

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

COMPATIBILIDAD PRECIGÓTICA EN WAX FLOWER (*Chamelaucium megalopetalum x Chamelaucium uncinatum*) VARIEDADES GUY Y MAYA A NIVEL INTRAESPECÍFICO, INTERESPECÍFICO E INTERGENÉRICO

Melba Benavides

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Bachelor Science en Biotecnología y Ecología

Quito

Mayo del 2005

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Vida**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**COMPATIBILIDAD PRECIGÓTICA EN WAX FLOWER
(*Chamelaucium megalopetalum* x *Chamelaucium uncinatum*)
VARIETADES GUY Y MAYA A NIVEL INTRAESPECÍFICO,
INTERESPECÍFICO E INTERGENÉRICO**

Melba Beatriz Benavides Villarreal

María de Lourdes Torres Ph.D.

Directora de Tesis

Licenciada Ana María Quiñónez

Miembro del Comité de Tesis

Carlos Valle Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Hugo Valdebenito Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias de la vida

Quito, Febrero del 2005

© Derechos de autor

Melba Beatriz Benavides Villarreal

2005

*A mis padres y hermanos que durante todo este proceso
me han ayudado con su apoyo incondicional*

Agradecimientos

Agradezco a Hilsea Investments Ltd. Grupo Esmeralda Ecuador por abrirme las puertas de su empresa para que pueda llevar a cabo mi tesis en especial a Ana María Quiñones, directora del laboratorio Esmeralda Breeding & Biotechnology, Eduardo Barahona y María Elena Guerrero tutores de mi proyecto, a todo el equipo de Esmeralda Breeding biólogos, agrónomos y trabajadores quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme. A Peter Ulrich propietario de Hilsea Investments. A María de Lourdes Torres directora de mi proyecto y a Carlos Valle parte de mi comité por haberme ayudado y guiado durante todo este proceso y por último a David Vera por haber colaborado en la parte estadística del proyecto.

Resumen

El Wax flower, nombre común con el que se conoce a las especies del género *Chamelaucium*, es un cultivo originario de Australia que se está comenzando a comercializar a nivel internacional, prometiendo ser un cultivo lucrativo muy importante. Por estos motivos, es muy importante mejorar el potencial de comercialización de este grupo mediante la creación de nuevas variedades, interesantes para el mercado.

Desde 1995 se está trabajando en el mejoramiento del Wax Flower. Los esfuerzos se han enfocado principalmente en el híbrido *Chamelaucium megalopetalum* x *Chamelaucium uncinatum* ya que es un cultivo con el que no se han tenido resultados en cuanto a fitomejoramiento. El objetivo de este estudio fue identificar los cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos compatibles a nivel precigótico utilizando al híbrido *Ch. megalopetalum* x *Ch. uncinatum* como receptor de polen o planta madre; identificar en los cruces incompatibles a qué nivel se dan las barreras de incompatibilidad precigóticas y estudiar técnicas como corte de estilo y aplicación del químico A*, fertilizante hecho a base de titanio, utilizado para superar las barreras de incompatibilidad precigóticas.

De acuerdo al estudio, los cruces compatibles identificados a nivel precigótico fueron los cruces interespecíficos de las variedades Guy y Maya del híbrido mencionado, con las tres variedades de *Ch. uncinatum*, Della, Orchid y Early violet y por otro lado los cruces intergenéricos de las dos variedades del híbrido con *Verticordia Plumosa*. Con estos cruces se debe seguir trabajando hasta obtener nuevas variedades. En el resto de cruces intergenéricos, con *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* y *Scholtzia cascade* se vio compatibilidad parcial, en estos casos se deben estudiar técnicas para superar las barreras de incompatibilidad precigóticas encontradas. Los cruces intraespecíficos, tanto con Guy, Maya como con el resto de variedades del híbrido resultaron completamente incompatibles. Los tratamientos químico y de corte de estilo no resultaron efectivos ya que no mejoraron la compatibilidad de los cruces en los que fueron aplicados.

Abstract

Wax Flower, common name for species of the genus *Chamelaucium*, is a cultivar native from Australia that is starting to commercialize at international level and promises to be a very important and lucrative cultivar. For these reasons it is very important to improve the potential of commercialization of this group through the breeding of new interesting cultivars for the market.

Since 1995 Breeding programs are being carried out with the Wax Flower group, especially with the hybrid *Chamelaucium megalopetalum* x *Chamelaucium uncinatum*, because successful breeding has not yet been obtained with this cultivar. The objective of this research was to identify compatible prezygotic crosses at the intraspecific, interspecific and intergeneric levels using the hybrid *Ch. megalopetalum* x *Ch. uncinatum* as pollen receptor or mother plant; to identify the level at which incompatibility barriers are produced in the incompatible crosses and to study techniques like style-cutting and application of A* compound, fertilizer made of titanium, used to overcome the prezygotic incompatibility barriers.

According to this research, the crosses found to be compatible at the prezygotic level were the interspecific crosses between the varieties Guy and Maya of the hybrid with the three varieties of *Ch. uncinatum* (Della, Orchid and Early violet). The intergeneric crosses of the two varieties of the hybrid with *Verticordia plumosa* were also found to be compatible at the prezygotic level. With these compatible crosses would be interesting to work until new varieties are obtained. With the rest of the intergeneric crosses, with: *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* and *Scholtzia cascade*, partial compatibility was found. Techniques to overcome the prezygotic incompatibility barriers are important study priorities for these crosses. The intraspecific crosses with Guy and Maya as pollen receptors were self-incompatible and these varieties were also incompatible with the rest of varieties of the hybrid. The chemical treatment and the style-cutting technique were not successful methods as they did not improve the prezygotic compatibility in the crosses in which they were used.

Tabla de Contenidos

1. Introducción	1
1.1 Características generales	1
1.2 Fitomejoramiento	2
1.2.1 Incompatibilidad	3
1.2.2 Barreras pre-cigóticas	5
1.2.3 Barreras post-cigóticas	5
2. Objetivos	7
2.1 Objetivos generales	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. Área de Estudio	7
4. Materiales y Métodos	7
4.1 Materiales	7
4.2 Métodos	8
4.2.1 Cruces	8
4.2.2 Estimación de viabilidad de polen de las variedades y especies donadoras mediante acetocarmín	8
4.2.3 Emasculación de variedades receptoras de polen	8
4.2.4 Polinización	9
4.2.5 Observación de Tubos polínicos mediante tinción con azul de anilina y microscopía de fluorescencia.	9
4.2.6 Métodos para superar las barreras de incompatibilidad precigóticas.	10
4.2.6.1 Tratamiento químico	10
4.2.6.2 Corte de estilo	11
4.2.7 Métodos Estadísticos	11
5. Resultados	12
5.1 Viabilidad y cantidad de granos de polen, profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico	12
5.2 Evaluación de cruces en general	13
5.3 Cruces intraespecíficos	14
5.4 Cruces interespecíficos	14
5.5 Cruces intergenéricos	15
5.6 Comparación de cruces en general	15
5.7 Cruces en los que se encontró compatibilidad	15
5.8 Comparación de cruces entre Guy y Maya en los que intervino un	16

mismo donador de polen	
5.9 Evaluación de las técnicas de aplicación del químico A* y corte de estilo	16
6. Discusión	17
7. Conclusiones	22
8. Recomendaciones	23
Bibliografía	25
Tablas	27
Tabla 1. Moda, Media y Desviaciones standard de profundidad e intensidad de entrada de Tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos, e intergenéricos en general.	27
Tabla 2. Moda, Media y Desviaciones standard para profundidad e intensidad de entrada de Tubo polínico para los cruces intergenéricos,	27
Tabla 3. Media y desviaciones standard de profundidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.	28
Tabla 4. Moda de profundidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.	28
Tabla 5. Media y desviaciones standard de intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.	29
Tabla 6. Moda de intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.	29
Tabla 7. Tabla de Evaluación de la profundidad y de la intensidad de entrada de tubo polínico para los cruces en los que se vio compatibilidad	30
Tabla 8. Medias para la profundidad de entrada de tubo polínico en controles y tratamientos químico y corte de Estilo.	30
Tabla 9. Modas para la profundidad de entrada de tubo polínico en controles y tratamientos químico y corte de Estilo,	31
Figuras	
Figura 1. Observación de granos de polen viables de mediante la técnica de acetocarmín.	31
Figura 2. Observación de granos de polen no viables mediante técnica de acetocarmín.	32
Figura 3. Observación de estigma sin granos de polen, mediante microscopía de fluorescencia	32
Figura 4. Observación de granos de polen sin germinar, mediante microscopía de fluorescencia	33

Figura 5. Observación de granos de polen germinando, mediante microscopía de fluorescencia	33
Figura 6. Observación de granos de polen germinando, hasta el primer tercio del estilo, mediante microscopía de fluorescencia.	34
Figura 7. Observación de crecimiento de tubo polínico, hasta la parte terminal del estilo, mediante microscopía de fluorescencia.	34
Figura 8. Observación de crecimiento de tubo polínico, hasta el ovario mediante microscopía de fluorescencia	35
Figura 9. Porcentaje de Viabilidad de polen analizado mediante acetocarmín para las variedades y especies utilizadas como donadoras de polen.	35
Figura 10. Correlación entre promedios de viabilidad y profundidad de entrada de tubo polínico para cada donador de polen.	36
Figura 11. Cantidad de granos de polen estimada mediante la técnica de acetocarmín para las variedades donadoras.	36
Figura 12. Correlación entre Cantidad de Granos de Polen y Porcentaje de viabilidad mediante técnica de Acetocarmín para cada variedad utilizada como donadora de polen	37
Figura 13. Correlación entre promedios de profundidad y promedios de intensidad de entrada de tubo polínico.	37
Figura 14. Correlación entre Cantidad de Granos de polen e intensidad de entrada de Tubo Polínico.	38
Figura 15. Medias de Profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos	38
Figura 16. Medias de Profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intergenéricos.	39
Figura 17. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos entre las variedades Guy y Maya del híbrido <i>Ch. megalopetalum</i> x <i>Ch. uncinatum</i> y las variedades Guy Maya, Adi, Erez y Revelation del mismo híbrido.	39
Figura 18. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Guy	40
Figura 19. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Maya.	40
Figura 20. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Adi.	41
Figura 21. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el	41

cruce intraespecífico Guy x Erez. .	
Figura 22. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Revelation.	42
Figura 23. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Maya.	42
Figura 24. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Guy.	43
Figura 25. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Adi.	43
Figura 26. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Erez..	44
Figura 27. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Revelation.	44
Figura 28. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Early violet.	45
Figura 29. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Orchid.	45
Figura 30. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Della.	46
Figura 31. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Orchid.	46
Figura 32. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Della.	47
Figura 33. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Early violet. .	47
Figura 34. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Verticordia plumosa</i> .	48
Figura 35. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Verticordia plumosa</i> .	48
Figura 36. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Astartea pink</i> .	49
Figura 37. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Hypochalyma robustum</i>	49
Figura 38. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Scholtzia cascade</i> .	50
Figura 39. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Astartea pink</i> .	50

Figura 40. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Scholtzia cascade</i> .	51
Figura 41. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Hypochoalyma robustum</i>	51
Figura 42. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Astartea pink</i> , control y tratamientos químico y corte de estilo.	52
Figura 43. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Hypochoalyma robustum</i> , control y tratamientos: químico y corte de estilo.	52
Figura 44. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x <i>Scholtzia cascade</i> , control y tratamientos: químico y corte de estilo,	53
Figura 45. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Astartea pink</i> , control y tratamiento corte de estilo.	53
Figura 46. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Hypochoalyma robustum</i> , control y tratamiento corte de estilo.	54
Figura 47. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x <i>Scholtzia cascade</i> , control y tratamiento corte de estilo.	54
 Anexos	
Anexo 1. Estadios de Floración en <i>Chamelaucium megalopetalum</i>	55
Anexo 2. Períodos de floración para las variedades del Wax flower en Esmeralda Breeding and Biotechnology	56
Anexo 2. Períodos de floración para las variedades del grupo <i>Ch. megalopetalum</i> x <i>Ch. uncinatum</i> en Esmeralda Breeding and Biotechnology	57
Anexo 4. Porcentaje de viabilidad de polen promedio, observado en el grupo <i>Chamelaucium megalopetalum</i> durante los años 2002-2003	58
Anexo 5. Resultados de ensayos hechos en EB&B hasta Marzo del 2003 en compatibilidades precigóticas a nivel intraespecífico, interespecífico e intergenérico con las variedades de <i>Chamelaucium megalopetalum</i> .	58
Anexo 6. Tabla de Similitud en base a AFLP para <i>Chamelaucium megalopetalum</i> (variedades Adi y Guy), versus variedades de <i>Chamelaucium uncinatum</i> , <i>Astartea pink</i> ,	59

<i>Astartea white</i> , <i>Hypocalyma robustum</i> y <i>Verticordia plumosa</i> .	
Anexo 7. Cruces realizados a nivel intraespecífico, en los que intervino <i>Chamelaucium megalopetalum</i> como receptor de polen	60
Anexo 8. Cruces realizados a nivel interespecífico, en los que intervino <i>Chamelaucium megalopetalum</i> como receptor de polen	61
Anexo 9. Cruces realizados a nivel intergenerico, en los que intervino <i>Chamelaucium megalopetalum</i> como receptor de polen.	62
Anexo 10. Valores P encontrados para comparaciones entre cruces, utilizando <i>Chamelaucium megalopetalum</i> (Guy) como receptora de polen.	63
Anexo 11. Valores P encontrados para comparaciones entre cruces, utilizando <i>Chamelaucium megalopetalum</i> (Maya) como receptora de polen.	66
Anexo 12. Valores P encontrados para comparaciones de profundidad de entrada de Tubo polínico entre cruces Intraespecíficos, Interespecíficos e Intergenéricos.	70
Anexo 13. Valores P encontrados para comparaciones de profundidad de entrada de Tubo Polínico, entre cruces utilizando <i>Chamelaucium megalopetalum</i> Guy versus <i>Ch. megalopetalum</i> Maya como receptores de polen.	71
Anexo 14. Valores P encontrados para comparaciones de profundidad de entrada de Tubo polínico entre controles y tratamientos químico y corte de estilo, utilizando <i>Chamelaucium megalopetalum</i> Guy y Maya como receptores de polen.	72

1. Introducción

1.1 Características generales

El género *Chamelaucium* de la familia Myrtaceae, consta de 31 especies, seis de ellas se cultivan como flores de corte. Este género es endémico para el este y sur de Australia. Wax flower, nombre común con el que se conoce a las especies del género *Chamelaucium*, es un cultivo que se usa como relleno en los arreglos florales y que se está comenzando a comercializar a nivel internacional, prometiendo ser un cultivo lucrativo muy importante. El desarrollo como flor de corte de este grupo se ha dado durante los últimos 30 años y en Australia en las últimas dos décadas. Actualmente el grupo *Chamelaucium* está liderando el mercado de las flores nativas comerciales. Wax flower está dentro de las 20 especies más vendidas en términos de volumen en Europa. Al momento se cultivan alrededor de 50 variedades, siendo la mayoría seleccionadas de poblaciones naturales (Growth et al, 2000).

Las flores de *Chamelaucium* son protándricas, en las que se manifiesta secuencialmente los dos sexos, primero el masculino y luego el femenino. Durante el estadio masculino, el botón se abre y las anteras al abrirse rozan el estigma de la flor, el estilo se alarga y el polen queda impregnado en los pelos estilares presentes en el estigma, que impiden la autopolinización, en este estadio el polen alcanza su punto máximo de viabilidad y su presencia en el estigma facilita su transferencia a los vectores para la polinización (Anexo 1) (Beardsell, 1991).

Durante el estadio femenino el receptáculo se llena de néctar haciendo atractiva la flor para la polinización, en este estadio los pelos estilares se dirigen hacia abajo lejos del estigma, el estilo comienza a alargarse y el estigma se hace receptivo. La viabilidad del polen en los pelos estilares en este estadio es del 16% y la flor puede ser polinizada por el polen de otra flor (Beardsell, 1991).

La floración del grupo *Chamelaucium* en la zona templada va de otoño a primavera (NIR Wax Flower, 2003). Según observaciones hechas acerca de los periodos de floración del género *Chamelaucium* en el Ecuador, se ha visto un pico de floración durante los meses de Diciembre, Enero y Agosto (Anexo 2). Por otro lado en la especie *Ch. megalopetalum* en particular el período de floración es constante casi durante todo el año (Anexo 3).

De acuerdo a estudios moleculares de filogenia se ha visto en el género *Chamelaucium* una marcada herencia materna por parte de los cloroplastos (Yang, 2001). El número cromosómico de *Chamelaucium megalopetalum* es 22n. El polen de estas plantas es altamente viable en comparación con ciertos genotipos triploides y hexaploides. Para los objetivos del mejoramiento genético es importante tomar en cuenta el número cromosómico de las especies que intervendrán en los cruces ya que para un cruce exitoso las especies deben tener el mismo nivel de ploidía (Growth *et al*, 2000).

Chamelaucium uncinatum es la especie más conocida del género y ha sido ampliamente cultivada como planta de jardín en el este de Australia. En 1970 fue introducida en Israel. Actualmente es cultivada en Australia, Israel, California y en áreas más pequeñas en Sudáfrica, Zimbabwe, Chile, China, Francia y Perú. (Growth *et al*, 2000).

Chamelaucium megalopetalum es un arbusto perenne que alcanza de 2-3 metros de altura, tiene hojas pequeñas y en forma de agujas en colores que van desde el verde claro al verde oscuro, sus flores son pequeñas pentámeras con colores que varían entre blanco, rosado y púrpura (NIR Wax Flower, 2003).

En Ecuador, en general las especies del género *Chamelaucium* no son cultivadas, pero Esmeralda Breeding and Biotechnology trabaja en el fitomejoramiento de *Chamelaucium megalopetalum* hr. y de *Chamelaucium uncinatum*.

1.2 Fitomejoramiento

En Australia se comenzó a trabajar en el mejoramiento genético del género *Chamelaucium* desde 1995 y en Ecuador los laboratorios de Esmeralda Breeding & Biotechnology han trabajado con Wax Flower, tanto con *Ch. megalopetalum* hr. como con *Ch. uncinatum* desde el 2001 (Comm. pers., Eduardo Barahona).

Para Esmeralda Breeding el objetivo del mejoramiento genético en wax flower es conseguir específicamente nuevos colores diferentes de blanco, rosado y lila-violeta, un contraste de color interesante entre el centro de la flor y los pétalos, buen contraste entre los botones y la flor abierta, flores con diferente estructura, forma, tamaño y con mayor densidad de pétalos, variedades de larga duración en florero, variedades con floración

temprana o tardía para realizar cruces y con resistencia a la clorosis (Comm. pers., Ana María Quiñones).

El mejoramiento genético de esta especie se puede llevar a cabo de manera similar al mejoramiento que se hace con otras especies ornamentales, mediante hibridación de variedades con características deseadas, mutagénesis inducida por radiación o químicos como en el caso de la poliploidización y selección de mutaciones interesantes que se pueden dar de forma natural y al azar (Van Creij *et al*, 1997).

Muchas veces la esterilidad puede ser causada por falta de apareamiento de los cromosomas homólogos durante la meiosis, por lo que se ha utilizado la poliploidización como método para restaurar la fertilidad en estos casos. El objetivo de este procedimiento es duplicar el número de cromosomas presentes en la célula de manera que puedan aparearse adecuadamente durante la meiosis. El tratamiento consiste en la aplicación directa de colchicina u otros químicos (con la misma función) en tejidos como hojas o yemas. El químico actúa interiormente en las células del tejido impidiendo la formación del huso mitótico y bloqueando el movimiento de los cromosomas por lo que no ocurre división celular dando lugar a una célula con número doble de cromosomas (Van Creij *et al*, 1997).

La hibridación consiste en el proceso de llegada de polen al estigma de la flor de la otra especie o variedad, la germinación del tubo polínico, la entrada y crecimiento del mismo a través del estilo hasta llegar al saco embrionario y la liberación de las células espermáticas que fertilizan al óvulo y forman el cigoto. Cuando se utiliza la hibridación se escogen variedades con características deseadas y se hace el cruce, en caso de que el cruce no sea viable se debe analizar la causa de incompatibilidad que puede ser pre o postcigótica y de acuerdo a eso utilizar técnicas para superar la incompatibilidad con el fin de obtener el híbrido deseado (Vaistein, 2002).

1.2.1 Incompatibilidad

La incompatibilidad ha evolucionado en algunas especies para prevenir la autopolinización de manera que no se de inbreeding y mantener así la estabilidad de la especie. Hay mecanismos morfológicos, fisiológicos y genéticos que impiden la autopolinización. Dentro de los mecanismos fisiológicos tenemos la protandria y protogimia (Borojevie 1990).

La protandria es una condición en la cual los estambres maduran antes que el estigma, impidiendo que los granos de polen polinicen el estigma de la misma planta. En la protoginia el estigma madura antes que los estambres impidiéndose de igual manera la autopolinización (Borojevie 1990).

Dentro de los mecanismos morfológicos que impiden la autopolinización tenemos la hercogamia, condición en la que el arreglo físico de los órganos masculinos y femeninos en la flor se da de tal manera que se previene la autopolinización en ausencia de insectos, como en el caso de la heterostilia que se da por una diferencia de longitudes entre los estambres y el estilo, siendo el estilo mucho más largo que las anteras o las anteras que el estilo (Borojevie 1990).

Dentro de los mecanismos genéticos tenemos la incompatibilidad homomórfica que puede ser gametofítica o esporofítica. La incompatibilidad gametofítica se da por la presencia de una serie de alelos en un mismo locus, los alelos S. El estilo de cualquier planta tiene dos diferentes alelos S y los granos de polen sólo uno, si uno de los dos alelos expresados en el estilo es igual al alelo expresado en el grano de polen, el tubo polínico no puede penetrar y no se da fecundación porque se inhibe el crecimiento del tubo polínico. Por otro lado si el alelo expresado en el estilo es diferente del expresado en el grano de polen el crecimiento de tubo polínico se da normalmente (Borojevie 1990).

La incompatibilidad interespecífica se ha dado como una adaptación que previene la formación de híbridos interespecíficos, restringiendo el flujo genético entre las especies. Este tipo de incompatibilidad se da generalmente entre especies compatibles con ellas mismas (autocompatibles) y especies cercanas autoincompatibles (Watts 1984).

Por lo general la incompatibilidad interespecífica se da cuando la especie autocompatible es el donador de polen de la especie autoincompatible, sin embargo la incompatibilidad se puede dar entre dos especies autocompatibles, dos autoincompatibles o cuando el donador de polen en una especie autoincompatible y el receptor una autocompatible (Watts 1984).

La relación entre este tipo de incompatibilidad interespecífica y la autoincompatibilidad no es clara, pero muy probablemente los alelos S juegan un papel importante en determinar el resultado de los cruces interespecíficos. En estudios con *Lycopersicon* se vio que un gen en o cerca del locus S tiene una función principal en determinar la

incompatibilidad interespecífica, pero muchos autores sustentan que no hay relación entre estos dos tipos de incompatibilidad sobretodo en cruces entre especies más distantes (Watts 1984).

1.2.2 Barreras de incompatibilidad precigóticas

Hay diferentes tipos de barreras precigóticas que incluyen baja viabilidad de polen (nula o poca germinación de los granos de polen), inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estigma o en el estilo, bloqueo de la entrada de los tubos polínicos al ovario e inhibición del crecimiento del tubo polínico en el interior de los óvulos. La falta de crecimiento del tubo polínico se puede deber a que por evolución, el tubo se ha adaptado a crecer sólo hasta cierta distancia en el estilo de la especie a la que pertenece de manera que muchas veces no puede llegar a los ovarios de otras especies. Otra razón puede ser la incompatibilidad entre el polen extraño y los óvulos debido a la presencia de receptores específicos tanto en el polen como en el ovario (Van Creij *et al*, 1997).

Cuando las barreras de incompatibilidad son precigóticas, éstas podrían ser superadas mediante técnicas como corte de estilo o utilización de químicos como hormonas entre las cuales tenemos el BAP (Benzil Amino purina) o ácido giberélico que promueven el crecimiento del tubo polínico al ovario. Otro método es colocar el polen directamente en los óvulos en el interior de la placenta o sobre los óvulos aislados. Se puede mejorar la efectividad de estas técnicas llevándolas a cabo in-vitro, con lo que se proporcionan las condiciones ambientales óptimas (Van Creij *et al*, 1997).

1.2.3 Barreras de incompatibilidad postcigóticas

Una vez fertilizados los óvulos, se pueden presentar barreras postcigóticas, debido a abortos, cuando los embriones no han llegado a su estado de madurez. Esto se puede deber a un mal funcionamiento del embrión, del endospermo o del tejido materno o debido a clorosis o albinismo híbrido. Puede ocurrir también que el híbrido no florezca aún después de haber llegado a la madurez (Van Creij *et al*, 1997).

Para superar las barreras postcigóticas se puede utilizar la técnica de rescate de embriones, que consiste en remover los embriones y los óvulos asépticamente y cultivarlos en un medio estéril hasta que se de la germinación. El estado de desarrollo en el cual los embriones son colocados in-vitro afecta el porcentaje de embriones que

pueden ser recuperados. El número de embriones que pueden sobrevivir in-vitro se incrementa conforme se incrementa el estado de madurez del embrión (Van Creij *et al*, 1997).

El presente estudio se enfocó en la investigación de barreras precigóticas del híbrido *Ch. megalopetalum* x *Ch. uncinatum* (*Ch. megalopetalum hr.*) variedades Guy y Maya ya que en ensayos previos se ha visto incompatibilidad a nivel intraespecífico, probablemente debido a que el polen de estas variedades es poco viable (Anexo 4), no germina, o si lo hace, sólo llega hasta cierta parte del estilo de manera que no se ha podido obtener semillas (Anexo 5). Por otro lado el grado de compatibilidad de *Ch. megalopetalum hr.* a nivel interespecífico e intergenérico no ha sido lo suficientemente estudiado.

De acuerdo a estudios fenéticos con *Ch. megalopetalum hr.* se vio que a nivel intraespecífico hay un 100% de correlación. A nivel interespecífico se vio un 80% de correlación entre las variedades Guy y Adi de *Ch. megalopetalum hr.* y las variedades de *Ch. uncinatum* y a nivel intergenérico se vio un 69% de correlación entre las variedades de *Ch. megalopetalum hr.* y *Verticordia plumosa*, *Astartea pink*, *Astartea white* e *Hypochalyma robustum* (Anexo 6).

En ensayos previamente realizados, se ha visto que las variedades de *Ch. megalopetalum hr.* tienen mayor compatibilidad con las variedades de *Ch. uncinatum* y por otro lado con *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* y *Verticordia plumosa* (Anexo 5).

Debido a que no se han obtenido buenos resultados y a que no se han hecho los estudios suficientes en cruces en los que intervenga *Ch. megalopetalum hr.* es muy importante determinar la compatibilidad de estos híbridos a nivel intraespecífico, interespecífico e intergenérico de manera que se pueda dirigir el mejoramiento genético de *Ch. megalopetalum hr.* mediante hibridación.

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

Estudiar la compatibilidad de *Ch. megalopetalum hr.* al realizar cruces a nivel intraespecífico, interespecífico e intergenérico.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar cruces compatibles en los que intervenga el híbrido *Ch. megalopetalum hr.* variedades Guy y Maya como receptor de polen o planta madre tanto a nivel intraespecífico, interespecífico e intergenérico.
- De haber cruces incompatibles, determinar en éstos a qué nivel se dan las barreras de incompatibilidad en cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos.
- Estudiar la efectividad de técnicas para superar las barreras de incompatibilidad precigóticas, como corte de estilo o tratamiento químico que faciliten la fecundación y la obtención de nuevas variedades de cruces con características deseadas.

3. Área de Estudio

El estudio se realizó en las instalaciones de Esmeralda Breeding & Biotechnology (EB&B), ubicadas en la finca "La Mora", que pertenece a la empresa de Hilsea Investments Ltd., ubicada en San Miguel de Atalpamba a 6 km. de El Quinche en Ecuador.

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

Variedades Guy, Maya, Adi, Erez y Revelation de *Ch. megalopetalum hr.*, variedades Orchid, Della y Early violet de *Ch. uncinatum*, *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* y *Scholtzia cascade*.

4.2 Métodos

4.2.1 Cruces

Se trabajó con las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum* hr. como receptores de polen. Los cruces se realizaron mediante la técnica de polinización manual. Se hicieron cruces a nivel intraespecífico, interespecífico e intergenérico (Anexos 7-9).

Para los cruces intraespecíficos se polinizaron las variedades del híbrido Guy y Maya con: Guy, Maya, Erez, Revelation y Adi del mismo híbrido (Anexo 7). Para los cruces interespecíficos se polinizaron cada una de las variedades Guy y Maya con: Della, Orchid y Early violet, variedades de *Ch. uncinatum* (Anexo 8) y para los cruces intergenéricos se polinizaron Guy y Maya con *Hypochalyma robustum*, *Verticordia plumosa*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade* (Anexo 9).

4.2.2 Estimación de viabilidad de polen de las variedades y especies donadoras mediante acetocarmín

Antes de realizar los cruces se analizó la viabilidad de polen, cantidad de granos de polen capaces de germinar y producir tubos polínicos, de cada una de las variedades que se usaron como donadoras de polen, para lo cual se utilizó la técnica de acetocarmín, que consistió en la tinción de los granos de polen de cada variedad utilizada como donadora con el colorante. Se aplicó una gota del químico y una gota de glicerina sobre un portaobjetos, con un estilete se colocó el polen sobre el acetocarmín y se lo esparció sobre la placa, se cubrió con el cubreobjetos. Transcurridos 5 minutos se observaron las placas al microscopio y se contaron los granos de polen teñidos (viables) y el total de granos (Figuras 1 y 2); se estimó el porcentaje de viabilidad para cada muestra y se sacó un promedio para cada variedad y especie. Se analizaron bajo esta técnica el polen de 10 flores diferentes de cada variedad estudiada.

4.2.3 Emasculación de variedades receptoras de polen

De las variedades Guy y Maya escogidas como receptoras de polen se seleccionaron plantas vigorosas con numerosos botones maduros, se escogieron botones en el primer estadio floral, una vez que la bráctea protectora del botón se observaba seca y de color café y se eliminó las anteras y pétalos de los botones, procedimiento llamado

emasculación, se cubrieron los botones emasculados con fundas de visillo o glacín, se etiquetaron las ramas, con el número de funda, día de emasculación y número de botones emasculados y se anotaron estos datos.

4.2.4 Polinización

Dos semanas después, una vez que las flores emasculadas estuvieron receptivas, en el cuarto estadio floral o estadio femenino se polinizaron 25 flores de Guy y 25 de Maya por cada una de las variedades utilizadas como donadores de polen. Al hacer las polinizaciones con *Ch. megalopetalum* hr. y con *Ch. uncinatum* se escogieron como donadores de polen flores en el estadio masculino y con el estigma impregnado de polen se polinizaron directamente las flores madre de Guy y Maya

Cuando se hicieron los cruces utilizando los géneros *Astartea*, *Hypochalyma*, *Scholtzia* y *Verticordia* como donadores de polen, se polinizaron las flores de Guy y Maya directamente con las anteras de las flores de los géneros mencionados. Se cubrieron y etiquetaron las flores polinizadas con el número de cruce y fecha. Para cada set de polinizaciones se hizo además un control positivo, polinizando *Ch. uncinatum* Della x *Ch. uncinatum* Della, cruce en el que se ha visto un 100% de compatibilidad y además se utilizó un control negativo de una flor emasculada sin polinizar.

4.2.5 Observación de Tubos polínicos mediante tinción con azul de anilina y microscopía de fluorescencia

Tres días después de polinizadas las flores, fueron colectadas y con un bisturí se hizo un corte longitudinal en el cáliz de cada flor dejando el estigma y el estilo completos, se los colocó en un recipiente de vidrio y se marcó los recipientes con el número de cruce, se añadió a los frascos NaOH 1 N hasta cubrir por completo la muestra y se los colocó a baño maría a 59° C, durante 15 a 20 minutos. Se de sechó el NaOH y las muestras fueron lavadas con agua bidestilada tres veces, luego de lo cual fueron sumergidas en azul de anilina y los recipientes que contenían las muestras fueron cubiertos con papel aluminio. 24 horas después las muestras fueron montadas en un portaobjetos y una vez secas se les colocó glicerina, se las cubrió con cubreobjetos y se presionó las placas con el dedo pulgar.

Posteriormente, las placas fueron analizadas en el microscopio de fluorescencia valorando la entrada de tubo polínico tanto por la profundidad a la que llegan los tubos en el estilo como por la intensidad de entrada de tubo polínico (número de tubos polínicos o granos de polen observados). Para evaluar la profundidad de entrada del tubo polínico se utilizó la siguiente valoración: 0 = ausencia total de polen o tubos polínicos, 1= presencia de polen, 2= polen germinando, 3= tubos polínicos entrando hasta la mitad del estilo, 4 = tubo polínico hasta el final del estilo y 5 = Entrada al ovario (Figuras 3-8).

Para evaluar la intensidad de entrada de tubo polínico se utilizó la siguiente valoración: 1 = 1 sólo tubo o grano de polen, 2 = pocos granos de polen o tubos polínicos (2 o 3), 3= considerable cantidad de granos de polen o tubos polínicos (de 4 a 6), 4 = muchos granos de polen o tubos polínicos de (6 a 10), 5 = gran cantidad de granos de polen o tubos polínicos (de 10 en adelante). Este criterio sólo se utilizó como medida del éxito de un cruce, en los casos en los que se vio compatibilidad en cuanto a la profundidad de entrada de tubo polínico a un nivel 4 o 5.

En el caso de los cruces en los que se vio entrada de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo o hasta el ovario se evaluaron tanto el criterio de profundidad de entrada de tubo polínico como el de intensidad de entrada. Dándole una importancia del 75% al primer criterio y una del 25% al segundo.

4.2.6 Métodos para superar las barreras de incompatibilidad precigóticas

Una vez determinados los cruces más compatibles y en dónde se dan las barreras de incompatibilidad se aplicaron dos tratamientos para superarlas. Los tratamientos fueron aplicados en cruces en los que se vio germinación y avance del tubo polínico hasta el primer tercio o hasta la parte media del estilo. Los tratamientos consistieron en la aplicación del químico A* (estimulante fertilizador a base de titanio), en las plantas receptoras de polen y corte de estilo, dependiendo del sitio en el que se dio la barrera de incompatibilidad.

4.2.6.1 Tratamiento químico

Se aplicó concentraciones del 0,5%, 1% y 1.5% del químico A* sobre los botones tiernos de las plantas de Guy que se utilizaron como receptores de polen. Se usó una planta

diferente para cada concentración, la aplicación se hizo semanal durante tres semanas en los mismos botones.

Cuando los botones aplicados llegaron al estadio masculino fueron emasculados, y se colocó una gota de la solución con la concentración correspondiente del químico A* (la misma concentración con la que los botones fueron previamente aplicados) sobre el receptáculo de la flor emasculada. Dos semanas después, una vez que las flores emasculadas estuvieron receptivas y antes de la polinización se colocó nuevamente una gota de la concentración correspondiente del químico sobre el receptáculo y se polinizó con las especies: *Hypochalyma robustum*, *Scholtzia cascade* y *Astartea pink*. Se usó una muestra de 25 individuos para cada cruce y por cada tratamiento. Posteriormente se evaluó la técnica y el porcentaje de éxito.

4.2.6.2 Corte de estilo

En el caso del tratamiento de corte de estilo, dos semanas después de emasculadas las flores de Guy y Maya con las que se hizo el ensayo, se cortó el estilo de las mismas con un bisturí desinfectado en alcohol, 1mm por encima de su unión con el cáliz, y con el estigma cortado de la misma flor se tomó el polen de las especies: *Hypochalyma robustum*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade*, y se polinizaron las flores de Guy y Maya directamente sobre el corte, se cubrió la superficie cortada y polinizada con papel aluminio, se etiquetó la funda con los datos correspondientes. Tres días después se hizo tinción de tubo polínico y se evaluaron los resultados. Para cada cruce se utilizó una muestra de 25 individuos y se hizo un control utilizando corte de estilo en el cruce *Ch. uncinatum* Della x *Ch. uncinatum* Della, cruce en el que se ha visto un 100% de compatibilidad.

4.2.7 Métodos Estadísticos

Para cada cruce el tamaño de la muestra fue $n = 25$. De cada cruce se evaluó profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico y se obtuvo medias, modas y desviaciones estándar. Además para cada cruce se obtuvieron distribuciones de frecuencia en cuanto a niveles de profundidad de entrada de tubo polínico.

Todos los cruces en los que intervino una misma planta madre fueron comparados entre sí en cuanto a la profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico, así se compararon entre sí todos los cruces en los que intervino *Ch. megalopetalum hr. Guy* como planta madre y por otro lado todos los cruces en los que intervino *Ch. megalopetalum hr. Maya* como planta madre.

Se compararon también entre sí los cruces en los que se utilizó un mismo donador de polen, en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico, por ejemplo se comparó *Ch. megalopetalum hr. Guy* x *Astartea pink* versus *Ch. megalopetalum hr. Maya* x *Astartea pink*. Se compararon de igual manera los cruces control versus los tratamientos. Las comparaciones fueron hechas mediante la prueba de Mann Whitney U test.

5. Resultados

5.1 Viabilidad y cantidad de granos de polen, profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico

El test de viabilidad de polen demostró que *Ch. uncinatum* Early violet fue la variedad con mayor viabilidad de polen, seguida por *Astartea pink*, *Ch. uncinatum* Orchid, *Ch. uncinatum* Della, *Scholtzia cascade*, *Hypochalyma robustum* y *Verticordia plumosa*. Encontrándose en último lugar las variedades de *Ch. megalopetalum hr.*: Erez, Guy, Revelation, Adi y Maya (Figura 9). Lo cual estuvo bastante relacionado con los resultados de compatibilidad en los cruces realizados.

El test de viabilidad de polen usando acetocarmín es efectivo en cuanto a la valoración de la capacidad de germinación de polen ya que al hacer una correlación entre porcentaje de viabilidad de polen y el nivel de profundidad de entrada de tubo polínico los datos concordaron mucho siendo directamente proporcional la relación entre los dos factores (Figura 10).

La variedad con mayor cantidad de granos de polen fue *Ch. uncinatum* Early violet, seguida por *Ch. uncinatum* Orchid, *Ch. uncinatum* Della, *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum*, *Ch. megalopetalum hr. Revelation*, *Verticordia plumosa*, *Ch. megalopetalum hr. Adi*, *Ch. megalopetalum hr. Maya*, *Scholtzia cascade*, *Ch. megalopetalum hr. Guy* y *Ch. megalopetalum hr. Erez* (Figura 11). Se observó que la cantidad de granos de polen no

está relacionada con el porcentaje de viabilidad. Una variedad puede tener alto o bajo porcentaje de viabilidad independientemente de la cantidad de granos de polen que tenga (Figura 12).

Se observó también cierta correlación entre la profundidad y la intensidad de entrada de tubo polínico ya que los cruces que tuvieron mayores valores en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico fueron también los que tuvieron mayores valores en cuanto a intensidad (Figura 13). La cantidad de granos de polen estimada mediante la técnica de acetocarmín no está correlacionada con la intensidad de entrada de tubo polínico (Figura 14).

5.2 Evaluación de cruces en general

De acuerdo a los estudios de viabilidad de polen y de compatibilidad mediante el test del tubo polínico se vio que los cruces más compatibles fueron los interespecíficos de las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* con todas las variedades de *Ch. uncinatum*; Orchid, Della y Early violet en los que se observó avance de tubo polínico hasta la parte final del estilo en un 39% de los casos, y hasta el ovario en un 35% (Tabla 1) (Figura 15) y por otro lado los cruces intergenéricos de Guy y Maya con *Verticordia plumosa* en los que se vio avance de tubo polínico hasta la parte final del estilo en un 46% de los casos y hasta el ovario en un 11% (Tabla 2) (Figura 16).

Con el resto de cruces intergenéricos entre las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* y *Astartea pink*, *Scholtzia cascade* e *Hypochalyma robustum* se vio en un 43% de los casos germinación de granos de polen y entrada hasta la parte media del estilo en un 36% de las observaciones (Tabla 2) (Figura 16).

Por último tenemos los cruces intraespecíficos de las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* x Guy, Maya, Adi, Erez y Revelation, variedades del mismo híbrido, cruces en los cuales se vio sólo granos de polen en un 58% de las observaciones y germinación de éstos en un 22% de los casos siendo estos cruces los menos compatibles (Figura 17).

5.3 Cruces intraespecíficos

Los cruces de las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum* hr. x Guy, Maya, Adi, Erez, y Revelation del mismo híbrido fueron incompatibles. En el caso de Guy x Guy y de Guy x Maya en general se encontró en un 49% de los casos tan sólo granos de polen sin germinar y en un 34% de las observaciones no se encontró ni granos de polen (Figuras 18 y 19). Mientras que en el cruce de Guy x Adi se observó en un 81% germinación de granos de polen pero no avance de tubo polínico a través del estilo (Figura 20). En el caso de los cruces de Guy x Erez y de Guy x Revelation aunque un 38% de las observaciones fueron sólo de germinación de granos de polen, se vio en un 16% de los casos entrada de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo y en un 7% hasta el ovario (Figuras 21 y 22).

Al comparar todos los cruces intraespecíficos de Guy como receptora de polen, no se vieron diferencias significativas entre los cruces de Guy x Adi, Guy x Erez y Guy x Revelation, pero en cambio se encontraron diferencias muy significativas entre estos cruces y los cruces de Guy x Guy y de Guy x Maya que al ser comparados no presentaron diferencias entre sí (Anexo 10).

En los cruces intraespecíficos en los que intervino Maya, como planta madre, se encontró en general en un 80% de los casos tan sólo granos de polen sin germinar y en un 9% de las observaciones no se encontró ni granos de polen (Figuras 23-27). Al comparar los cruces en los que intervino Maya entre sí, no se encontraron diferencias significativas (Anexo 11).

5.4 Cruces interespecíficos

En los cruces de *Ch. megalopetalum* hr. Guy x *Ch. uncinatum*, se observó mayor compatibilidad de acuerdo a la profundidad de entrada de tubo polínico, en el siguiente orden con Early violet, Orchid y Della (Tablas 4 y 5) (Figuras 28, 29 y 30). Sin embargo las diferencias no fueron significativas (Anexo 10). Con Maya se observó mayor compatibilidad con Orchid, Della y Early violet (Tablas 4 y 5) (Figuras 31, 32 y 33). Pero al igual que con Guy no hubo diferencias significantes (Anexo 11).

5.5 Cruces intergenéricos

En general las variedades Guy y Maya fueron más compatibles con *Verticordia plumosa*. En particular, en el cruce entre Maya y *V. plumosa* se observó avance de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo y entrada al ovario en el 84% de las observaciones (Figura 34). Mientras que entre Guy y *V. plumosa*, se observó avance del tubo polínico hasta la parte terminal del estilo y entrada al ovario en un 39% de las observaciones y en otro 39% se observó sólo germinación de granos de polen (Figura 35).

En el cruce de las variedades Guy y Maya x *Astartea pink*, se vio avance de tubo polínico hasta la parte media del estilo en un 69% de los casos, mientras que con *Scholtzia cascade* e *Hypochalyma robustum*, se vio germinación de granos de polen en un 49% de las observaciones y en un 28% de los casos crecimiento de tubo polínico hasta la parte media del estilo (Tablas 4 y 5), aunque estas especies tuvieron preliminarmente un alto grado de viabilidad de polen.

En el caso particular de Guy se observó mayor compatibilidad con *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* y *Scholtzia cascade* (Figuras 36-38). Mientras que con Maya se observó mayor compatibilidad con: *Astartea pink*, *Scholtzia cascade* e *Hypochalyma robustum* respectivamente (Figuras 39-41). Pero las diferencias entre estos cruces no fueron significativas (Anexos 10 y 11).

5.6 Comparación de cruces en general

Cuando se compararon entre sí, por categorías, los cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos, se encontraron diferencias significativas entre todos los cruces excepto entre el cruce de *Ch. megalopetalum hr.* x *Ch. uncinatum* y el cruce de *Ch. megalopetalum hr.* x *Verticordia plumosa* (Anexo 12). Cruces en los que hubo compatibilidad a nivel precigótico que no se dio en los otros cruces.

5.7 Cruces en los que se encontró compatibilidad

Para evaluar los cruces en los que se vio compatibilidad (en los que intervinieron *Ch. uncinatum* Orchid, Della, Early violet y *Verticordia plumosa* como donadores de polen o plantas padre) se utilizó otro criterio: la intensidad de entrada de tubo polínico ya que en algunos casos se vio que muchos tubos polínicos llegaban a la parte terminal del estilo o

hasta el ovario y en otros casos en cambio muy pocos o tan sólo uno. Al evaluar tanto la profundidad como la intensidad de entrada de tubo polínico, se encontró que los cruces más compatibles en el caso de Guy se dieron con *Ch. uncinatum* Early violet, Orchid, Della y *Verticordia plumosa* mientras que con Maya los cruces más compatibles se dieron con *Ch. uncinatum* Orchid, Della, *Verticordia plumosa* y *Ch. uncinatum* Early violet (Tabla 7).

5.8 Comparación de cruces entre Guy y Maya en los que intervino un mismo donador de polen

Al comparar los cruces en los que se utilizó Guy con los cruces en los que se utilizó Maya como receptor de polen, en los que intervinieron los mismos donadores de polen se encontró que en la mayoría de casos no hubo diferencias significativas (Anexo 13), lo que indica que en estos casos no importó cual fuese el receptor de polen si Guy o Maya, los cruces en los que intervino un mismo donador de polen fueron igual de compatibles con las dos variedades. Excepto en los cruces en los que se utilizó *Ch. megalopetalum* hr. Adi, *Ch. megalopetalum* hr. Erez y *Scholtzia cascade*, como donadores de polen, ya que en estos casos los datos de profundidad de entrada de tubo polínico sí difirieron significativamente entre los cruces en los que se utilizó Guy y los cruces en los que se utilizó Maya como receptores de polen (Anexo 13), en estos casos la compatibilidad no sólo dependió del donador de polen si no de las variedades receptoras en sí, aunque se tratara de la misma especie.

5.9 Evaluación de las técnicas de aplicación del químico A* y corte de estilo

Los resultados de los tratamientos químico y de corte de estilo en los cruces de Guy y Maya con *Hypochalyma robustum*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade* fueron negativos ya que no incrementaron el crecimiento del tubo polínico ni la receptividad de la planta madre (Tablas 8 y 9) (Figuras 42-47). En el caso del tratamiento de corte de estilo, los granos de polen difícilmente germinaron en el corte. Estos resultados de corte de estilo difirieron en forma significativa con los controles (Anexo 14), además al utilizar el cruce *Ch. uncinatum* Della x *Ch. uncinatum* Della, en el que la compatibilidad es del 100% y aplicar esta técnica tampoco se vieron buenos resultados.

6. Discusión

La compatibilidad en este estudio no dependió exclusivamente de las relaciones fenéticas, sin embargo se puede ver que hay relación, ya que los cruces más compatibles fueron los interespecíficos de *Ch. megalopetalum hr.* x *Ch. uncinatum*, especies entre las que hay un 80,3% de correlación y por otro lado los cruces intergenéricos entre *Ch. megalopetalum hr.* y *Verticordia plumosa*, especies entre las que hay un 68,9% de correlación, en estos cruces no se detectaron barreras precigóticas. Sin embargo los cruces intraespecíficos, entre los que hay un 100% de correlación, fueron incompatibles. El resto de cruces intergenéricos con *Astartea pink*, *Scholtzia cascade* e *Hypochalyma robustum*, con los que al igual que con *V. plumosa* hay un 68,9% de correlación resultaron ser menos compatibles ya que sólo hubo germinación y avance de tubo polínico hasta la parte media del estilo (Tabla 4).

En este estudio la compatibilidad no dependió completamente de las relaciones fenéticas a diferencia de otros estudios como en el análisis de la capacidad de cruzamiento en el Birdsfoot trefoil *Lotus corniculatus*, en el que sí se encontró relación entre el parentesco genético y la compatibilidad entre especies (García de los Santos G. *et al*, 2001).

En base a estos resultados podemos ver que aunque un estudio de relaciones fenéticas entre las variedades que van a ser utilizadas para los cruces, nos ayuda a determinar las distancias entre éstas, no es concluyente para determinar que variedades o especies serán más, o menos compatibles ya que al parecer la compatibilidad en este caso estuvo más relacionada con la viabilidad de polen de las especies donadoras ya que los cruces más exitosos se dieron con los padres que tuvieron mayor viabilidad de polen. Lo cual no era esperado ya que en la mayor parte de estudios de este tipo, la compatibilidad está directamente relacionada con las distancias fenéticas, conforme los cruces se dan entre variedades o especies más distantes el éxito en obtener un híbrido decrece (Yan, 2001).

En los cruces intraespecíficos se detectaron barreras precigóticas relacionadas con falta de germinación de tubo polínico. Muy probablemente el hecho de que estos cruces sean incompatibles se deba a que las variedades con las que se trabajó, no son puras sino híbridos entre *Ch. megalopetalum* y *Ch. uncinatum*, y su polen es poco viable en relación al polen de variedades puras (Figura 42). La baja viabilidad de polen en estos

híbridos se puede deber a problemas relacionados con falta de apareamiento en los cromosomas homólogos durante la meiosis, lo cual se ha visto en otros estudios en los que se a estudiado viabilidad de polen en híbridos (Tyagi, 2002).

Otra razón por la que los cruces intraespecíficos fueron incompatibles se pudo deber a la autoincompatibilidad que impide la autopolinización y fecundación y que está controlada por los genes S que se expresan en los estigmas y en los granos de polen y que al detectar el mismo tipo de alelos en estos sitios impiden el desarrollo de los tubos polínicos (Borojevie 1990). Esta puede ser la causa de la incompatibilidad de los cruces intraespecíficos en este estudio ya que todas las plantas de una especie que intervinieron en los cruces tenían la misma constitución genética al haber sido propagadas vegetativamente y al no haber variabilidad genética se pudo dar el fenómeno de autoincompatibilidad.

En el único cruce intraespecífico en el que se observó cierto grado de compatibilidad fue en el cruce entre Guy y Revelation, en el que hubo avance de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo y hasta el ovario en un 39% de los casos. Aunque éste no sea un porcentaje tan alto como el obtenido en los cruces interespecíficos, en los que se encontró avance del tubo polínico hasta la parte terminal del estilo y hasta el ovario en un 74% de los casos, se podría intentar seguir con la investigación de este cruce con el fin de conseguir las semillas del mismo, que podrían resultar en una variedad interesante.

En general los cruces interespecíficos evidenciaron un patrón de alto grado de compatibilidad a nivel precigótico por lo que se puede seguir trabajando con otras variedades interesantes de *Ch. uncinatum* esperando tener muy buenos resultados, como con Ofir, la cual tiene un color completamente blanco que es lo que se quiere introducir como característica en las variedades de *Ch. megalopetalum hr.*

En los cruces intergenéricos con *Astartea pink*, *Hypochalyma robustum* y *Scholtzia cascade* se observó que hay barreras de incompatibilidad precigóticas relacionadas con falta de crecimiento de tubo polínico a través del estilo. En estos cruces, el hecho de que el tubo polínico sólo germine hasta la parte media del estilo, tal vez se deba a que en todas estas especies la flor es mucho más pequeña y el estilo más corto por lo que muy probablemente el tubo polínico ha evolucionado para crecer tan sólo hasta esta distancia (Yan 2001).

Al comparar los cruces en los que intervino Guy con los cruces en los que intervino Maya como receptores de polen, en los cuales se utilizó la misma variedad o especie como donadora de polen, se encontraron diferencias significativas entre Guy x Adi y Maya x Adi, entre Guy x Erez y Maya x Erez y entre Guy x *Scholtzia cascade* y Maya x *Scholtzia cascade*, en estos cruces la compatibilidad no sólo dependió del donador de polen si no de las variedades receptoras en sí. Lo que nos indica que aunque las plantas receptoras de polen sean variedades de una misma especie no siempre se puede extrapolar los datos ya que muchas veces no sólo depende de las características de los donadores de polen si no del cruce en particular y de la planta receptora, sin embargo para la mayoría de los casos se podría utilizar sólo a una variedad o dos variedades como modelo para hacer los cruces esperando tener resultados similares con el resto de variedades de la misma especie.

De acuerdo a los resultados se puede ver que no siempre un alto porcentaje de viabilidad de polen conlleva un cruce exitoso. Esto se vio en los cruces intergenéricos con *Hypochalyma robustum*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade*, especies en las que a pesar de tener polen viable (Figura 33) y de que en efecto éste germinó no se consiguió la entrada del tubo polínico hasta el ovario. Estos resultados se han encontrado en otros estudios como en el caso del Birdsfoot trefoil *Lotus corniculatus* en el que al igual que con *Astartea*, *Hypochalyma* y *Scholtzia*, la planta donadora de polen a pesar de tener alta viabilidad no fecundó las flores de *Lotus c.* y no produjo semillas (García de los Santos G. *et. al.*, 2001).

El hecho de que al correlacionar la cantidad de granos de polen estimados mediante la técnica de acetocarmín y la intensidad de entrada de tubo polínico no se haya observado una relación clara se puede deber a que la técnica de estimación de viabilidad de polen mediante acetocarmín no es 100% exacta, como se ha visto ya en otros estudios, ya que a veces, si no se tiene cuidado se pueden contar como granos de polen otras partículas que se encuentren en la placa y que se observen como tales. Además cuando se cuentan granos de polen mediante esta técnica se toma en cuenta granos viables y no viables mientras que en el test de tubo polínico cuando se ve germinación y entrada de tubo polínico se toma en cuenta sólo los granos viables. (González *et al.*, 1999).

Si bien es cierto el test de viabilidad de polen mediante acetocarmín no es 100% exacto, el error que tiene es mínimo y es la técnica más práctica y adecuada para los

fines del programa de cruces del laboratorio ya que para utilizar otras técnicas como germinación de polen *in vitro* se necesita de más tiempo, que no se tiene disponible cuando se trabaja con gran cantidad de variedades y cultivos. Además la técnica de acetocarmín ha sido ampliamente utilizada en otros laboratorios de éste tipo y ha resultado ser muy efectiva para evaluar la viabilidad de donadores de polen que se utilizan posteriormente en el programa de cruces (Comm. pers., Ana María Quiñones). Sin embargo se debería utilizar el test de germinación de polen *in vitro* como confirmatorio de la técnica de acetocarmín cuando se tenga alguna duda.

Es importante que siempre, antes de llevar a cabo los cruces se haga una valoración de la viabilidad de polen de los donadores ya que si bien es cierto la técnica no es concluyente, puede ser una guía para determinar los mejores donadores de polen para los cruces de manera que se puedan llevar a cabo con mayor facilidad. También se debe tomar en cuenta que a pesar de que una especie tenga poca cantidad de polen y un bajo porcentaje de viabilidad no debe ser descartada del todo del programa de mejoramiento como donadora ya que si por un lado pocos granos de polen están en capacidad de germinar, estos granos pueden producir tubos polínicos que fecunden las especies receptoras.

El tratamiento de corte de estilo, no resultó efectivo, ya que a pesar de que se observó germinación de polen sobre el corte, los tubos polínicos no se desarrollaron a través del estilo para llegar al ovario. Probablemente esto se deba a que en el estigma se hallan sustancias como la (*SLR1*) molécula receptora de la S locus glycoproteína, presente en el polen, que con otras sustancias interaccionan con moléculas presentes en la cubierta extracelular (exina) del polen, desencadenando posteriormente una serie de reacciones de tipo lipofílicas que incentivan el crecimiento del tubo polínico a través del estilo. Al colocar el polen directamente sobre el corte no se cuenta con una cantidad suficiente de sustancias como la *SLR1* lo que pudo influir en la falta de desarrollo de tubos polínicos en el corte (Luu *et al*, 1999) (Zinkl *et al*, 1999).

Se puede hacer ensayos de la técnica de corte de estilo, haciendo además trasplante de estigma sobre el corte para que los granos de polen cuenten con las sustancias necesarias como la *SLR 1* que les ayuden a germinar a través del estilo. Este tratamiento inclusive se puede mejorar llevándolo a cabo *in vitro* en donde se puede contar con todas las condiciones necesarias que ayuden al desarrollo de los tubos polínicos y la fecundación (Yan 2001).

El hecho de que el tratamiento químico utilizado en este estudio no fue efectivo, no significa que el tratamiento no funcione en sí, si no que puede ser que la técnica no esté bien estandarizada y que se necesiten otras concentraciones u otra forma de aplicación sobre las plantas madres o inclusive sobre los donadores de polen, por lo que no se debería descartar seguir haciendo ensayos con este químico que ha dado buenos resultados en otras investigaciones como en la estimulación de la fertilización en el pepino y el tomate (Dyki, *et al* 2000).

Otro tratamiento que puede resultar efectivo para superar las barreras precigóticas en los cruces intergenéricos es el uso del polen mentor que consiste en matar el polen de la planta receptora o madre y mezclarlo con el polen con el que se quiere hacer el cruce. Mediante esta técnica se espera que algunas sustancias en el polen muerto de la planta receptora ayuden al polen de la planta con la que se quiere llevar a cabo el cruce de manera que pueda germinar y crecer más rápido (Yan, 2001).

En este estudio además de utilizar, profundidad de entrada de tubo polínico, se utilizó también intensidad de entrada del mismo, como criterio para evaluar los cruces en los que se vio entrada de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo o hasta el ovario. Sin embargo en otros estudios en los que se evalúa compatibilidad entre cruces, este criterio no es muy utilizado ya que no es práctico ni útil en los casos en los que el tubo polínico no llega al ovario, por lo que se utiliza el mismo criterio de profundidad de entrada de tubo polínico pero con una calificación superior para los cruces en los que se ve varios tubos polínicos en el ovario y una inferior para los cruces en los que se ve tan sólo uno o dos tubos polínicos en él (Yan 2001).

Al estar, este proyecto enfocado no sólo al mejoramiento de las variedades de *Chamelaucium megalopetalum* hr. si no también al estudio de la compatibilidad real de cada uno de los cruces, a la efectividad de los tratamientos y a ver si las diferencias observadas fueron realmente significantes, se hizo un análisis estadístico minucioso de los niveles de profundidad y de intensidad de entrada de tubo polínico, utilizando medias, modas, desviaciones Standard, distribuciones de frecuencia y comparaciones entre las medias de los cruces mediante la prueba de Mann Withney U test. Sin embargo se ha visto en otros estudios de este tipo que los criterios más utilizados para el análisis de compatibilidad es la mayor profundidad a la que llegan los tubos polínicos en un determinado cruce y con qué frecuencia se da este evento, además se utiliza con más

frecuencia modas en lugar de medias y desviaciones estándar (Van Creij, *et. al.* 1997) (Yan 2001).

De acuerdo a los resultados de los cruces realizados, se puede concluir que tanto en los cruces interespecíficos entre *Ch. megalopetalum hr.* x *Ch. uncinatum* como en los cruces intergenéricos entre *Ch. megalopetalum hr.* y *Verticordia plumosa* no existe ningún tipo de barrera precigótica, como falta de germinación de los granos de polen, o poco crecimiento del tubo polínico. Resultados similares fueron encontrados en estudios de hibridación hechos en Australia entre los géneros *Chamelaucium* y *Verticordia* en los que al igual que en este estudio se tuvo éxito de compatibilidad en el cruce (Gowns *et al.*, 2000).

Los resultados obtenidos en el cruce intergenérico entre *Ch. megalopetalum hr.* y *Verticordia plumosa* son prometedores ya que *Verticordia* tiene características, como abundante cantidad de pétalos y una estructura uniforme con respecto a la distribución de las inflorescencias y sin tantas hojas que son características que se quieren introducir en *Ch. megalopetalum hr.*

Por otro lado los cruces interespecíficos con *Ch. uncinatum* tanto con Orchid, Della y Early violet también son bastante alentadores ya que si bien es cierto la estructura y el tipo de flor es muy parecida a las de las variedades de *Ch. megalopetalum hr.*, los obtentores de nuevas variedades en wax flower están buscando cualquier tipo de variedad nueva, diferente no sólo físicamente si no también en cuanto a aspectos fisiológicos como períodos y tiempos de floración. En especial el cruce interespecífico con Early violet es bastante promisorio debido al intenso color lila de sus pétalos y al contraste de color entre el receptáculo y la corola (Gowns *et. al* 2000).

7. Conclusiones

Los cruces compatibles a nivel precigótico identificados fueron los cruces interespecíficos de las dos variedades, Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* x las tres variedades de *Ch. uncinatum*, Orchid, Della y Early violet y por otro lado los cruces intergenéricos entre las dos variedades, Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* y *Verticordia plumosa*.

En los cruces intergenéricos de las dos variedades, Guy y Maya de *Ch. megalopetalum* hr. e *Hypochalyma robustum*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade* se vieron barreras de incompatibilidad a nivel precigótico relacionadas con falta de crecimiento de tubo polínico a través del estilo.

En los cruces intraespecíficos de las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum* hr. tanto con Guy, Maya como con el resto de variedades del híbrido: Adi, Erez y Revelation se vieron barreras de incompatibilidad a nivel precigótico relacionadas con poca cantidad y falta de germinación de granos de polen en el estigma.

La técnica de aplicación del químico A* en los cruces de las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum* hr. x *Hypochalyma robustum*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade* no resultó efectiva, no mejoró ni la profundidad ni la intensidad de entrada de tubo polínico, con respecto a los controles. La técnica de corte de estilo tampoco resultó efectiva ya que no influyó en el crecimiento del tubo polínico de estos cruces con respecto a los controles y por el contrario afectó la germinación de granos de polen y entrada de tubo polínico de manera negativa.

Con el objetivo de tener cruces exitosos es importante trabajar con una gran muestra, ya que en algunos casos el porcentaje de tener un cruce compatible puede ser bajo; pero si se trabaja con muestras grandes, no importa si muy pocos son los cruces exitosos, a partir de ello se tiene el material genético necesario que posteriormente puede ser propagado.

8. Recomendaciones

En base a los buenos resultados obtenidos en los cruces de *Ch. megalopetalum* hr. con *Ch. uncinatum* y con *Verticordia plumosa* se debería seguir trabajando con estos cruces enfocándose en la obtención de semillas in vivo, las mismas que son colectadas tres a seis semanas después de la polinización y en caso de no obtener semillas in vivo o de que no germinen, se debería intentar hacer rescate de embriones con el fin de que si hubiera algún tipo de barrera postcigótica, ésta pueda ser superada mediante el rescate de embriones (Yan 2001).

Si se quiere tener buenos resultados en cuanto a hibridación con el grupo *Ch. megalopetalum* es importante trabajar con las variedades puras ya que muy

probablemente los malos resultados, sobretodo a nivel intraespecífico, se deban a que se está trabajando con un híbrido que tiene muy baja viabilidad de polen.

En los cruces intergenéricos entre *Ch. megalopetalum* hr. e *Hypochalyma robustum*, *Scholtzia cascade* y *Astartea pink*, en los que se vio germinación de tubo polínico hasta el primer tercio o hasta la parte media del estilo, se debe seguir intentando superar las barreras de incompatibilidad encontradas utilizando otras técnicas como aplicación de hormonas en diferentes concentraciones, como ácido giberélico, Auxinas (IAA, IBA, etc.) o BAP, que han sido muy utilizadas para mejorar la fertilidad ya que mejoran la viabilidad de polen y receptividad de la planta madre (Yan, 2001).

Con respecto al tratamiento con el químico A*, se recomienda tratar con otras concentraciones u otra forma de aplicación sobre las plantas madres o inclusive sobre los donadores de polen.

Literatura Citada

- L. Watts 1984. Flower and Vegetable Plant Breeding. Grower Books. London, England
- S. Borojevie 1990. Principles and Methods of plant breeding. Library of Congress Cataloging in Publication Data. USA.
- S. Beardsell 1991. Secondary Pollen Presentation in the Chamelaucium Alliance of Myrthaceae: A compact Substigmatic Ring in *Chamelaucium*. Department of Agriculture, Institute of Plant Sciences. Knoxfield, Australia.
- M.G.M. Van Creijl, D.M.F.J. Kerckhoffs and J. M. Van Tuyl 1997. Interspecific hybridation in the genus Tulipa L: Identification of pre-fertilization barriers. Thesis Wageningen, CIP-Data Koninklijke Bibliotheek, Den Haag.
- J. A. Considine 1999. Wax Flower for Floriculture. Facultad de Agricultura. Universidad del este de Australia y Mark Webb.
- M. E González., A Estévez., J.Castillo y O. Moré 1999. Métodos para la evaluación de la calidad de polen en papa (*Solanum tuberosum* L.) Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Volumen 20.
- D-T. Luu, D. Marty-Mazars, M. Trick, C. Dummas and P. Hezemann 1999. Pollen-Stigma adhesion in *Brassica* spp involves SLG and SLR1 Glycoproteins. Plant Cell Vol. 11. American Society of Plant Physiologists.
- G. M. Zinkl, B. I. Zwiebel, D. G. Grier and D. Preuss 1999. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. Department of Molecular Genetics and Cell Biology, Department of Physics, The James Franck Institute and The Institute for Biophysical Dynamics, The University of Chicago.
- D. Gowns, C. Newell, J. Considine y G. Yan 2000. Wax Flower Selection, breeding and Development-An Overview. Department of Agriculture, Institute of Plant Sciences. Knoxfield, Australia.

B. Dyki, J. Borkowski, E.Lakowska-Ryk, R. W. Doruchowski, Panek. 2000. Influence of the Tytanit compound on fertilization and stimulation of seed development in cucumber and tomato. Mendel Centenary Congress. March 7-10, 2000, Brno, Czech Republic. Poster Abstracts:115.

G. García de los Santos, J.J. Steiner and P.R. Beuselinck 2001. Adaptive Ecology of *Lotus corniculatus* L. Genotypes. Crop Science 41.

G. Yan 2001. The Breeding Biology of Wax Flowers. Rural Industries Research and Development Corporation. Australia.

A. Tyagi 2002. Chromosomal Pairing and Pollen Viability in *Rhizophora mangle* and *Rhizophora stylosa* Hybrids. Department of Biology, University of South Pacific, Suva, Fiji.

A.Vainstein 2002. Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches. Kluwer Academic Publishers. Holanda.

Esmeralda Breeding & Biotechnology, 2004. Manual de procedimientos específicos 2004, Wax Flower.

Referencias de internet:

NIR Wax Flower.

<http://www.yellowpages.co.il/homepages/English/005903230000000000/daf1.html> 27 de Mayo del 2003.

Comunicaciones personales:

Barahona Eduardo. Mayo del 2003. Esmeralda Breeding and Biotechnology. eduardob@hilsea.com.ec

Quiñones Ana María. Mayo del 2003. Esmeralda Breeding and Biotechnology. anamq@hilsea.com.ec

Tablas

Tabla 1. Moda, Media y Desviaciones Standard de profundidad e intensidad de entrada de Tubo polínico para el total de cruces intra específicos: *Chamelaucium megalopetalum hr. x Chamelaucium megalopetalum hr.*, interespecíficos, *Chamelaucium megalopetalum hr. x Chamelaucium uncinatum* e intergenéricos. *Chamelaucium megalopetalum hr. x Hypochalyma robustum*, *Verticordia plumosa*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade*

Tipo de de Cruce	Intraespecifico	Interespecifico	Intergenérico
Especies	<i>Chamelaucium m.hr.x Chamelaucium m. hr.</i>	<i>Chamelaucium m. hr. x Chamelaucium u.</i>	<i>Chamelaucium m hr. x Hypochalyma r., Verticordia, Astartea p. y Scholtzia c.</i>
Media (SD) de Profundidad	1,35 (\pm 0,92)	3,82 (\pm 1,31)	2,60 (\pm 0,95)
Moda de Profundidad	1	4	2
Media (SD) de Intensidad	1,86 (\pm 1,02)	2,94 (\pm 1,28)	2,06 (\pm 1,01)
Moda de Intensidad	1	3	1

Tabla 2. Moda, Media y Desviaciones Standard para profundidad e intensidad de entrada de Tubo polínico para los cruces intergenéricos, específicamente para: *Chamelaucium megalopetalum hr. x Hypocalyma robustum*, *Verticordia plumosa*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade*, n= 25 para cada cruce.

Especies	<i>Chamelaucium m hr. x Hypochalyma r.</i>	<i>Chamelaucium m. hr. x Verticordia p.</i>	<i>Chamelaucium m.hr. x Astartea p.</i>	<i>Chamelaucium m.hr. x Scholtzia c.</i>
Media (SD) de Profundidad	2,04 (\pm 0,75)	3,43 (\pm 1,02)	2,79 (\pm 0,59)	2,19 (\pm 0,70)
Moda de Profundidad	2	4	3	2
Media (SD) de Intensidad	1,83 (\pm 1,08)	2,06 (\pm 0,99)	1,96 (\pm 0,95)	2,28 (\pm 1,00)
Moda de Intensidad	1	1	1	3

Tabla 3. Medias y desviaciones standar para la valoración de profundidad de entrada de tubo polínico en cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos utilizando las variedades de *Chamelaucium megalopetalum hr.* como receptoras de polen. Valoración de la entrada: 0= Ausencia de granos de polen y tubos polínicos, 1 = Presencia de granos de polen, 2 = Granos de polen germinando, 3 = Tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 4 = Tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = Tubos polínicos en el ovario, n = 25.

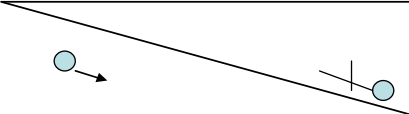
	Medias y Desviaciones estándar ()		
	<i>Ch.megalopetalum hr. Guy</i>	<i>Ch.megalopetalum hr. Maya</i>	<i>Ch.megalopetalum hr. Erez</i>
<i>Ch. megalopetalum hr. Guy</i>	0.85 (± 0,69)	1,08 (± 0,94)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Maya</i>	0.80 (± 0,70)	1,18 (± 0,41)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Adi</i>	1.94 (± 0,61)	1,19 (± 0,62)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Erez</i>	2.31 (± 1,24)	1,24 (± 0,32)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Revelation</i>	2.29 (± 1,23)	1,38 (± 0,33)	
<i>Ch uncinatum Della</i>	3.10 (± 1,49)	3.67 (± 1,43)	3,93 (± 1,10)
<i>Ch. uncinatum Orchid</i>	3.80 (± 1,53)	4.19 (± 0,91)	4,33 (± 1,08)
<i>Ch. uncinatum Early violet</i>	4.09 (± 0,64)	3,46 (± 1,78)	
<i>Verticordia plumosa</i>	3.08 (± 1,11)	3.94 (± 0,62)	
<i>Astartea pink</i>	2.52 (± 0,74)	3,04 (± 0,19)	
<i>Hypochalyma robustum</i>	2.02 (± 0,60)	2,07 (± 0,90)	
<i>Scholtzia cascade</i>	1.90 (± 0,54)	2,78 (± 0,63)	

Tabla 4. Moda para la valoración de profundidad de entrada de tubo polínico en cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos utilizando las variedades de *Chamelaucium megalopetalum hr.* como receptoras de polen. Valoración de la entrada: 0= Ausencia de granos de polen y tubos polínicos, 1 = Presencia de granos de polen, 2 = Granos de polen germinando, 3 = Tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 4 = Tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = Tubos polínicos en el ovario, n = 25

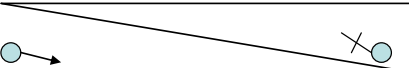
	<i>Ch.megalopetalum hr. Guy</i>	<i>Ch.megalopetalum hr. Maya</i>	<i>Ch.megalopetalum hr. Erez</i>
<i>Ch. megalopetalum hr. Guy</i>	1	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Maya</i>	1	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Adi</i>	2	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Erez</i>	2	1	
<i>Ch. Megalopetalum hr. Revelation</i>	2	1.5	
<i>Ch uncinatum Della</i>	4	5	
<i>Ch. uncinatum Orchid</i>	5	4	
<i>Ch. uncinatum Early violet</i>	4	5	4
<i>Verticordia Plumosa</i>	2	4	5
<i>Astartea Pink</i>	2	3	
<i>Hypochalyma Robustum</i>	2	3	
<i>Scholtzia cascade</i>	2	3	

Tabla 5. Medias y Desviaciones Standard de intensidad de entrada de tubo polínico, utilizando las variedades de *Chamelaucium megalopetalum hr.* como receptoras de polen. 1= un solo tubo polínico, 2= de dos a tres T.P. o G. P., 3= de cuatro a seis, 4= des siete a 10, 5 = más de 10. En azul las valoraciones para los cruces con profundidad de entrada de Tubo polínico hasta la parte terminal del estilo o hasta el ovario, n=25

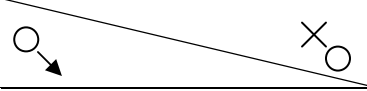
	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Guy	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Maya	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Erez
<i>Ch. megalopetalum hr. Guy</i>	2,10 (± 0,68)	1,33 (±1,10)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Maya</i>	1,38 (± 0,89)	1,50 (±0,64)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Adi</i>	2,15 (± 0,95)	1,52 (±0,79)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Erez</i>	2,71 (±1,10)	1,22 (± 0,51)	
<i>Ch. megalopetalum hr. Revelation</i>	2,25 (±1,29)	1,69 (±1,19)	
<i>Ch. uncinatum Della</i>	2,36 (±1,10)	2,92 (±1,02)	3,25 (±1,22)
<i>Ch. uncinatum Orchid</i>	1,83 (±0,99)	3,15 (±1,06)	3,15 (±1,62)
<i>Ch. uncinatum Early violet</i>	3,21 (±0,74)	2,52 (±1,66)	
<i>Verticordia plumosa</i>	2,19 (±0,98)	1,88 (±0,99)	
<i>Astartea pink</i>	2,08 (±0,97)	1,86 (±0,93)	
<i>Hypochalyma robustum</i>	2,19 (±1,27)	1,50 (±0,75)	
<i>Scholtzia cascade</i>	2,20 (±1,06)	2,44 (±0,87)	

Tabla 6. Modas de intensidad de entrada de tubo polínico, utilizando las variedades de *Chamelaucium megalopetalum hr.* como receptoras de polen. 1= un solo tubo polínico, 2= de dos a tres T.P. o G. P., 3= de cuatro a seis, 4= des siete a 10, 5 = más de 10. En azul las valoraciones para los cruces con profundidad de entrada de Tubo polínico hasta la parte terminal del estilo o hasta el ovario, n=25

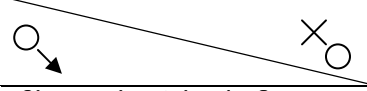
	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Guy	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Maya	<i>Ch. megalopetalum hr.</i> Erez
<i>Ch. megalopetalum hr. Guy</i>	2	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Maya</i>	1	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Adi</i>	3	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Erez</i>	3	1	
<i>Ch. megalopetalum hr. Revelation</i>	1	1	
<i>Ch. uncinatum Della</i>	1	3	4
<i>Ch. uncinatum Orchid</i>	4	4	1
<i>Ch. uncinatum Early violet</i>	3	4	
<i>Verticordia plumosa</i>	3	1	
<i>Astartea pink</i>	1	1	
<i>Hypochalyma robustum</i>	1	1	
<i>Scholtzia cascade</i>	1	3	

Tabla 7. Tabla de Evaluación de la profundidad y de la intensidad de entrada de tubo polínico para los cruces en los que se vio entrada de tubo polínico hasta la parte terminal del estilo o hasta el ovario.

Cruce	Valoración de la Profundidad de entrada de Tubo polínico al 75%	Valoración de la Intensidad de entrada de Tubo polínico al 25%	Valoración total del cruce al 100%
Guy x Early violet	61,35	10,05	77,4
Guy x Orchid	57	9,15	66,15
Guy x Della	46,5	11,8	58,3
Guy x <i>Verticordia plumosa</i>	46,2	10,95	57,15
Maya x Orchid	62,85	15,75	78,6
Maya x Della	55,05	14,6	69,65
Maya x <i>Verticordia plumosa</i>	59,1	9,4	68,5
Maya x Early violet	51	12,6	63,6

Tabla 8. Medias para la profundidad de entrada de tubo polínico en controles y tratamientos con 0,5%, 1%, 1,5% de químico A* y corte de Estilo, en cruces en los que se encontró compatibilidad igual o mayor a 2. 0 = Ausencia de granos de polen y tubos polínicos, 1 = presencia de granos de polen, 2 = granos de polen germinando, 3= Tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 4= Tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5= tubos polínicos en el ovario. Los espacios en blanco representan tratamientos que no se llevaron a cabo, n= 25 para cada uno de los cruces y tratamientos.


	Guy	Maya
<i>Hypocalyma robustum</i>	2,02 (±0,60)	2,07 (±0,90)
<i>Hypocalyma robustum</i> 0.5% químico A*	2,33 (±0,55)	
<i>Hypocalyma robustum</i> 1% químico A*	2,58 (±0,58)	
<i>Hypocalyma robustum</i> 1,5 % químico A*	2,18 (±0,39)	
<i>Hypocalyma robustum</i> , Corte de estilo	0,38 (±0,75)	1,50 (±0,60)
<i>Astartea pink</i>	2,52 (±0,74)	3,04 (±0,19)
<i>Astartea pink</i> 0.5% químico A*	2,11 (±0,47)	
<i>Astartea pink</i> 1,5% químico A*	2,55 (±0,55)	
<i>Astartea pink</i> , Corte de estilo	1,26 (±0,95)	1,60 (±0,80)
<i>Scholtzia cascade</i>	1,90 (±0,54)	2,78 (±0,63)
<i>Scholtzia cascade</i> 0.5% químico A*	2,30 (±0,52)	
<i>Scholtzia cascade</i> 1,5% químico A*	2,46 (±0,80)	
<i>Scholtzia cascade</i> , Corte de estilo	1,90 (±0,72)	1,44 (±0,70)

Tabla 9. Modas para la profundidad de entrada de tubo polínico en controles y tratamientos con 0,5%, 1%, 1,5% del químico A* y corte de Estilo, en cruces en los que se encontró compatibilidad igual o mayor a 2. 0 = Ausencia de granos de polen y tubos polínicos, 1 = presencia de granos de polen, 2 = granos de polen germinando, 3= Tubos polínicos hasta la mitad del estilo, 4= Tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5= tubos polínicos en el ovario. Los espacios en blanco representan tratamientos que no se llevaron a cabo, n= 25 para cada uno de los cruces y tratamientos.

	Guy	Maya
<i>Hipocalyma robustum</i>	2	3
<i>Hypocalyma robustum</i> 0.5% químico A*	2	
<i>Hypocalyma robustum</i> 1% químico A*	3	
<i>Hypocalyma robustum</i> 1,5 % químico A*	2	
<i>Hypocalyma robustum</i> , Corte de estilo	0	2
<i>Astartea pink</i>	2	3
<i>Astartea pink</i> 0.5% químico A*	2	
<i>Astartea pink</i> 1,5% químico A*	3	
<i>Astartea pink</i> , Corte de estilo	2	2
<i>Scholtzia cascade</i>	2	3
<i>Scholtzia cascade</i> 0.5% químico A*	2	
<i>Scholtzia cascade</i> 1,5% químico A*	3	
<i>Scholtzia cacade</i> , Corte de estilo	2	2

Figuras

Figura 1. Observación de granos de polen viables de *Chamelaucium uncinatum* mediante la técnica de acetocarmín, granos viables se observan teñidos de rojo.

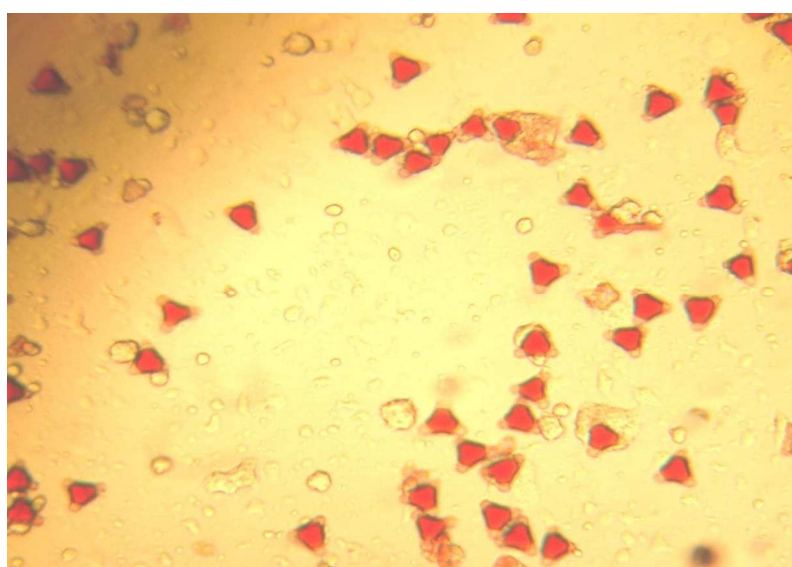


Figura 2. Observación de granos de polen no viables de *Chamelaucium megalopetalum* *hr.* mediante técnica de acetocarmín, granos no viables no se observan teñidos.

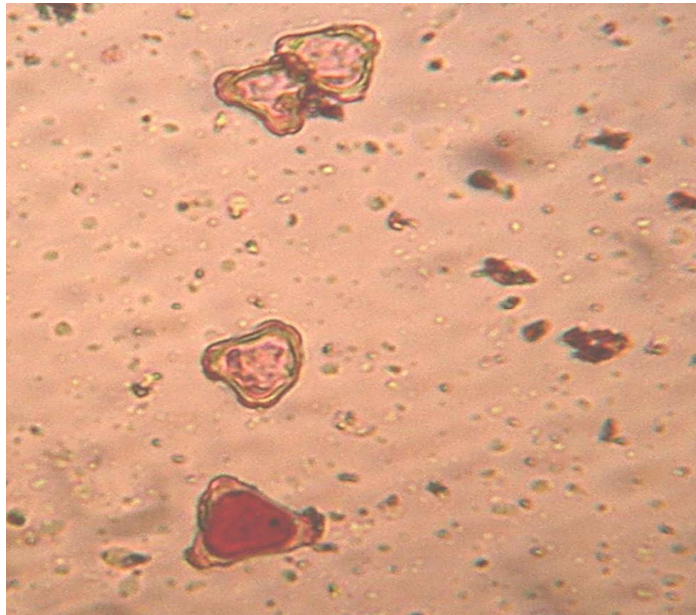


Figura 3. Observación de estigma sin granos de polen, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum* *hr.* Guy x *Ch. megalopetalum* *hr.* Guy valoración del cruce = 0 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico.

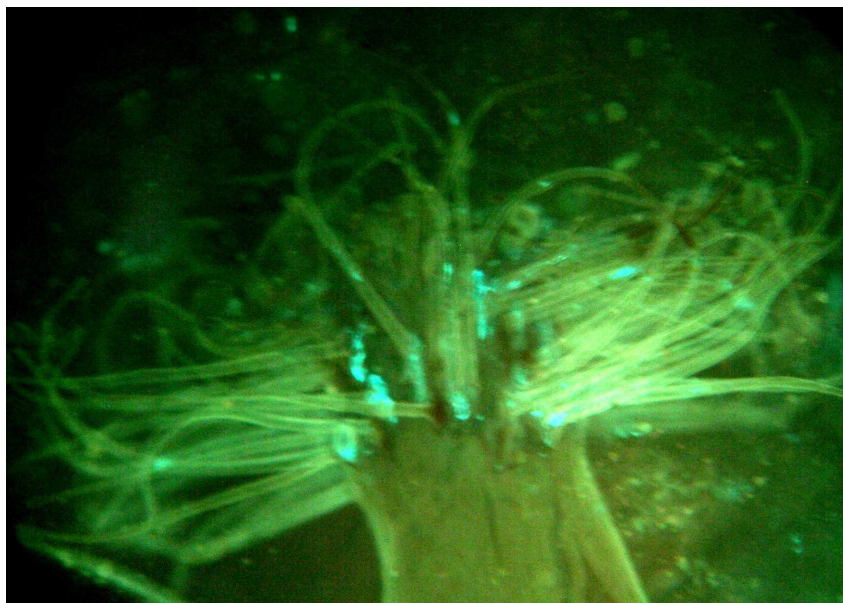


Figura 4. Observación de granos de polen sin germinar, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum* hr. Maya x *Ch. megalopetalum* hr. Maya valoración del cruce = 1 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico

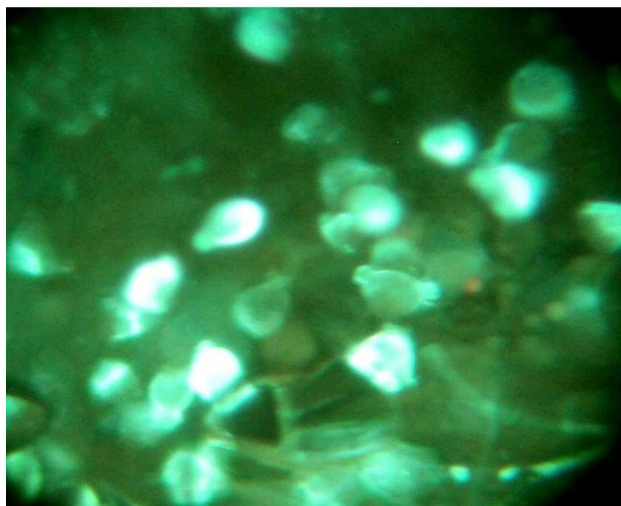


Figura 5. Observación de granos de polen germinando, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum* hr. Guy x *Hypochalyma robustum* valoración del cruce = 2 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico.



Figura 6. Observación de granos de polen germinando, hasta el primer tercio del estilo, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum hr. Maya* x *Astartea pink*, valoración del cruce = 3 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico.

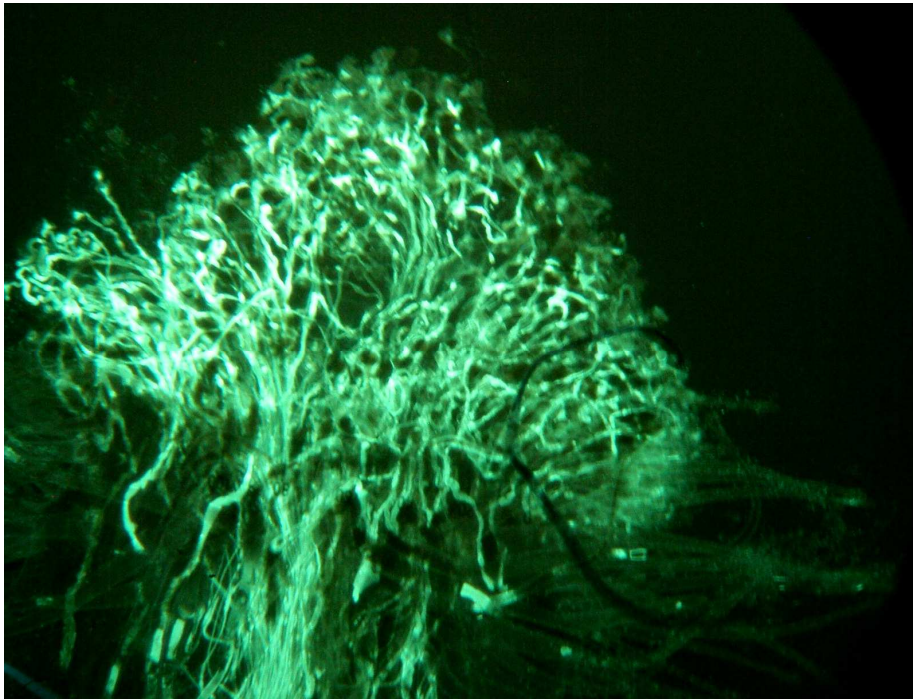


Figura 7. Observación de crecimiento de tubo polínico, hasta la parte terminal del estilo, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum hr. Maya* x *Veritcordia plumosa*, valoración del cruce = 4 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico.

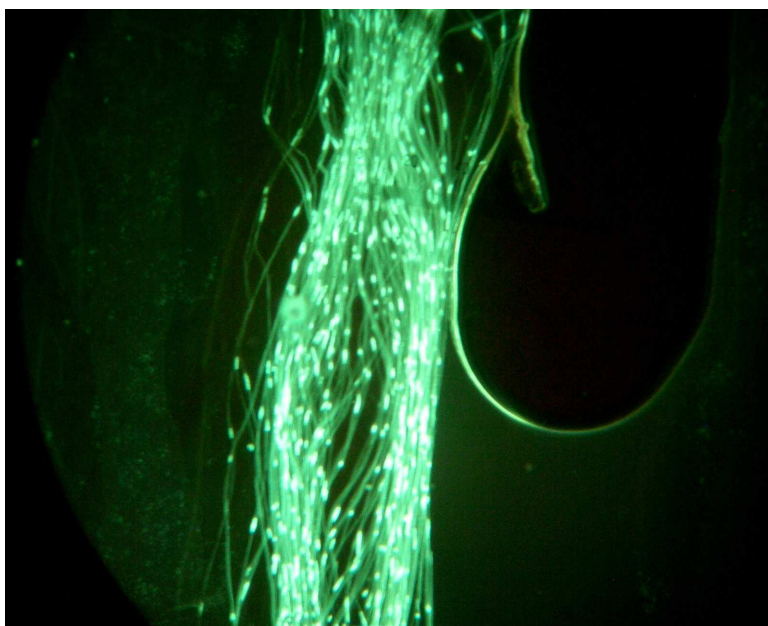


Figura 8. Observación de crecimiento de tubo polínico, hasta el ovario, mediante microscopía de fluorescencia, en el cruce *Ch. megalopetalum* hr. Guy x *Ch. uncinatum* Orchid, valoración de un cruce = 5 en cuanto a profundidad de entrada de tubo polínico.

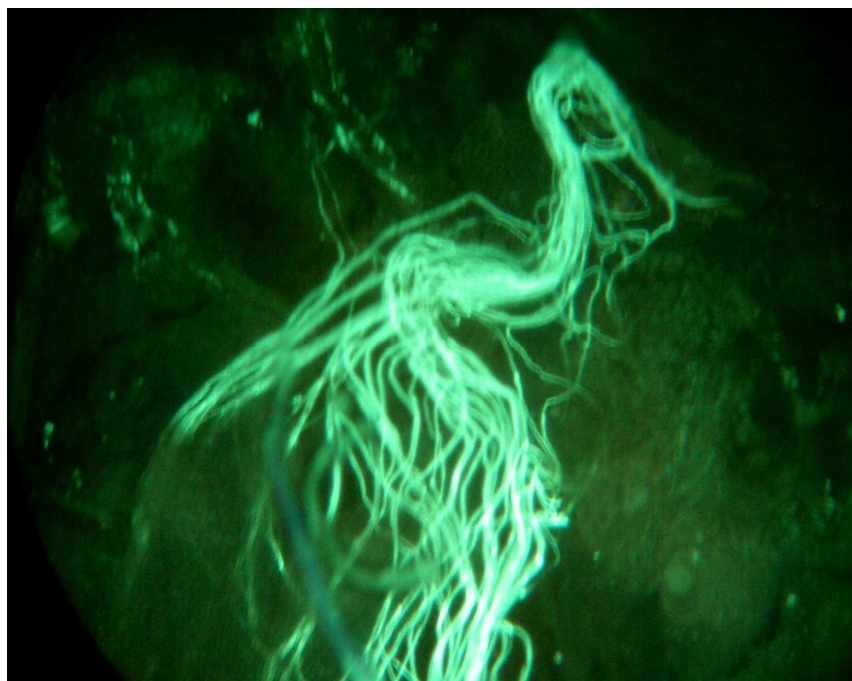


Figura 9. Porcentaje de Viabilidad para las variedades y especies utilizadas como donadoras de polen en los cruces, Técnica utilizada para la estimación de viabilidad de polén: Acetocarmin, n = 10.

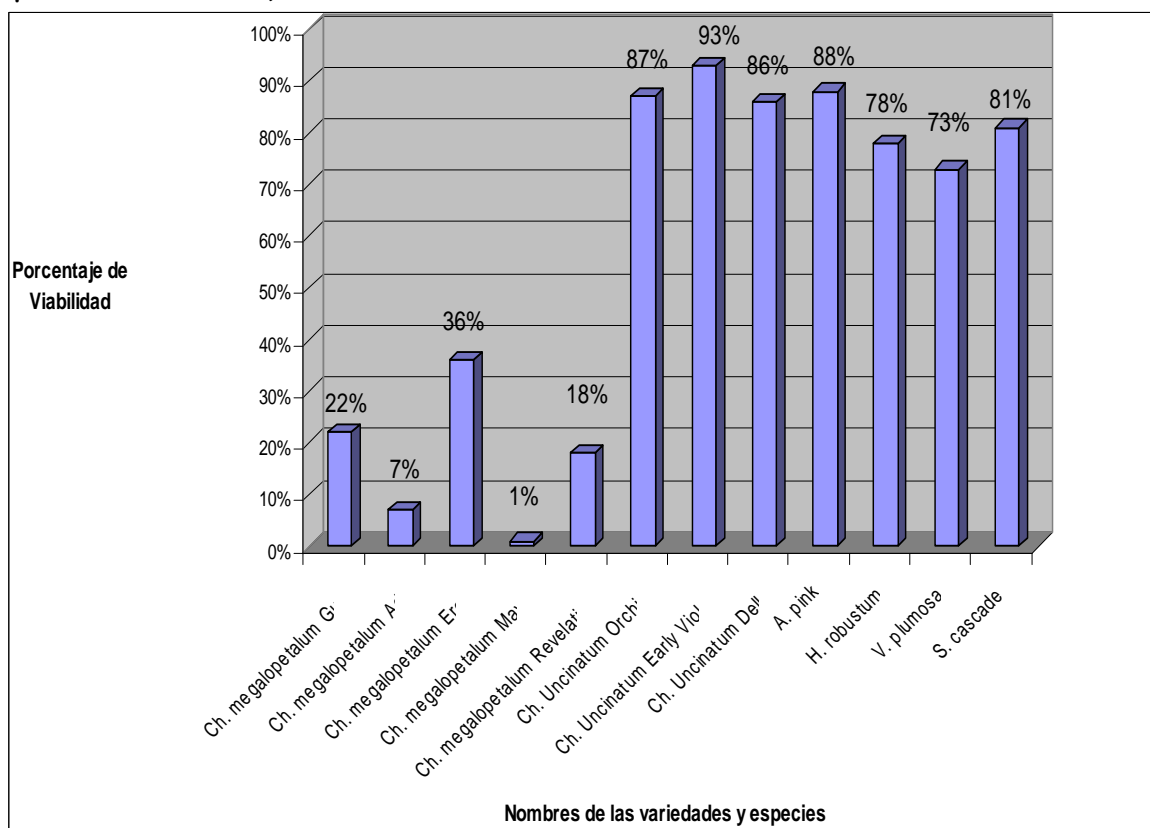


Figura 10. Correlación entre promedios de viabilidad de cada donador de polen y promedios de profundidad al que llegaron los cruces el los que intervino ese donador.

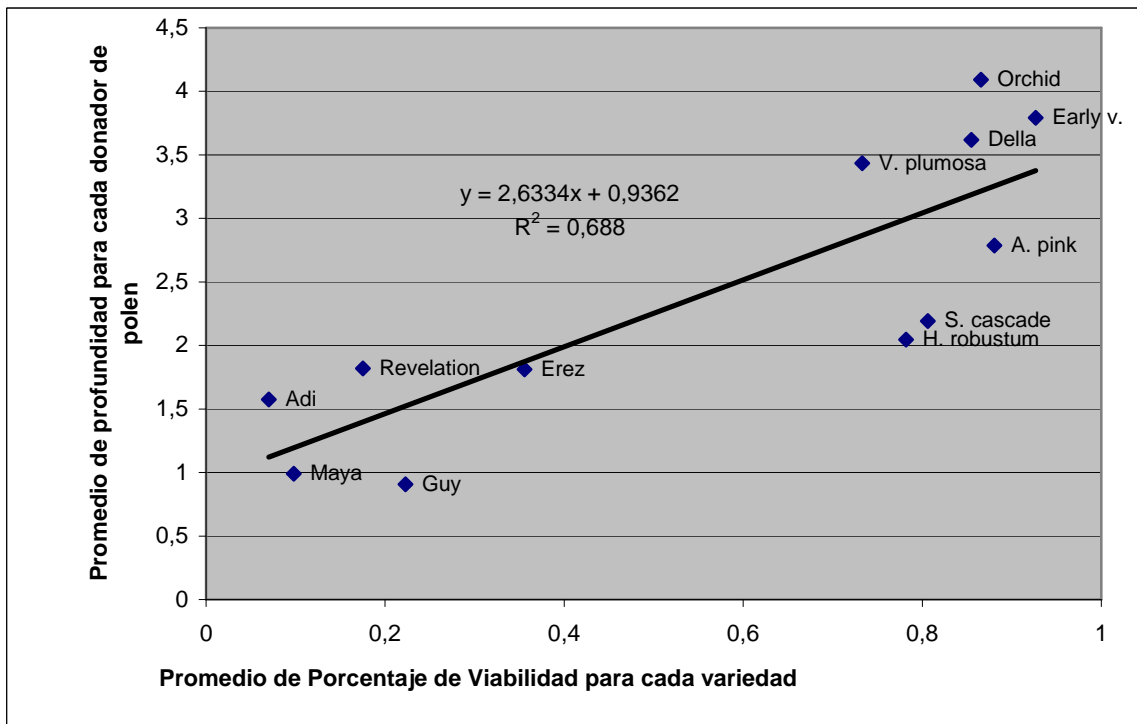


Figura 11. Cantidad estimada de granos de polen mediante la técnica de Acetocarmín para las variedades donadoras.

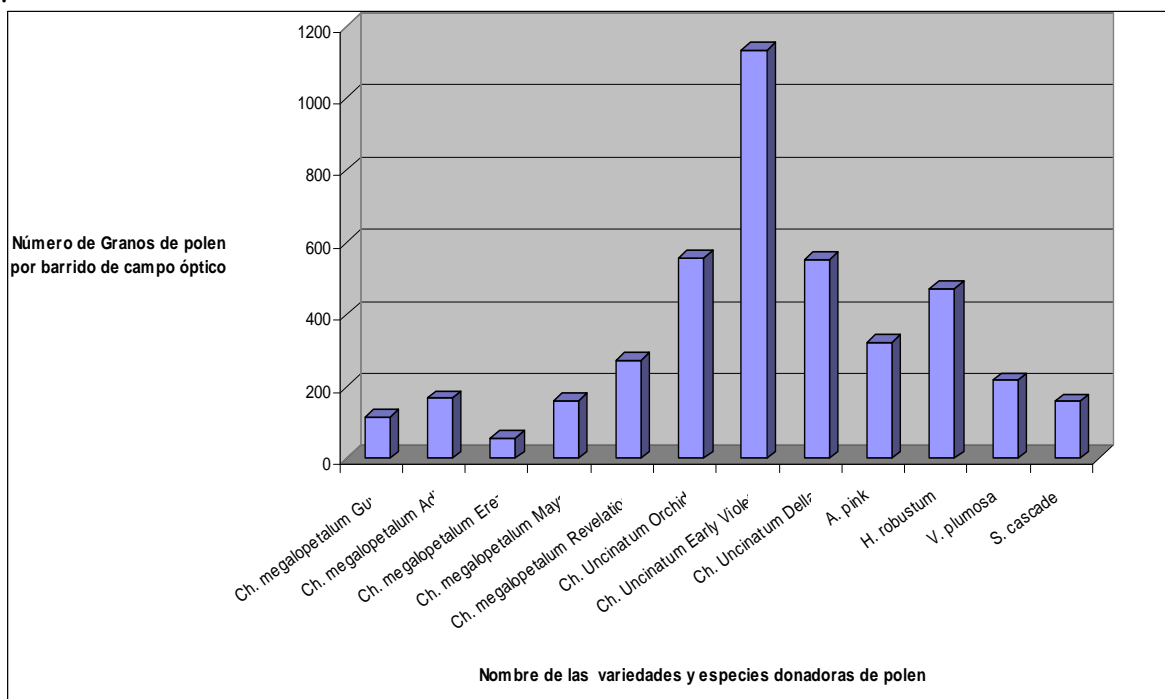


Figura 12. Correlación entre Cantidad de Granos de Polen y Porcentaje de Viabilidad mediante técnica de Acetocarmín para cada variedad utilizada como donadora de polen

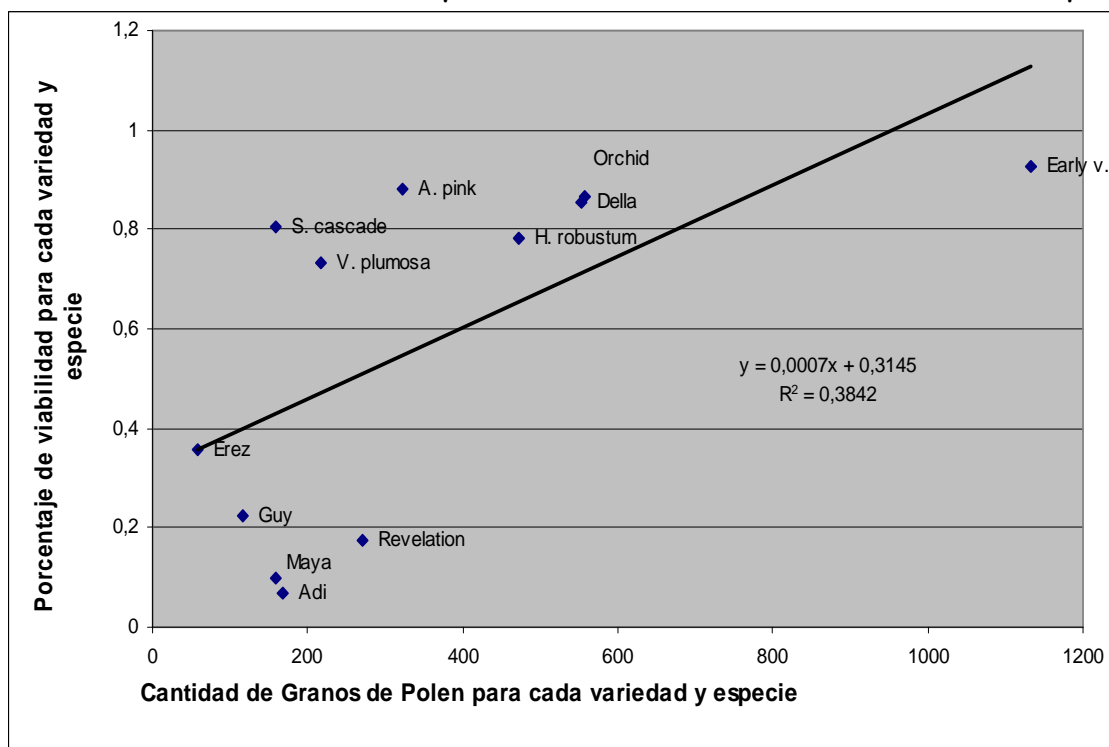


Figura 13. Correlación entre promedios de profundidad versus promedios de intensidad de todos los cruces en los que se utilizo un determinado donador de polen

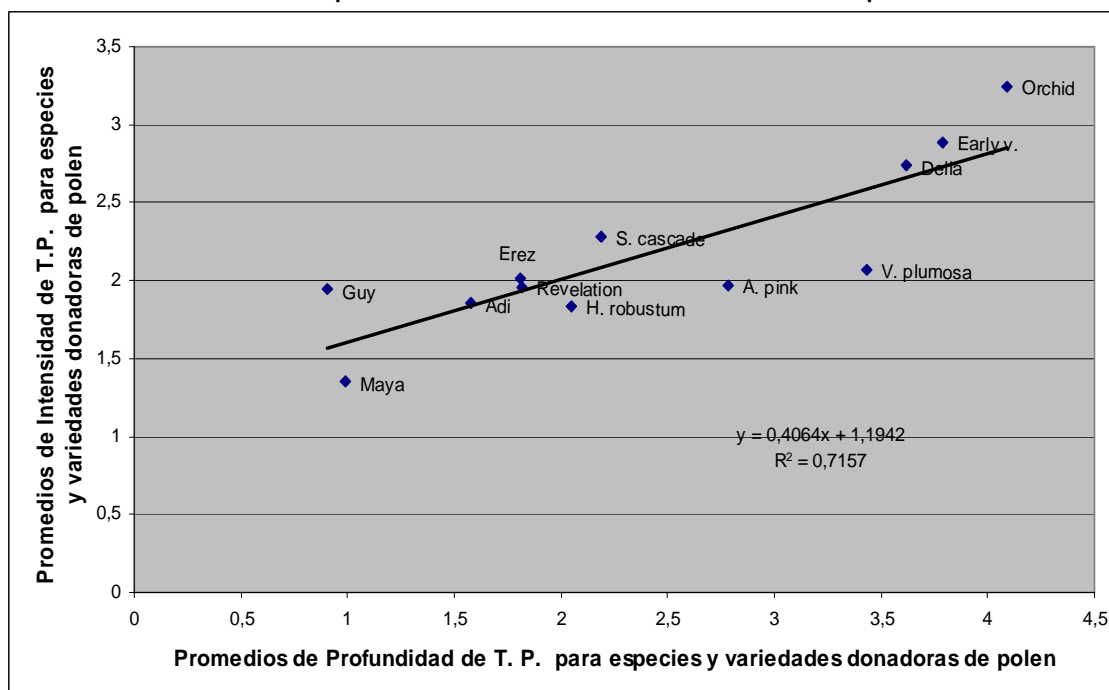


Figura 14. Correlación entre Cantidad de Granos de polen estimada bajo Acetocarmín e intensidad de entrada de Tubo Polínico para cada variedad utilizada como donadora de polen

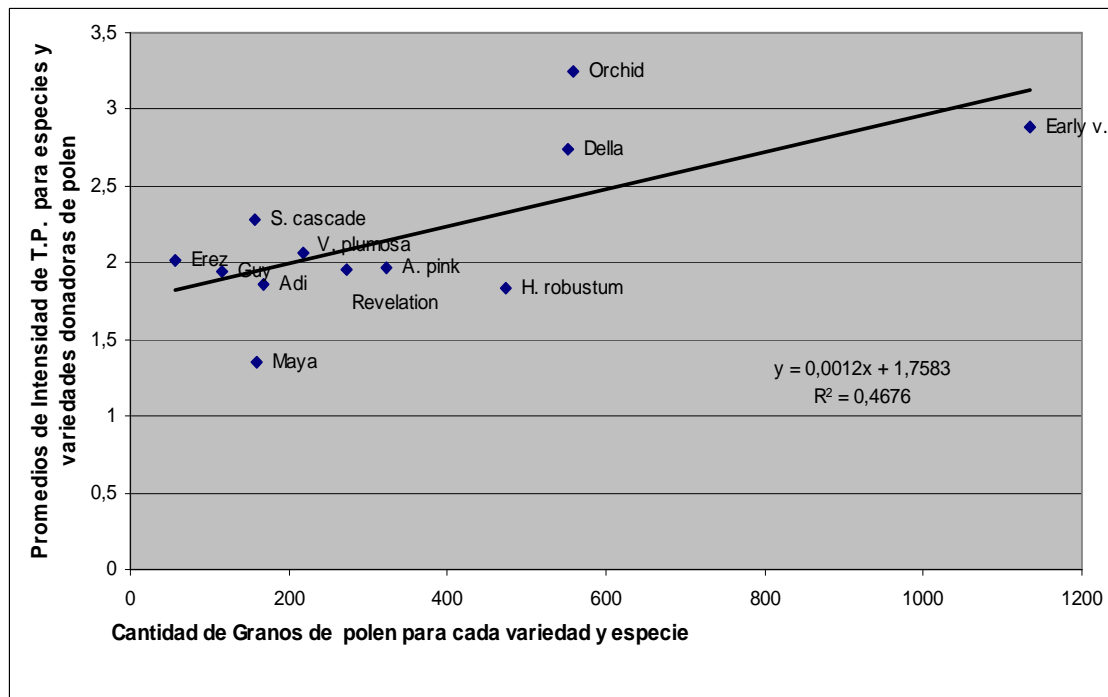


Figura 15. Medias de Profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos, interespecíficos e intergenéricos, Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. Valoración de intensidad de entrada 1 = 1 sólo grano de polen o tubo polínico, 2 = de 2 a 3, 3= de 4 a 6, 4= de 6 a 10, 5= de 10 en adelante

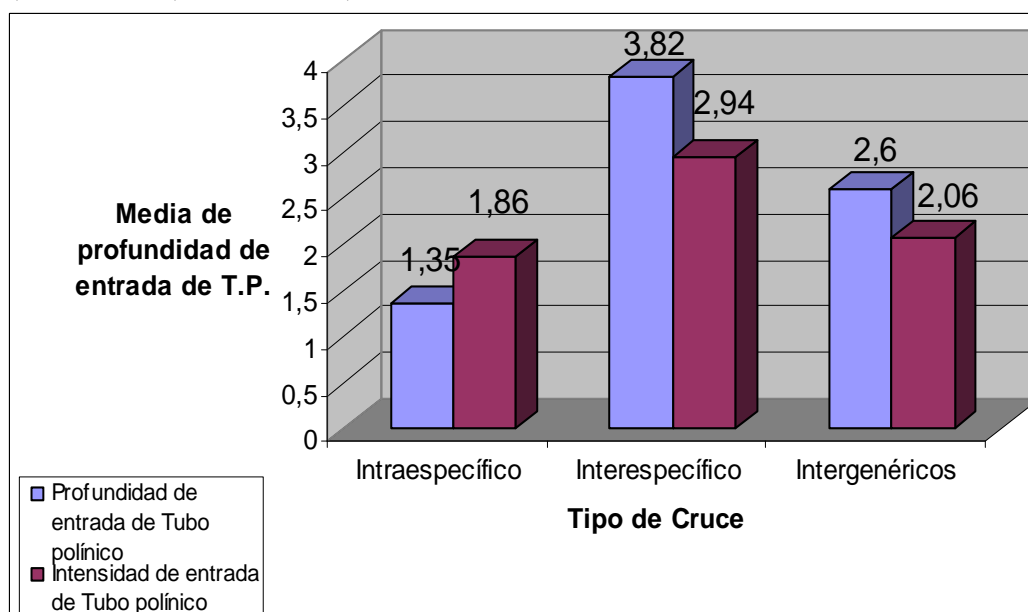


Figura 16. Medias de Profundidad e intensidad de entrada de tubo polínico para cruces intergenéricos: *Chamelaucium megalopetalum hr.* x *Hypochalyma robustum*, *Verticordia plumosa*, *Astartea pink* y *Scholtzia cascade*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. Valoración de intensidad de entrada 1 = 1 sólo grano de polen o tubo polínico, 2 = de 2 a 3, 3= de 4 a 6, 4= de 6 a 10, 5= de 10 en adelante.

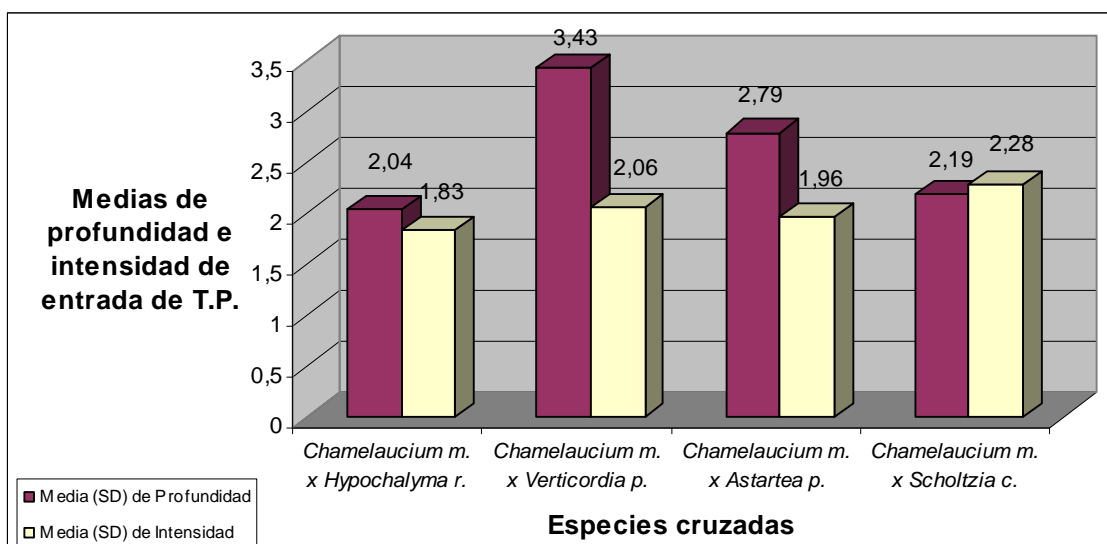


Figura 17. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para cruces intraespecíficos entre las variedades Guy y Maya de *Ch. megalopetalum hr.* y las variedades Guy Maya, Adi, Erez y Revelation del mismo híbrido. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

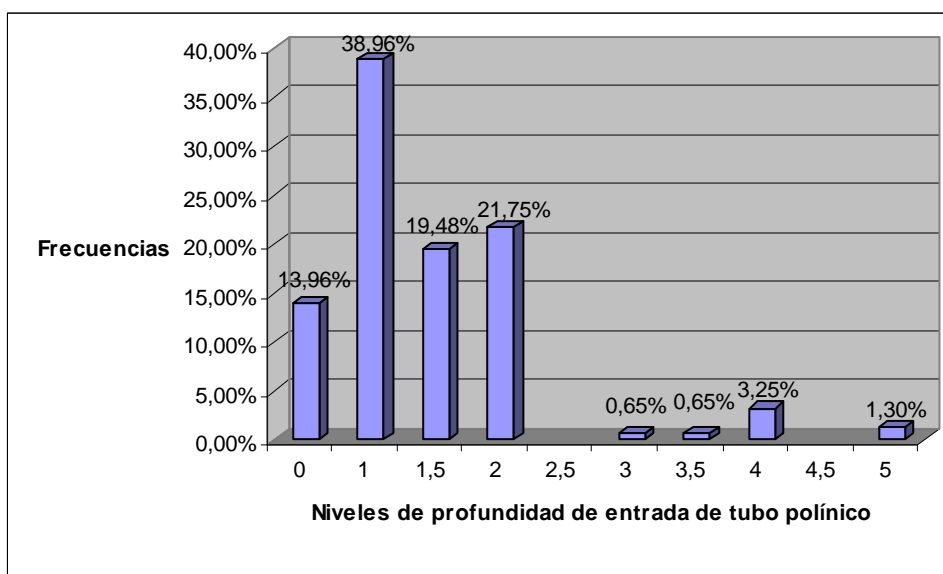


Figura 18. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Guy. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

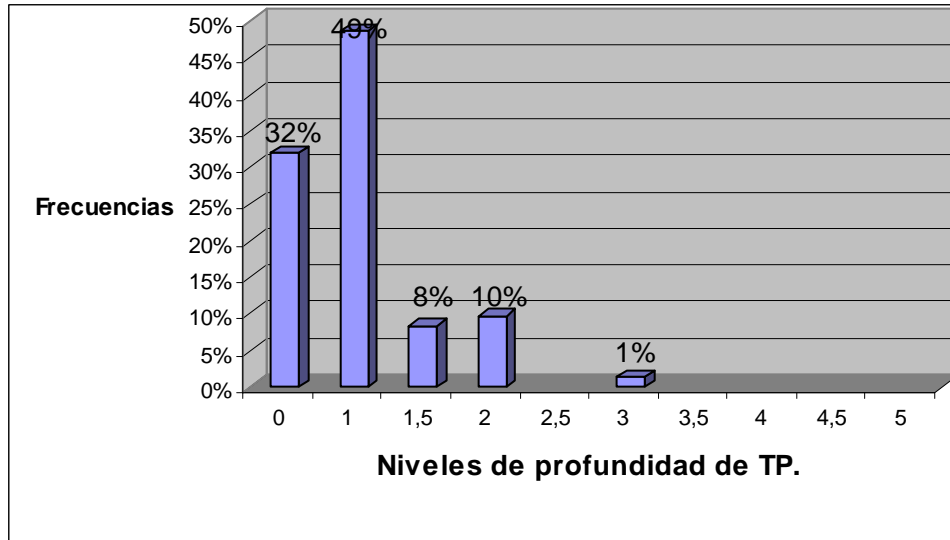


Figura 19. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Maya. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario n= 25.

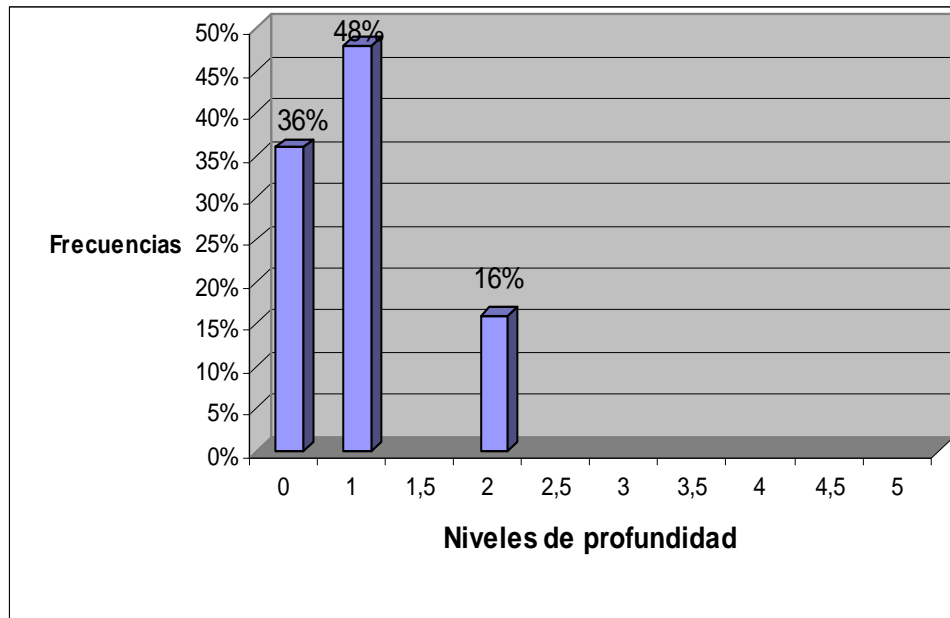


Figura 20. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Adi. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario n= 25.

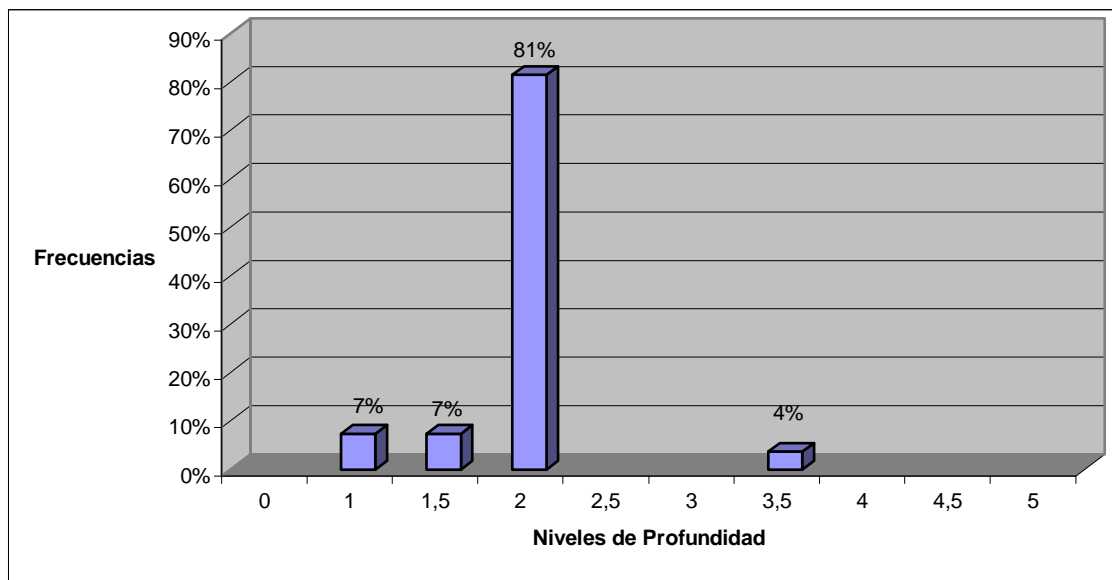


Figura 21. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Erez. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

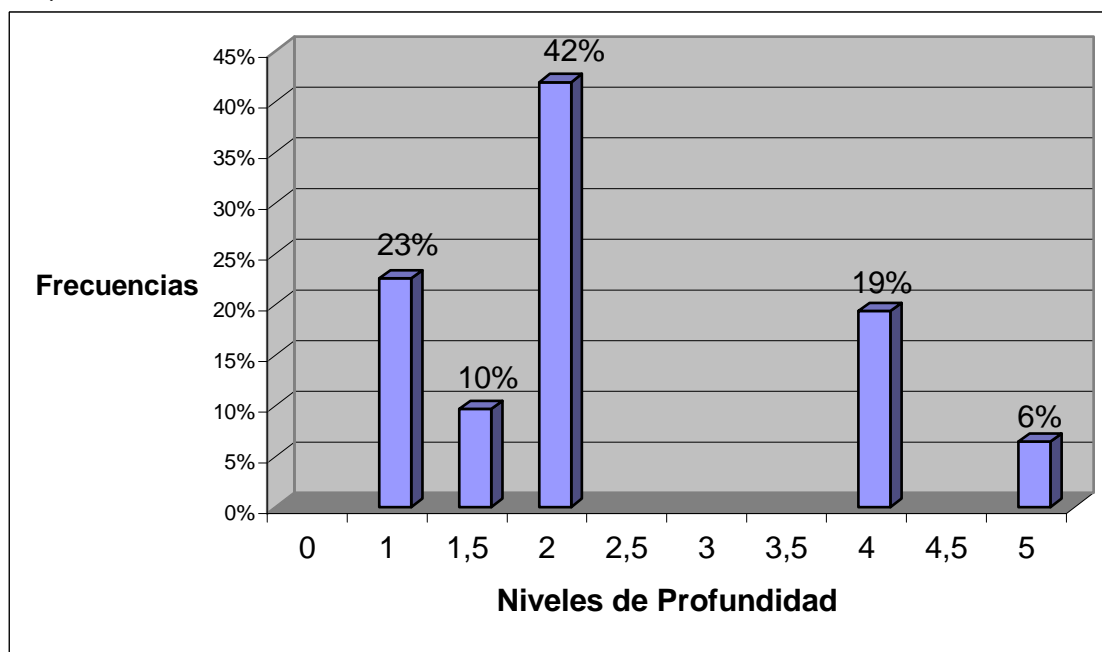


Figura 22. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Guy x Revelation. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

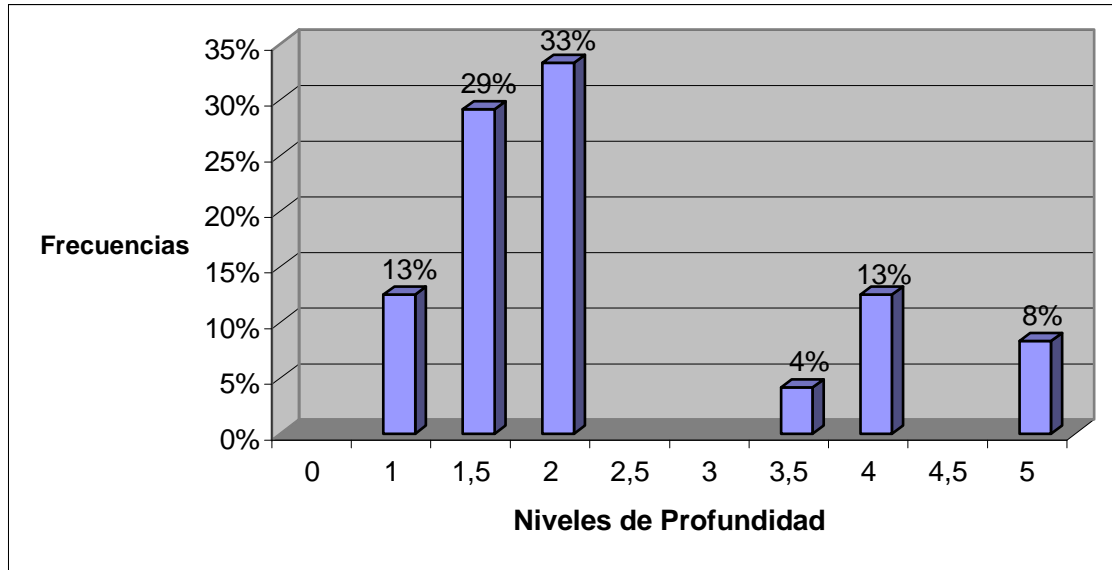


Figura 23. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Maya. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

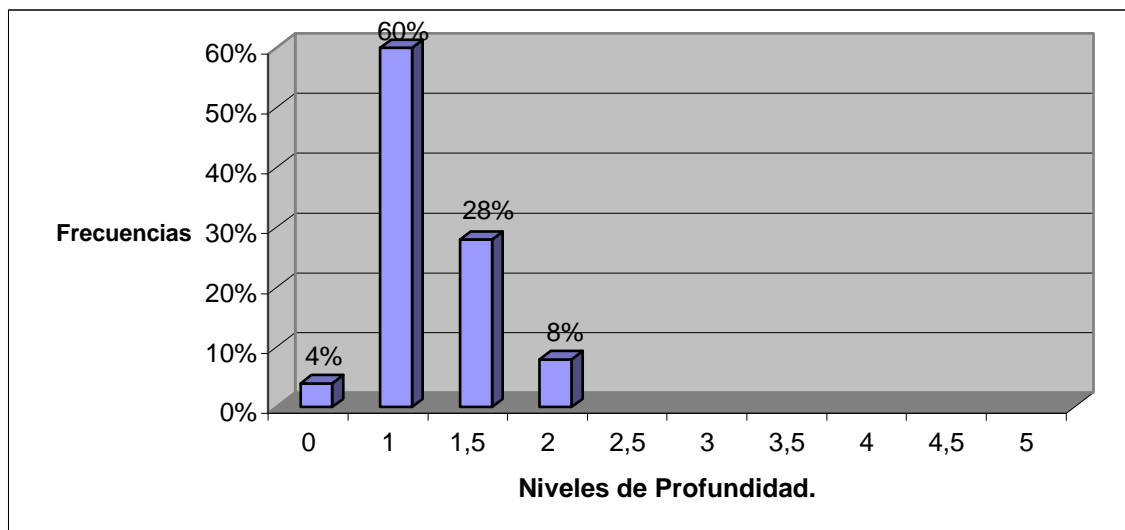


Figura 24. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Guy. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

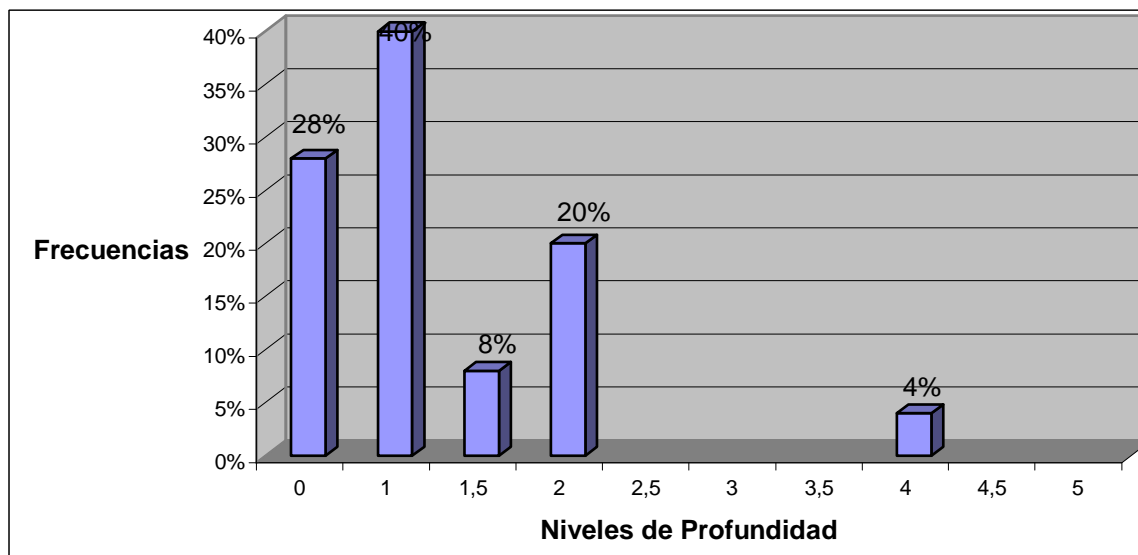


Figura 25. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Adi. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

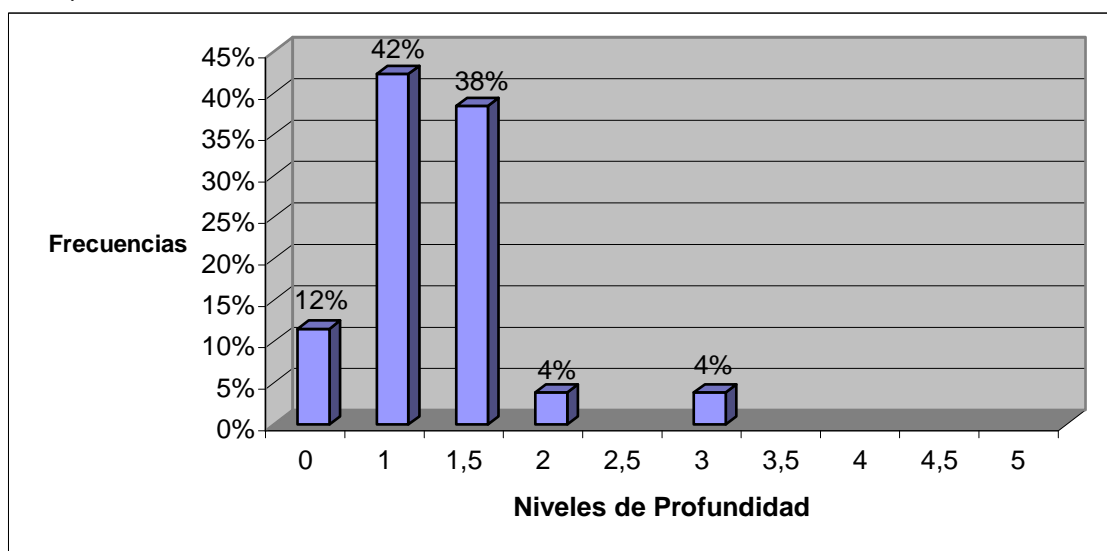


Figura 26. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Erez. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

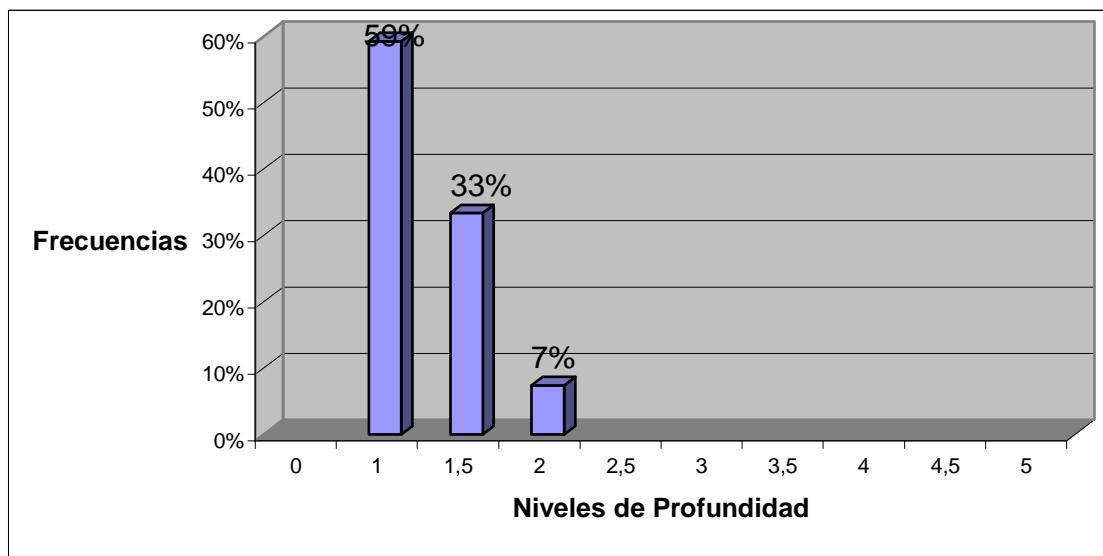


Figura 27. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intraespecífico Maya x Revelation. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

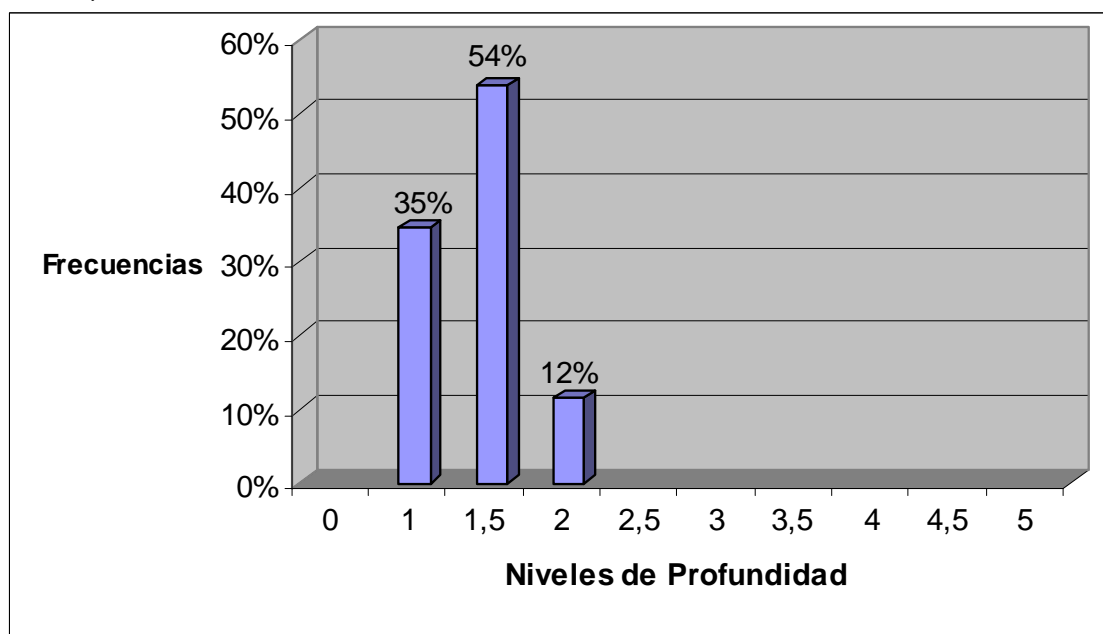


Figura 28. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Early violet. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

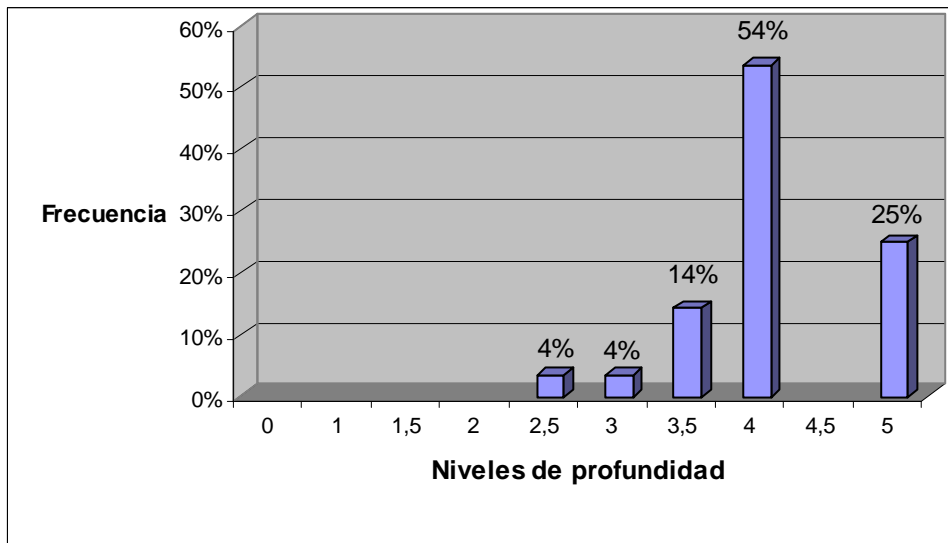


Figura 29. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Orchid. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

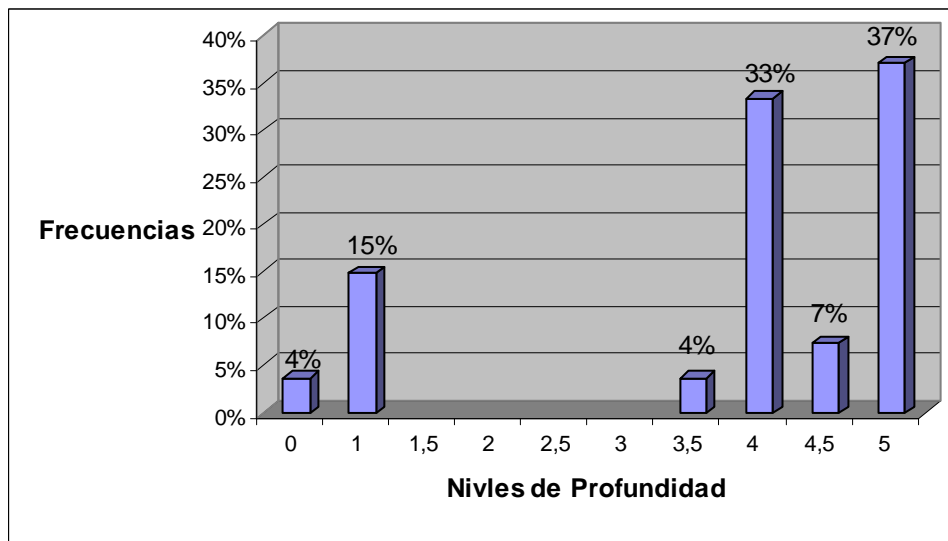


Figura 30. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Guy x Della. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

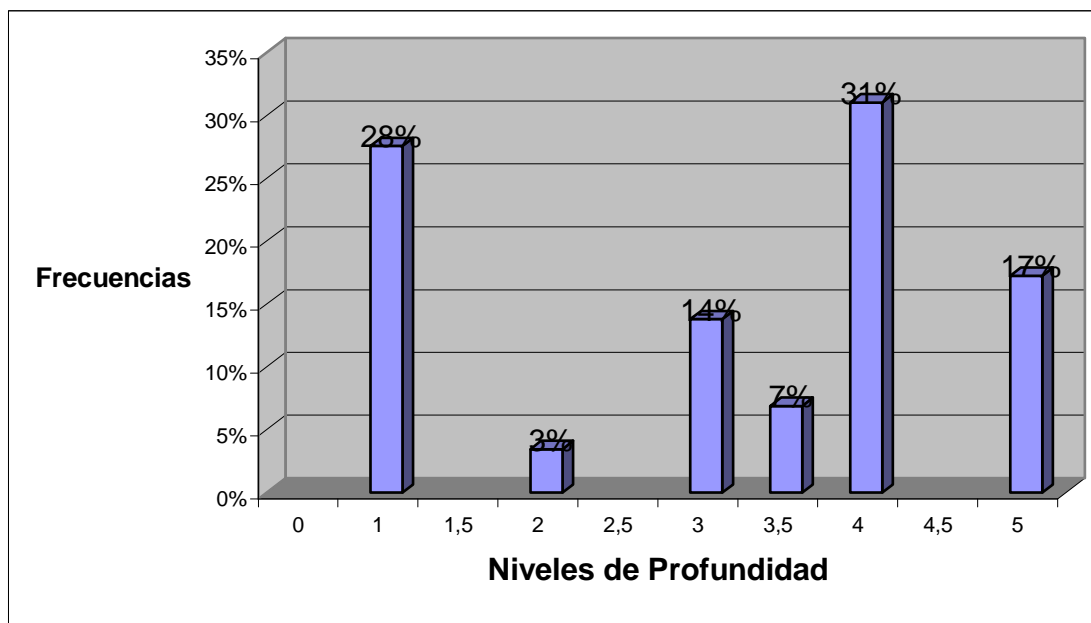


Figura 31. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Orchid. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

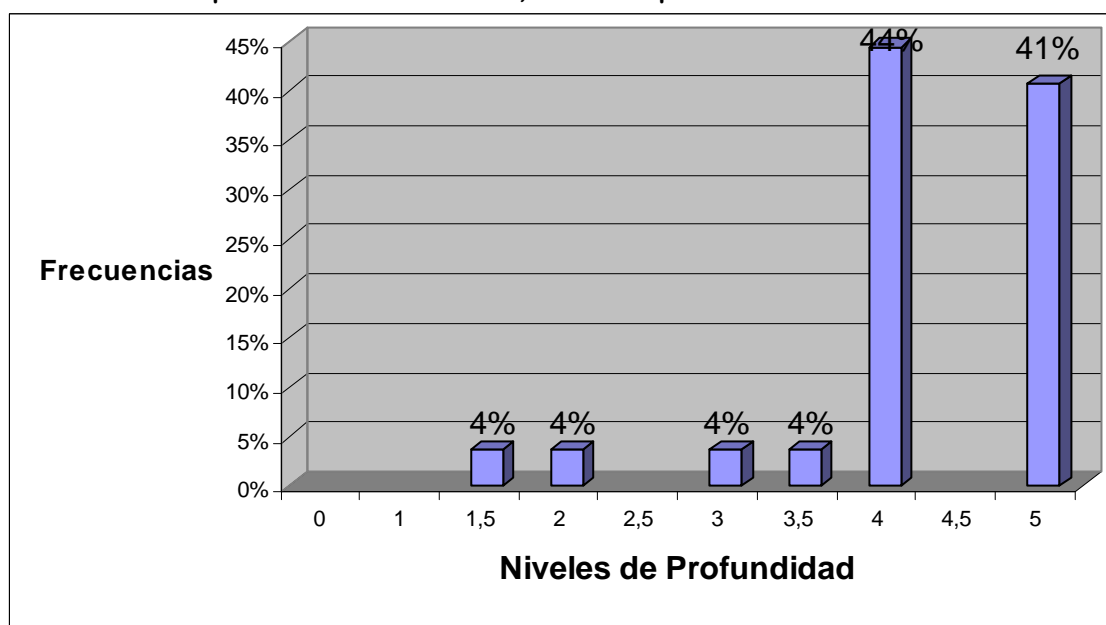


Figura 32. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Della. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

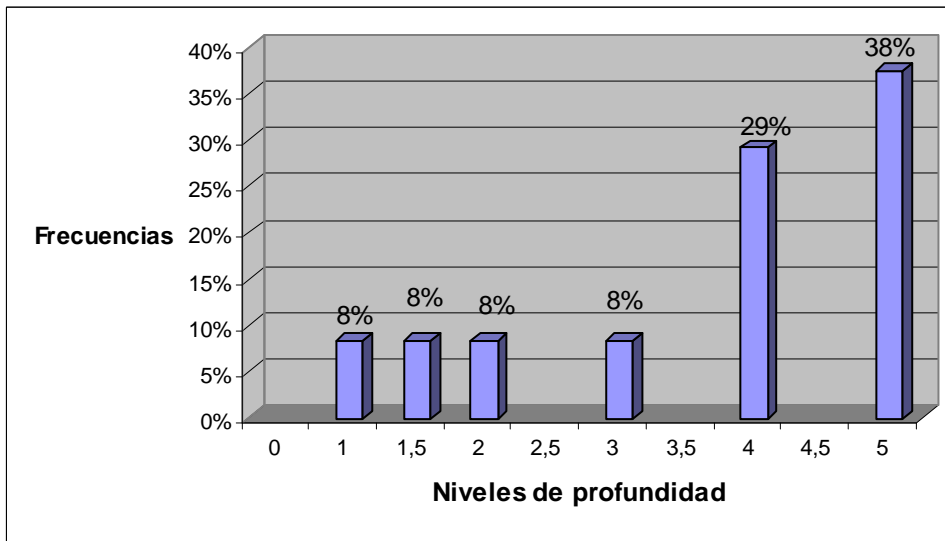


Figura 33. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce interespecífico Maya x Early violet. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

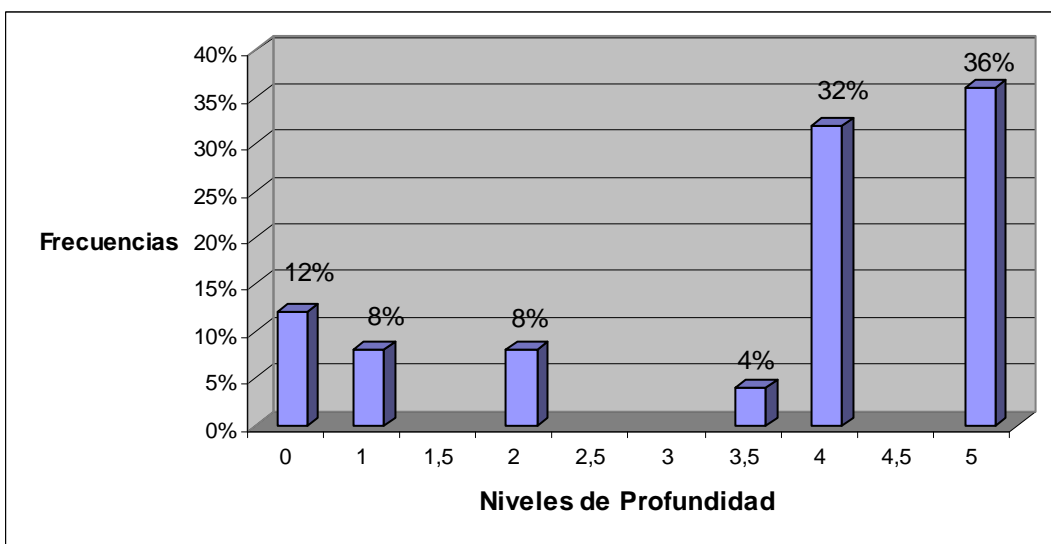


Figura 34. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Verticordia plumosa*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

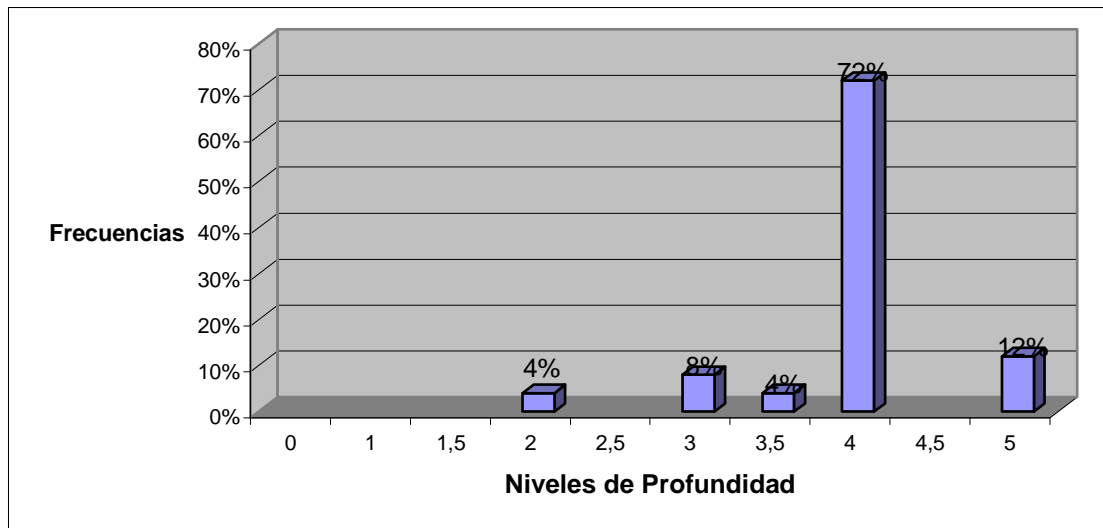


Figura 35. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x *Verticordia plumosa*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

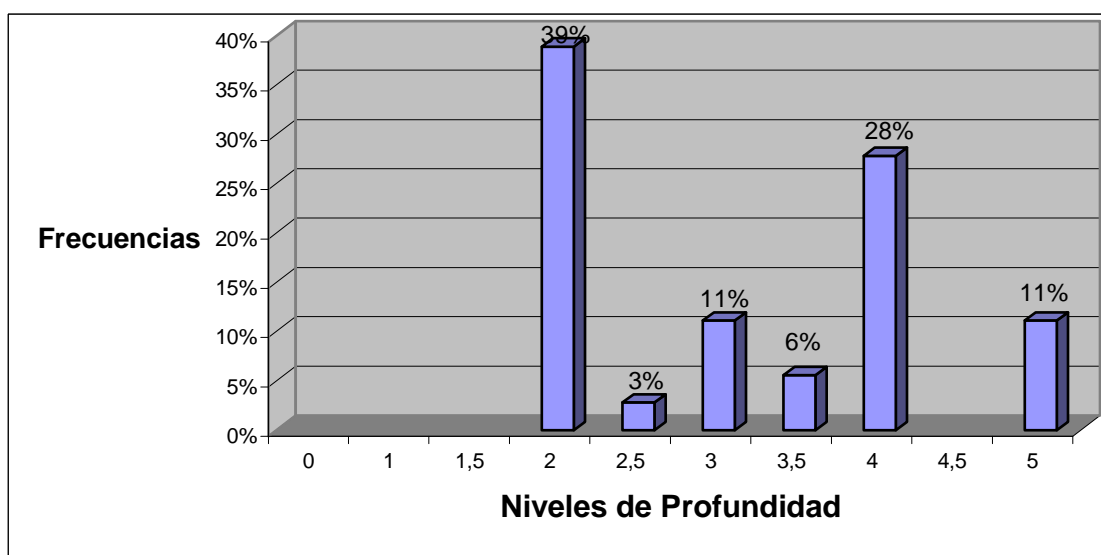


Figura 36. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico *Guy x Astartea pink*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

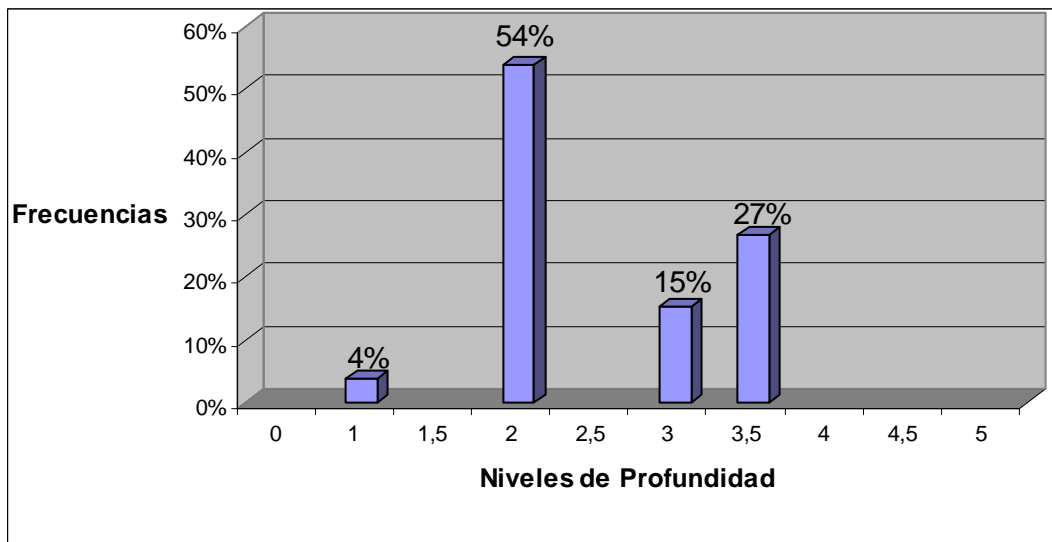


Figura 37. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico *Guy x Hypochalyma robustum*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25

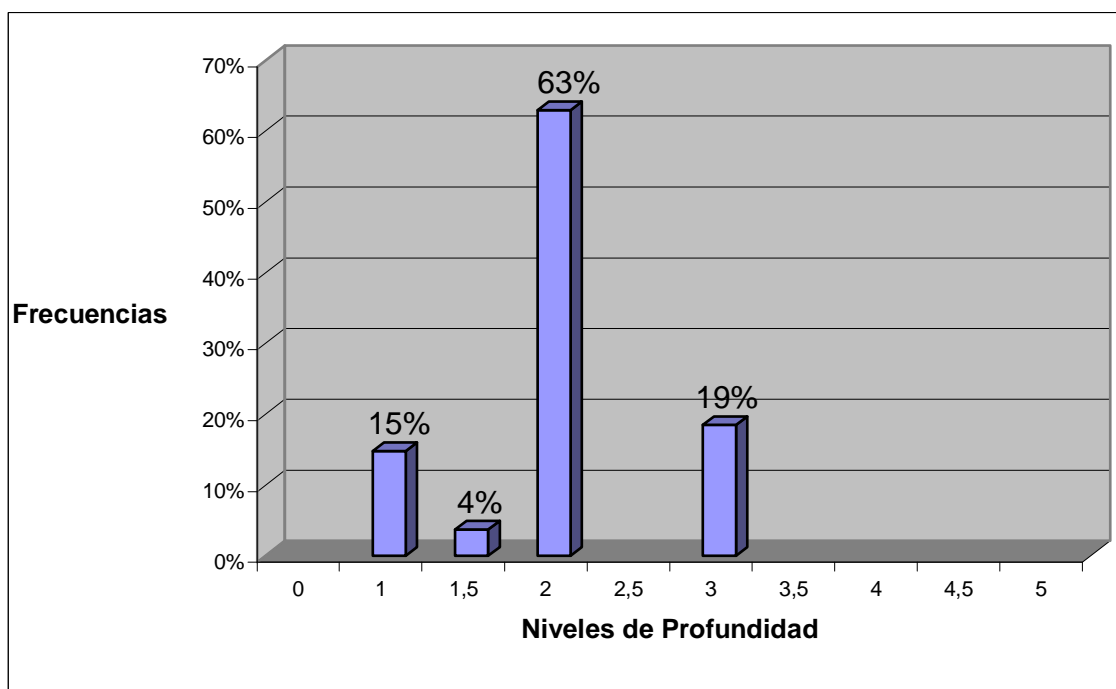


Figura 38. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x *Scholtzia cascade*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

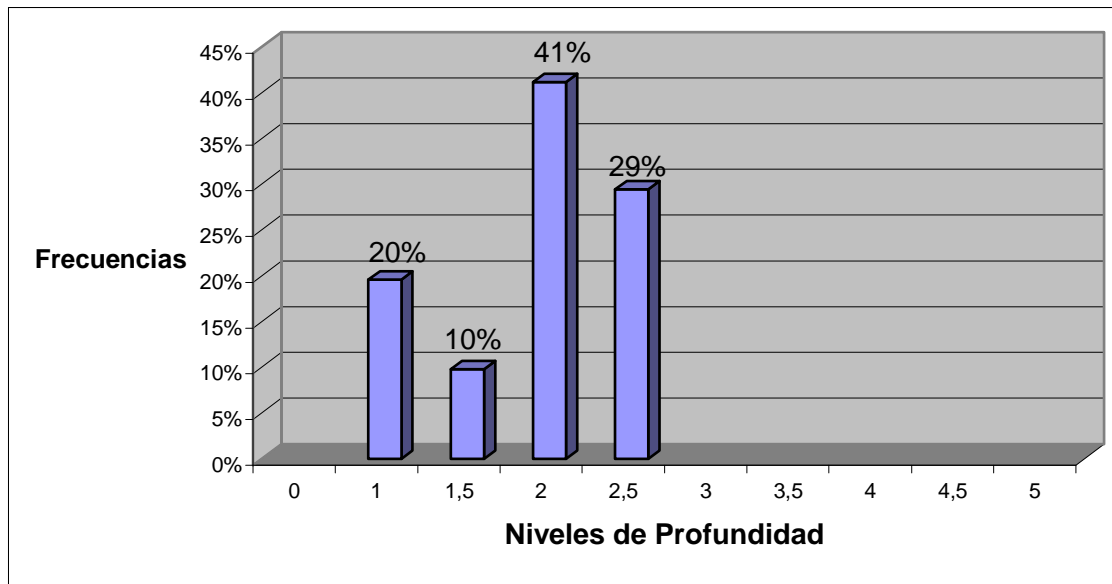


Figura 39. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Astartea pink*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

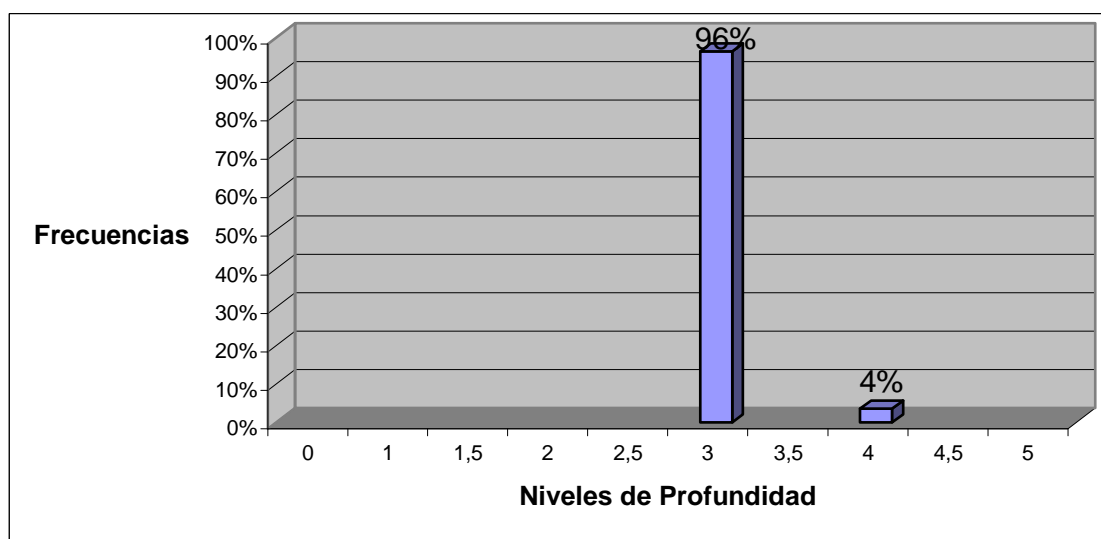


Figura 40. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Scholtzia cascade*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

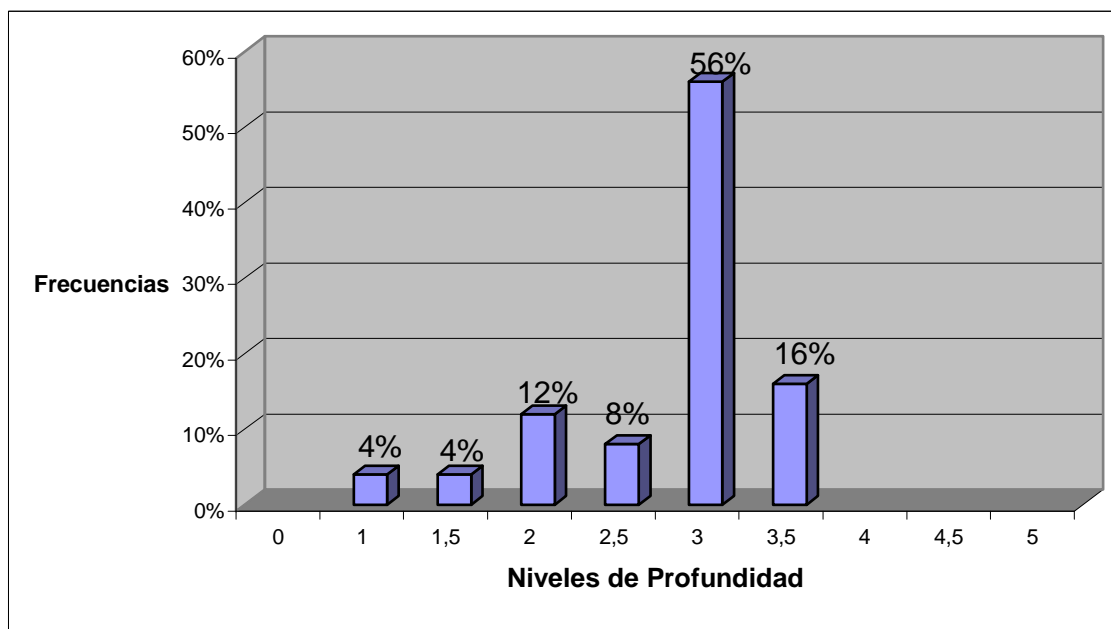


Figura 41. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Hypochalyma robustum*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

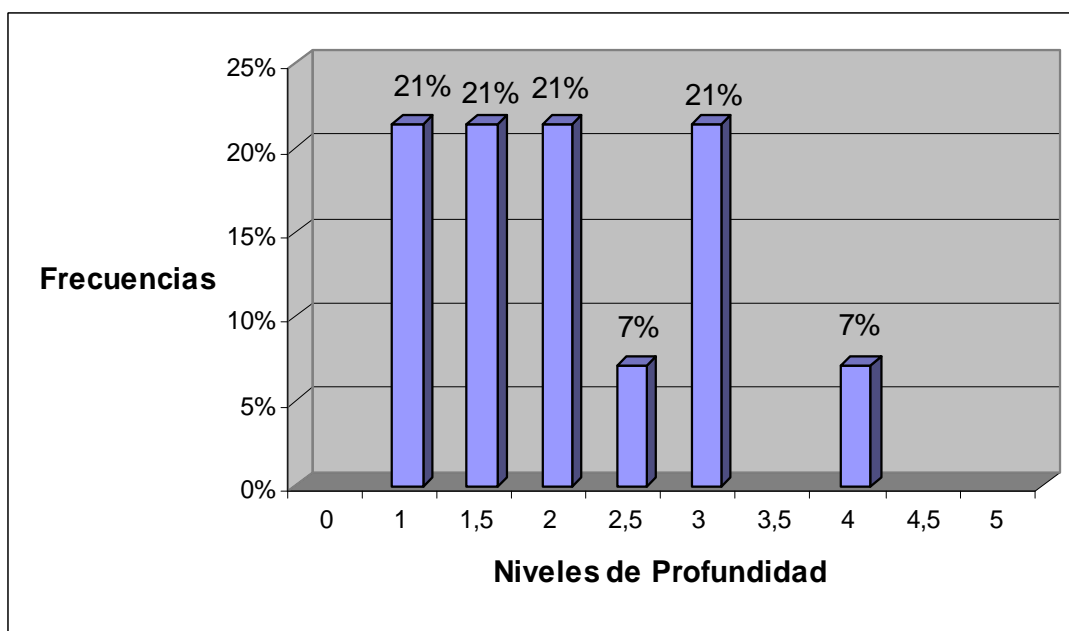


Figura 42. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico *Guy x Astartea pink*, control y tratamientos: corte de estilo, y aplicaciones al 0.5% y 1,5% del químico A*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

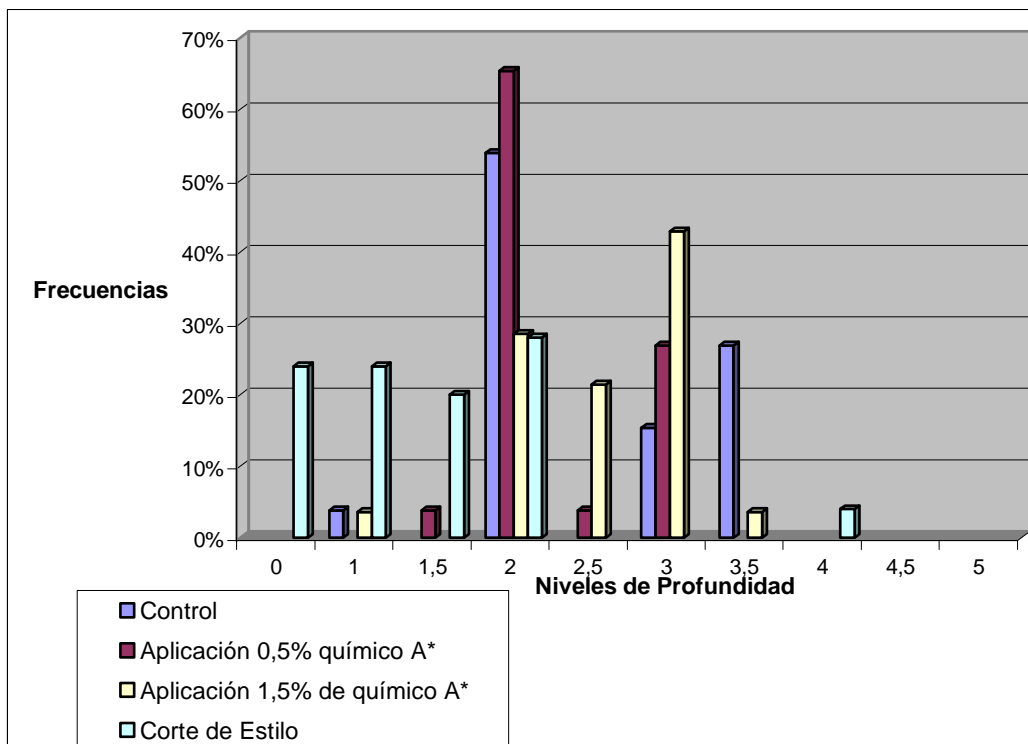


Figura 43. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico *Guy x Hypochalyma robustum*, control y tratamientos: corte de estilo, y aplicaciones al 0.5% y 1,5% del químico A*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

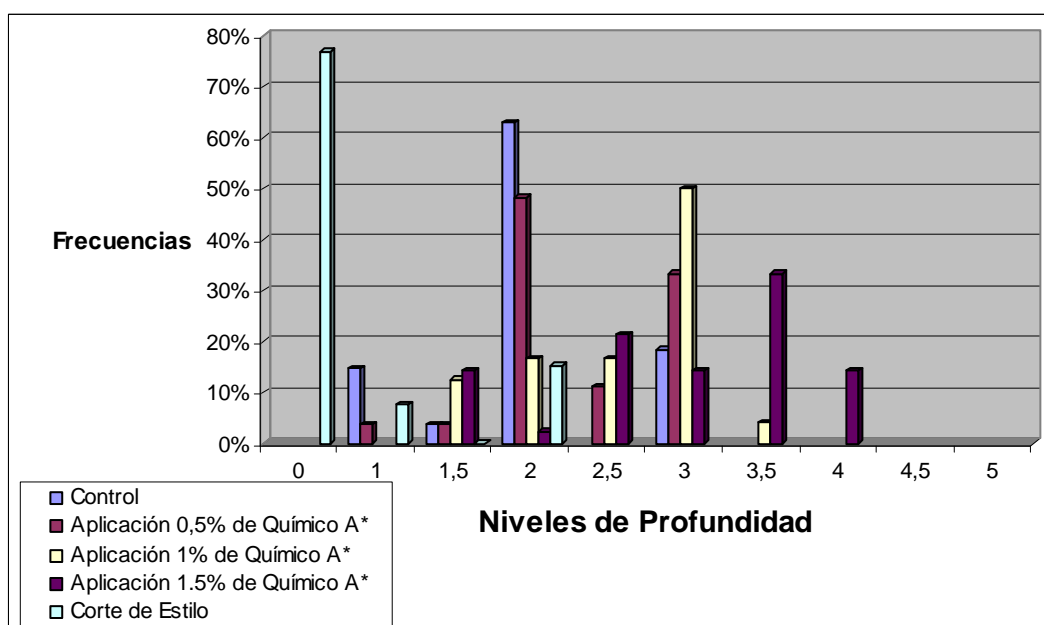


Figura 44. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Guy x *Scholtzia cascade*, control y tratamientos: corte de estilo, y aplicaciones al 0.5% y 1,5% del químico A*. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

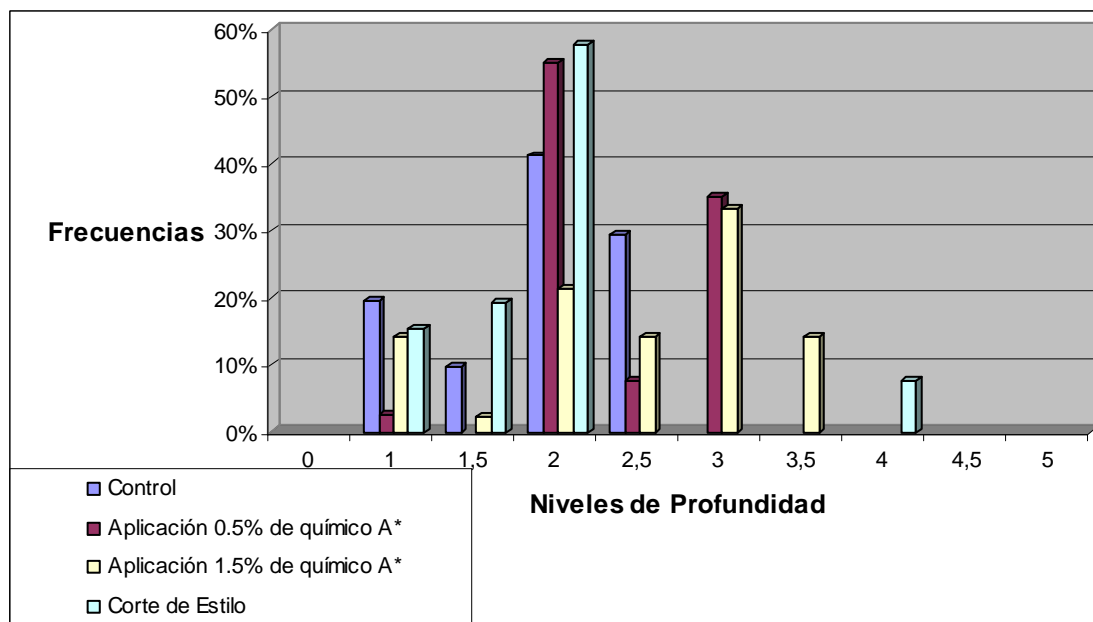


Figura 45. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Astartea pink*, control y tratamiento corte de estilo. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

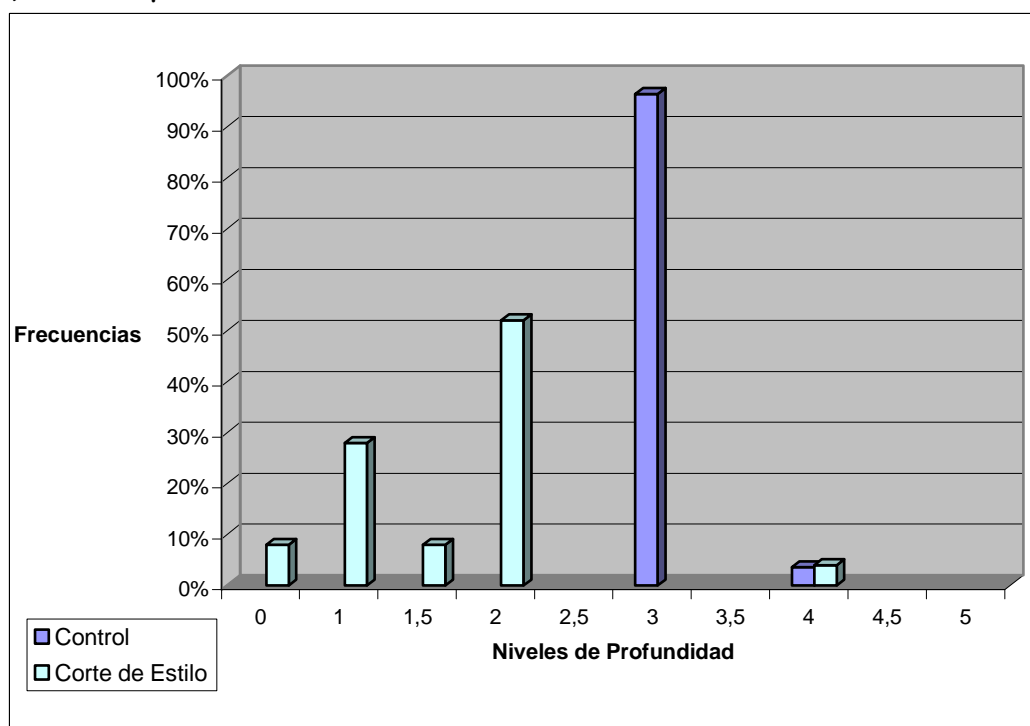


Figura 46. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Hypochalyma robustum*, control y tratamiento corte de estilo. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.

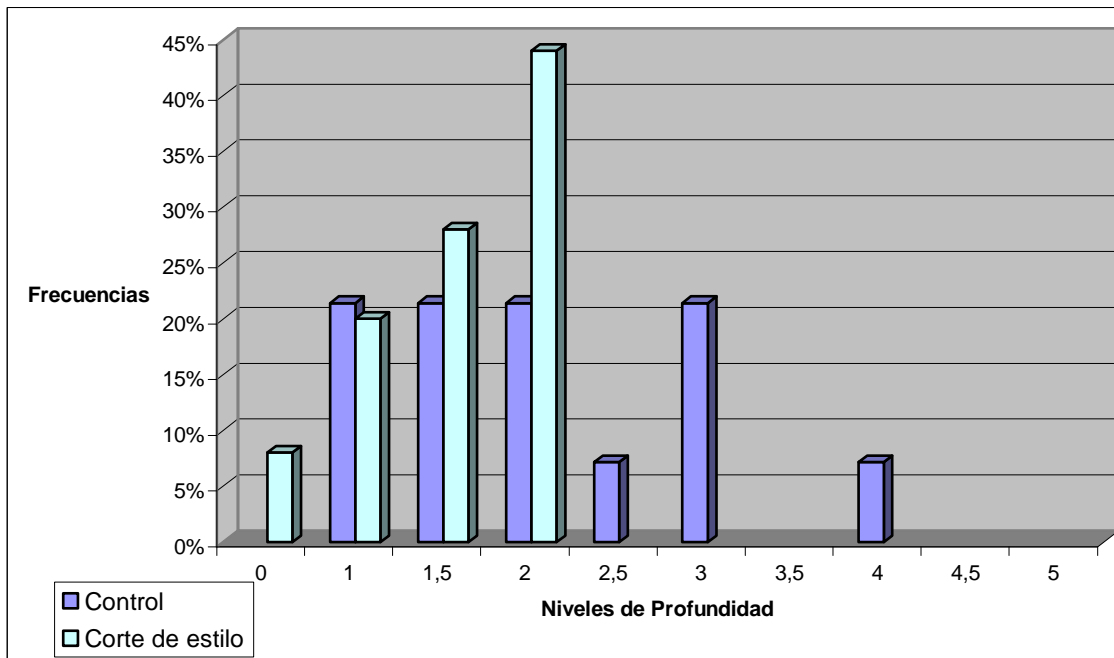
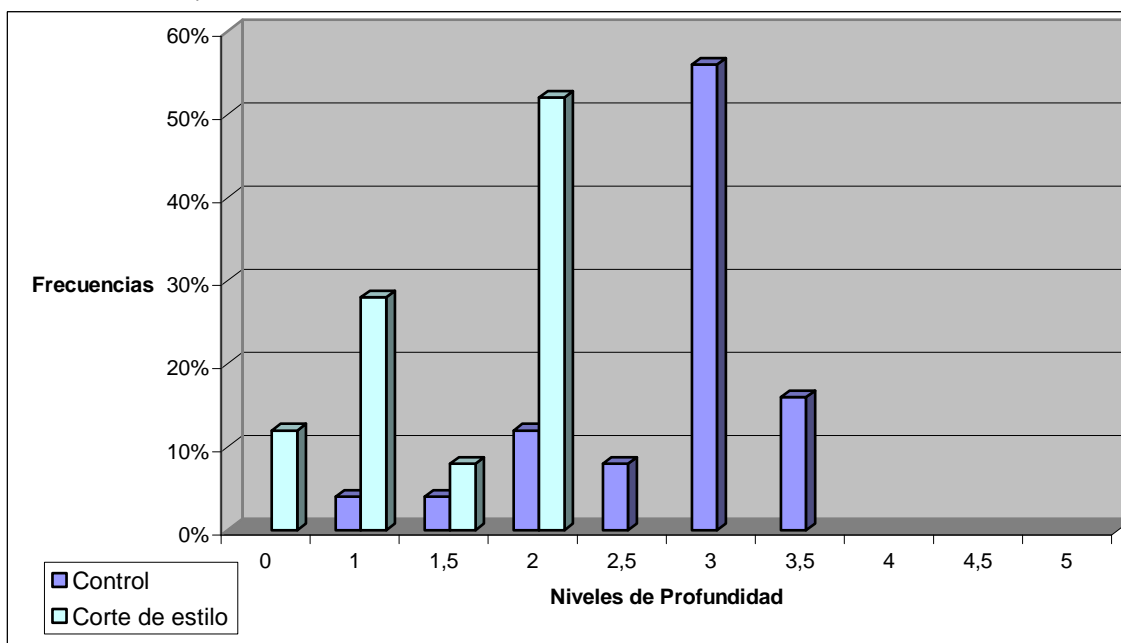


Figura 47. Histograma de Profundidad de entrada de tubo polínico para el cruce intergenérico Maya x *Scholtzia cascade*, control y tratamiento corte de estilo. Valoración de profundidad de entrada de tubo polínico, 0 = Ausencia de granos de polen o tubos polínicos, 1= presencia de granos de polen, 2= granos de polen germinando, 3 = tubos polínicos hasta la parte media del estilo, 4 = tubos polínicos hasta la parte terminal del estilo, 5 = tubos polínicos hasta el ovario. n= 25.



Anexos

Anexo 1. Estadios de Floración en *Chamelaucium megalopetalum*

GÉNERO *Chamelaucium* sp.

Fig. 1 = Estructura Floral *Chamelaucium*.

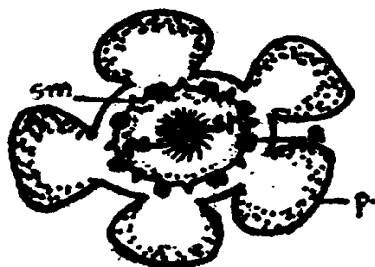


Fig. 2 = 1er. Estadio de la Flor



Fig. 3 = 2do. Estadio de la Flor

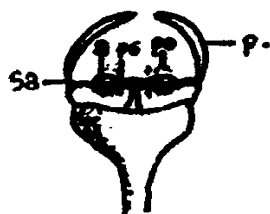


Fig. 4 = 3er. Estadio de la Fl (Estadio masculino)



5 = 4to. Estadio de la Flor. (Estadio femenino)

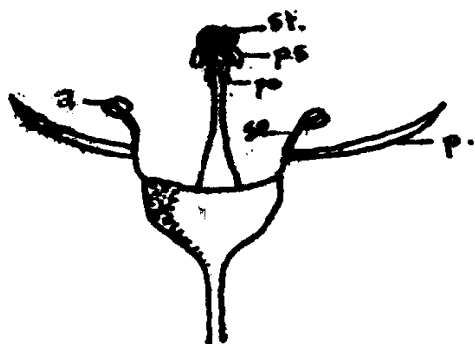
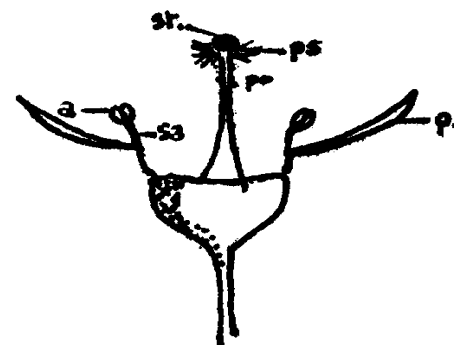


Fig. 6 = 4to. Estadio de la Flor en *Ch. megalopetalum*



a=antera, p=pétalos, ps=pelos estilares, po=polen, sa=estambre, sm=estaminoideos, st=estigma

