fuerte relación entre frecuencia de aparición de deformaciones y año. En el primer ciclo los embriones deformes y no deformes aparecen casi con la misma frecuencia, mientras que en el segundo ciclo hay 90 % de embriones bien formados, continuándose la tendencia encontrada en el análisis anterior (tabla 2.20).

Para poder analizar las frecuencias de aparición de cada tipo de malformación, se las tomó como variables categóricas y se realizó un análisis de contingencia, estratificando por grupo de líneas y ciclo de cosecha, y se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas de tipos de malformaciones, expresadas como porcentaje, presentadas en las tablas 2.21 y 2.22, y en las figuras 2.32 y 2.33.

Tabla 2.21: Frecuencias absolutas y estadísticos de variables categóricas para cada malformación estratificado por ciclo de cosecha. NORM: cotiledones normales. AGUZ: cotiledón pequeño aguzado. AROLL: cotiledón pequeño arrollado. ATRAV: cotiledones atravesados. BILOB: cotiledón pequeño bilobado. DESIG: cotiledones desiguales. PODR: podridos. RAJAD: rajados. TETR: cotiledón pequeño tetralobados. TRILOB: cotiledón pequeño trilobado. VAC: semilla vacía.

Grupos de líneas	NORM	AGUZ	AROLL	ATRAV	BILOB	DESIG	PODR	RAJAD	TETR	TRILOB	VAC	Total	X ² p-valor
1	109	2	5	6	3	29	6	0	0	36	2	198	<0,0001
2	90	0	3	7	1	4	0	0	2	10	4	121	
3	105	1	0	4	0	21	5	0	0	7	0	143	
4	78	0	13	8	0	9	4	4	4	5	6	131	
5	101	1	2	5	0	9	13	0	0	1	0	132	
Total	483	4	21	30	4	72	28	4	6	59	2	725	

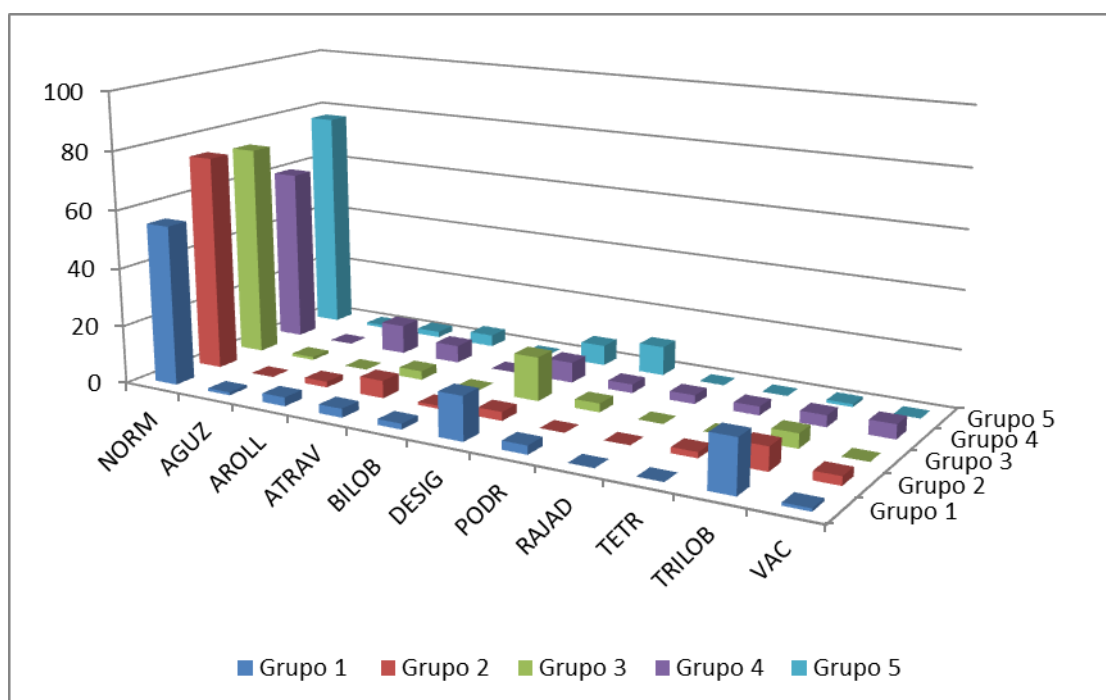


Figura 2.32: Frecuencias relativas de variables categóricas para cada malformación estratificadas por ciclo de cosecha.

Tabla 2.22: Frecuencias absolutas y estadísticos de variables categóricas para cada malformación estratificado por grupo de líneas. NORM: cotiledones normales. AGUZ: cotiledón pequeño aguzado. AROLL: cotiledón pequeño arrollado. ATRAV: cotiledones atravesados. BILOB: cotiledón pequeño bilobado. DESIG: cotiledones desiguales. PODR: podridos. RAJAD: rajados. TETR: cotiledón pequeño tetralobado. TRILOB: cotiledón pequeño trilobado. VAC: semilla vacía.

Ciclo	NORM	AGUZ	AROLL	ATRAV	BILOB	DESIG	PODR	RAJAD	TETR	TRILOB	VAC	Total	χ^2 p-valor
2007	204	4	14	29	4	61	28	0	6	59	6	415	<0,0001
2009	279	0	9	1	0	11	0	4	0	0	6	310	
Total	483	4	23	30	4	72	28	4	6	59	12	725	

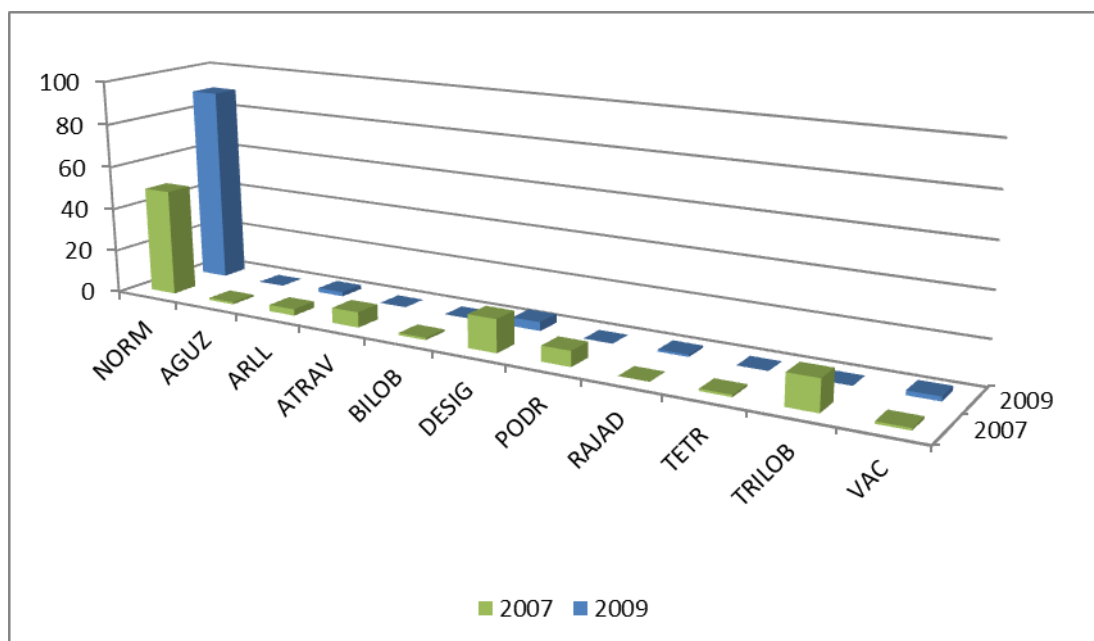


Figura 2.33: Frecuencias relativas de variables categóricas para cada malformación estratificadas por grupos de líneas.

Cuando se clasificó por grupos el p-valor obtenido indicó que hay relación entre tipos de malformaciones y los grupos de líneas maternas. Los embriones normales aparecen con más del 55 % de frecuencia en todos los grupos, presentando los mayores valores los grupos 4 y 5, y siendo el de menor valor el grupo 1. Las malformaciones más comunes fueron: cotiledón más pequeño trilobado, cotiledones desiguales y cotiledones arrollados, y aparecieron con más frecuencia en los grupos 1, 3 y 4 (figura 2.32).

Al clasificar por ciclo de cultivo, la cosecha 2007 presentó sólo el 49 % de embriones normales, las malformaciones más comunes fueron embrión más

pequeño trilobado y embriones desiguales. En 2009 hubo un 90 % de embriones normales (figura 2.33).

Estas malformaciones al afectar el tejido nutritivo de las semillas y su fuente de reservas, pueden afectar la viabilidad y el posterior desarrollo de la plántula, (Robinson, 1999) ya que durante la germinación los cotiledones atravesados no lograrían una correcta ruptura de las cubiertas seminales y los cotiledones más pequeños tendrían menos chances de una exposición conveniente para el desarrollo de la plántula.

Condiciones Ambientales

Las condiciones ambientales que influyen en la polinización y en el cuajado de frutos son la temperatura y la humedad (Nepi y Pacini, 1993). En la tabla 2.23 se presentan los registros de temperatura, humedad y precipitaciones, obtenidos en la EEA La Consulta INTA para las tres campañas estudiadas. En la campaña 2007/8 no se pudieron obtener frutos a término; durante la floración y el cuajado de frutos, es decir desde mediados de enero hasta fines de febrero.

Tabla 2.23: Condiciones meteorológicas durante la floración y el cuajado de frutos en los ciclos estudiados.

	2007		2008		2009	
	Enero	Febrero	Enero	Febrero	Enero	Febrero
Temperatura Media (°C)	22,8	20,9	21	21,1	22	22,1
Temp. mínima absoluta (°C)	7,9	1,9	6,7	8,5	7,9	7,6
Temp. máxima absoluta (°C)	35,5	36,7	36,7	34,3	33,7	36,7
Humedad relativa Media (%)	59	59	55	65	57	50
Lluvias (mM)	38,5	4	52	31,3	54,8	0,8

Las condiciones ambientales de enero de 2007 y enero de 2009, momento de floración de las líneas parentales, fueron muy similares, con diferencias sólo en precipitaciones, levemente superiores en 2009. En febrero, en cambio, momento de la polinización y el cuajado de frutos, fueron mayores las temperaturas media y la mínima absoluta, y hubo una humedad relativa inferior en 2009 que en 2007. Al parecer estas condiciones favorecerían a la polinización o el cuajado de frutos, y la aparición de embriones bien formados.

En la campaña 2008, donde no se obtuvieron frutos para estudiar a término, se observan temperaturas muy similares a las campañas donde sí se obtuvieron frutos, aunque las precipitaciones y la humedad registrada en febrero, muy superiores a las otras dos campañas, pudieron ser la causante de la pérdida de frutos para el estudio.

CONCLUSIONES. APORTES

La técnica de polinización no afectó a la variabilidad del estudio, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la polinización por mezcla de polen y la de flor directa. Se valida esta técnica para polinización de híbridos.

En semillas híbridas luego de 27 días de la polinización, se observaron embriones pequeños que no acompañan el tamaño de la semilla, tal como se describe para otros géneros de *Cucurbita* (Pozner, 1993). La deformación más común fueron cotiledones desiguales, es decir uno más largo que el otro, y embrión en posición atravesada, es decir su plano sagital desplazado 90° con respecto al plano sagital de la semilla. En menor medida se observaron cotiledones enrollados o plegados, y algunas semillas con endosperma que no ocupaba el 100 % de la semilla. El rescate de embriones podría ser una herramienta útil pero a esta altura del desarrollo sería tardío.

En semillas híbridas a término no se relaciona el tamaño de la semilla con el tamaño del embrión, ni la flotación de las semillas con presencia o ausencia del embrión. Las malformaciones encontradas variaron según los grupos de líneas y los años estudiados, resultados congruentes con lo expuesto por Whitaker y Robinson (1986) y Robinson (1999).

Se pudieron identificar grupos de líneas con mayor porcentaje de llenado y longitud de semilla, éstos serían mas afines al cruzamiento por presentar mejor aptitud combinatoria. Aunque varió según el ciclo analizado, fueron los grupos de líneas 1 y 5 los que se mostraron superiores con respecto a los otros grupos.

Los grupos de líneas con menores frecuencias de malformaciones fueron los grupos 5, 3 y 2. La campaña 2007 presentó alta frecuencia de aparición de malformaciones, con sólo un 49 % de embriones normales. Las malformaciones más comunes fueron cotiledones desiguales y cotiledón más pequeño de aspecto trilobado. En 2009 hubo cerca de 90 % de embriones normales.

Las condiciones ambientales del ciclo 2008/09 serían favorables para el desarrollo de embriones bien formados, esto es humedad relativa cercana al 50 %, temperaturas mínimas no inferiores a 7° C y ausencia de precipitaciones en este período.

Para poder conocer el verdadero impacto de las condiciones ambientales en la aparición de malformaciones y el llenado de las semillas, es aconsejable

continuar haciendo más observaciones de porcentaje de llenado, ya que es de fácil muestreo y no se necesitan instalaciones especiales para hacerlo, incluso puede hacerse a campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bisognin, D. A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Cienc. Rural* 32 (5): 715-723.
2. Camadro, E. L. Carputo, D. Peloquin, S. J. 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interespecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1369-1376.
3. Castro, H. A. Galvez, M. J. González, S. R. y Villamil, C. B. 2006. Protein composition of *Cucurbita maxima* and *C. moschata* seeds. *Biologia Plantarum* 50 (2): 251-256.
4. Dadlani, M. y Moore, T.A. 1998. Seed production. Chapter 17. In *Cucurbits*. N. M. Nayar and T. A. More ed. Science publishers Inc. U. S. A. 263-272 pp.
5. Facciuto, G. L. Soto, S. Morisigue, D. 2005. Nuevas variedades de *Lilium*: método de obtención y caracterización. *RIA*, 34 (2): 3-12.
6. Futuyma D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. Chapter 15. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. Pp 447-479.
7. Johannsson, M. H. Stephenson, A. G. 1998. Effects of temperature during microsporogenesis on pollen performance in *Cucurbita pepo* L. (*Cucurbitaceae*). *International Journal of Plant Sciences* 159 (4): 616-626.
8. Kho, Y. O. Den Nijs A. P. M. Franken, J. 2005. In vivo pollen tube growth as a measure of interspecific incongruity in *Cucumis* L. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 3: 52-54.
9. Kwack, S. N. Fujieda, K. 1985. Breeding high female lines through interspecific hybridization of *Cucurbita*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 8: 78-79.
10. Ondrej, V. Navratilova, B. and Lebeda, A. 1999. Determination of the crossing barriers in hybridization of *Cucumis sativus* and *Cucumis melo*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 24: 1-5.
11. Pozner, R. 1993. *Sistemas reproductivos en Cucurbitaceae argentinas*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pp. 1-220.
12. Quesada, M. Winsor, J. A. Stephenson, A. G. 1996. Effects of pollen selection on progeny vigor in a *Cucurbita pepo* x *C. texana* hybrid. *Theoretical and Applied Genetics* 92 (7):885-890.
13. Robinson, R. W. 1999. Rationale and methods for producing hybrid Cucurbit seed. In *Hybrid Seed Production in Vegetables: Rationale and Methods in Selected Crops*. Amarjit S. Basra ed. *Journal of New Seeds* 1 (3-4): 1-47.
14. Robinson, R. W. and D. S. Decker-Walters. 1997. *Cucurbits*. CAB Interantl. Wallingford. U K. Pp 226.
15. Shail, J. W. and Robinson, R. W. 1987. Anther and ovule culture of *Cucurbita*. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 10 (article 50): 92.
16. Shifriss, C. Cohen, S. 1974. An evaluation of F2 populations from a cross between *Cucurbita pepo* L. and *C. moschata* Dutch. for resistance to cucumber mosaic virus. *Euphytica* 23 (2):333-336.

17. Sisko, M. Ivancic, A. and Bohanec, B. 2003. Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using the embryo rescue technique. *Plant Science* 165: 663-669.
18. Weiling, F. 1966. Further investigations on progeny of pumpkin species hybrids. *Der Zuchter Genetics and Breeding Research* 36 (2):49-65.
19. Whitaker, T. W. Davis, G. N. 1962. Cucurbits. Botany, Cultivation, and utilization. *World Crops Books*. London, Leonard Hill (Books) limited. Interscience publishers, Inc. New York. Pp 210.
20. Whitaker, T. W. Robinson, R. W. 1986. Squash breeding. In: *Breeding Vegetable Crops*. Edited by Mark J. Basset. The AVI Publishing Company Inc. Connecticut. USA. Pp 209-242.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El desarrollo de esta tesis permitió la comprensión de algunos aspectos en la producción de híbridos de *Cucurbita*, en especial para el híbrido Aconcagua INTA; y la validación de algunas de las técnicas utilizadas a campo, como el uso de *Cucurbita moschata* como fuente de polen, debido a su alto porcentaje de viabilidad, y la técnica de polinización de flor directa sobre las flores de *C. maxima*. Personalmente he adquirido formación y experiencia en algunas etapas relacionadas al trabajo de mejoramiento a campo; como así también he aprendido técnicas de conservación del material vegetal, fijación, corte y coloración de tejidos en laboratorio, que fueron ajustadas por primera vez en nuestro país para estas dos especies. Del estudio de los cruzamientos interespecíficos de los 5 grupos de líneas de *Cucurbita maxima* x *C. moschata* surgen las siguientes conclusiones:

- En la observación a la lupa de cortes a mano alzada de óvulos 2 y 3 días después de la polinización no es posible asegurar que éste ha sido fertilizado, ya que la lisis del pico nucelar observado en muchos de ellos no indica necesariamente una fecundación viable, y se da en forma similar tanto en las autopolinizaciones como en los cruzamientos.
- En las observaciones al microscopio no se encontraron barreras precigóticas a nivel estigmático ni estilar, ya que se observó una alta frecuencia de granos germinados en el estigma de *C. maxima*, en mayor medida en los grupos de líneas 2 y 3; y grandes cantidades de tubos polínicos atravesando el canal estilar, en forma similar a los observados para las autopolinizaciones, en mayor cantidad en los grupos 4 y 5.
- Se observó por primera vez la formación de una ampolla o bolsa en el pico nucelar del óvulo, causada por la penetración del tubo polínico, como así también la formación de un tubo de acoplamiento para la descarga de gametas masculinas, en las autopolinizaciones de *Cucurbita maxima*. Estas estructuras también son observadas en los cruzamientos híbridos, aunque esto no implicaría una fecundación viable, ya que las cigotas luego de 2 ó 3 días después de la polinización se observan retraídas, con estructuras no bien definidas y con alta frecuencia de gránulos de almidón, lo que indicaría un embrión abortado. Es necesario continuar investigando ya que no pudieron observarse cigotas vivas en los cortes estudiados. Esto parece señalar que lo que actúa en este tipo de fecundaciones son barreras postcigóticas muy tempranas, ya que todo el proceso

de polinización se lleva a cabo en forma similar al de las autopolinizaciones, y el proceso se detiene momentos después de la descarga de las gametas, luego de la unión de los núcleos del gametofito masculino con la ovocélula.

- En semillas híbridas luego de 27 días de la polinización, se observaron embriones pequeños que no acompañan el tamaño de la semilla, tal como ocurre en las autopolinizaciones. La deformación más común fueron cotiledones desiguales, y embriones en posición atravesada. En menor medida se observaron cotiledones enrollados o plegados, y algunas semillas con endosperma que no ocupaba el 100 % de la semilla. El rescate de embriones podría ser una herramienta útil pero a esta altura del desarrollo sería tardío.

- En semillas híbridas a término no se relaciona el tamaño de la semilla con el tamaño del embrión, ni la flotación de las semillas con presencia o ausencia del embrión. La campaña 2006/7 presentó alta frecuencia de aparición de malformaciones, con sólo un 49 % de embriones normales. Las malformaciones más comunes fueron cotiledones desiguales y cotiledón más pequeño de aspecto trilobado. En 2008/9 hubo cerca de 90 % de embriones normales.

- Las condiciones ambientales del ciclo 2008/09 serían favorables para el desarrollo de embriones bien formados, esto es humedad relativa cercana al 50 %, temperaturas mínimas no inferiores a 7° C y ausencia de precipitaciones en este período. Para poder conocer el verdadero impacto de las condiciones ambientales en la aparición de malformaciones y el llenado de las semillas, es necesario continuar haciendo más observaciones de porcentaje de llenado en diferentes campañas, ya que es de fácil muestreo, y no se necesitan instalaciones especiales para hacerlo, incluso puede hacerse a campo.

- Se pudieron identificar grupos de líneas con mayor porcentaje de llenado y longitud de semilla. Aunque esto varió según la campaña, fueron los grupos de líneas 1 y 5 los que se mostraron superiores con respecto a los otros grupos. Los grupos de líneas con menores frecuencias de malformaciones fueron los grupos 5, 3 y 2. Estos grupos de líneas serían mas afines al cruzamiento con *C. moschata* por lo que se podrá reducir el número de líneas sembradas cada año en la EEA La Consulta INTA, y de esta manera optimizar la utilización de la superficie y otros recursos.