

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN EMBRIOLÓGICA DE LA ESPECIE FRUTAL
NATIVA *PSIDIUM CATTLEYANUM* SABINE (MYRTACEAE)**

**Aportes para la interpretación de su
sistema reproductivo**

por

Mercedes SOUZA PÉREZ

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
Julio de 2015

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Cristina Mazzella, la Ing. Agr. Phd. Ana María González y la Ing. Agr. Primavera Izaguirre el 30 de Julio de 2015.
Autor: Mercedes Souza Pérez. Directora Dra. Gabriela Speroni.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que estuvieron en mi camino en los años que me llevó la maestría. Caminando adelante, al costado y atrás, los que fueron empujando y los que se dejaron empujar. Todos fueron indispensables en este camino.

A mi tutora Gabriela Speroni que supo guiarme y sobre todo potenciarme.

Al comité de seguimiento (Cristina Mazzella, Beatriz Vignale).

Al tribunal (Ana María González, Primavera Izaguirre, Cristina Mazzella)

A Mauricio Bonifacino y Andrés Rossado del Laboratorio de Sistemática de Plantas Vasculares con los que aprendí muchísimo.

A mis colegas (piso 8 BEC, Laboratorio de Botánica, Departamento de Biología Vegetal, EEFAS, INIA). A los compañeros del grupo Caubá y a los Jóvenes Botánicos Uruguayos. Especialmente a Patricia Mai, Carolina Toranza, Victoria Valtierra y Cristina Trujillo y Carina Millán.

A los docentes de pasantías en Argentina (Ana, Sara, Héctor, Stella, Paula, Agustín).

A mi compañero de vida Jonatan que me dió para adelante siempre.

A Stella y Héctor mis padres que son los impulsores primarios y los culpables de todo esto.

A mis hermanos Amparo, Francisco, Ignacio y a Alejandra y Valeria. A mis sobrinos que han sido mis alegrías siempre: Lucas, Juana, Manuela y Rafael.

A mis amigos: Ana, Adriana, Claudia, Lorena, Gabriela, Silvina, Josefina, Florencia; Claudia y Mariana; Mayra; Fede, Pat.

Al programa de Maestría en ciencias Agrarias UPEP, y a todos los funcionarios por su dedicación y buena onda.

A las instituciones que financiaron mis estudios: las becas de apoyo a los estudios de posgrado y de finalización de posgrados CAP UdelaR. Al programa de Escala Docente AUGM que financió la realización de cursos y pasantías en el exterior. Al programa pasantías en el exterior de CSIC. Al programa CSIC I+D que financió el proyecto en el que se enmarca esta Tesis.

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.1.1 <u>Sistemática, taxonomía y distribución de <i>Psidium cattleyanum</i></u>	1
1.1.1.1 <i>Psidium cattleyanum</i>	2
1.1.2 <u>Usos e importancia económica y productiva de la especie</u>	4
1.1.3 <u>Morfología floral y características embriológicas en <i>Psidium</i></u> <u><i>cattleyanum</i></u>	5
1.1.3.1 Androceo	5
1.1.3.2 Gineceo	6
1.1.4 <u>Endospermogénesis y embriogénesis, morfología de la semilla y</u> <u>desarrollo del fruto</u>	7
1.1.5 <u>Citogenética de la especie</u>	8
1.1.6 <u>Biología reproductiva</u>	9
1.1.6.1 Modo de reproducción	9
1.1.6.2 Apomixis	10
1.1.6.3 Viabilidad y germinación de polen	11
1.2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
1.2.1 <u>Justificación</u>	12
1.2.2 <u>Hipótesis de trabajo</u>	13
1.2.3 <u>Objetivos</u>	13
1.2.3.1 Objetivo general	13
1.2.3.2 Objetivos específicos:	14
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>.....	15

2.1 SELECCIÓN Y COLECTA DE MATERIALES	15
2.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL.....	17
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN LOS SACOS POLÍNICOS MADUROS.....	18
3. RESULTADOS.....	21
3.1 PATRONES ONTOGENÉTICOS EN EL ANDROCEO	21
3.1.1 <u>Desarrollo del microsporangio y microsporogénesis</u>	22
3.1.1.1 Tejido esporógeno	22
3.1.1.2 Células madre de las Microsporas.....	22
3.1.1.3 Microsporas	23
3.1.2 <u>Granos de polen</u>	24
3.1.3 <u>Anomalías en el desarrollo de los granos de polen</u>	24
3.1.3.1 Cuantificación de sacos polínicos con contenidos anómalos...	25
3.2 PATRONES ONTOGENÉTICOS EN EL GINECEO	34
3.2.1 <u>Formación de los óvulos y megasporogénesis</u>	35
3.2.1.1 Desarrollo del megasporangio.....	35
3.2.1.2 Megasporogénesis.....	36
3.2.2 <u>Megagametogénesis:</u>	37
3.2.2.1 Formación de Saco embrionario	37
3.2.3 <u>Fecundación y etapas iniciales de la formación de semilla</u>	38
3.2.3.1 Endosperma y Cigoto.....	39
4. DISCUSIÓN.....	52
4.1 CARACTERES ONTOGENÉTICOS DEL ANDROCEO.....	52
4.1.1 <u>Paredes de las anteras</u>	53
4.1.2 <u>Tapete y Orbículas</u>	53
4.1.3 <u>Desarrollo de las microsporas</u>	54
4.1.4 <u>Granos de polen</u>	55
4.2 ANOMALÍAS VS VIABILIDAD DE POLEN	57
4.3 CARACTERES ONTOGENÉTICOS DEL GINECEO.....	60

4.3.1 <u>Características morfológicas del gineceo</u>	60
4.3.2 <u>Compitum y placentación</u>	61
4.3.3 <u>Características del megasporangio</u>	62
4.3.4 <u>Desarrollo del megagametofito</u>	63
4.3.4.1 Saco embrionario.....	64
4.3.5 <u>Fecundación y desarrollo inicial de semilla</u>	66
4.3.5.1 Endosperma	67
4.3.5.2 “Cigoto”	68
4.3.6 <u>Óvulos abortados</u>	69
4.4 APOMIXIS	71
4.5 GLÁNDULAS ESQUIZO-LISÍGENAS	73
4.6 ASPECTOS TAXONÓMICOS Y FENOLÓGICOS	75
4.7 PERSPECTIVAS	77
5. <u>CONCLUSIONES</u>	79
6. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	81
7. <u>ANEXOS</u>	93

RESUMEN

Psidium cattleianum Sabine "arazá" muestra un creciente interés productivo en la región debido a sus buenas características para la comercialización e industrialización de sus frutos. Se reconocen dos formas en base a la coloración de los frutos: *P. cattleianum* f. *cattleianum* Sabine (rojos) y *P. cattleianum* f. *lucidum* O. Deg. (amarillos), actualmente en estudio para una re-circunscripción taxonómica. Hasta el momento no se ha determinado el modo más adecuado de propagación comercial. Se ha reportado baja viabilidad de polen y evidencias de apomixis como modo de reproducción, aunque no se han caracterizado los procesos de desarrollo involucrados. El objetivo de esta tesis es estudiar la ontogenia de flores y primeras etapas de desarrollo de semillas y frutos en materiales seleccionados de ambas formas para interpretar aspectos embriológicos que condicionan el modo de reproducción, aportar datos biológicos necesarios para instrumentar planes de manejo comercial e identificar caracteres que contribuyan a la definición taxonómica de las entidades intraespecíficas. Se estudiaron siete individuos seleccionados e incluidos en el Programa de selección de frutos nativos de Uruguay (FAGRO-INIA-MGAP). Se colectaron flores en distintas etapas del desarrollo y se procesaron por la técnica clásica de inclusión en parafina. Se describe por primera vez la ontogenia de los órganos reproductivos, microgametofito y megagametofito en la especie *Psidium cattleianum*. Ambas formas mostraron un patrón ontogenético típico de Myrtaceae. Los caracteres encontrados en el desarrollo ontogenético de androceo y gineceo para los materiales estudiados no aportan diferencias para la recircunscripción taxonómica de las formas. En las anteras maduras se observaron anomalías en los granos de polen resultantes. Éstas se asocian a los altos niveles de ploidía de la especie y son consideradas las causantes de la baja viabilidad de polen. No se observaron indicios de meiosis en los óvulos analizados. Tampoco se hallaron evidencias de aposporia ni embrionía adventicia en los citoipos observados. Se propone diplosporia como vía formación de semillas apomícticas.

Palabras clave: arazá, biología reproductiva, frutos nativos, ontogenia, *Psidium*.

SUMMARY

Embryological characterization of the native fruit species *Psidium cattleyanum* Sabine (Myrtaceae).

Psidium cattleyanum Sabine "arazá" shows an increasing productive interest in the region due to its good traits for its fruits commercialization and industrialization. Based on the difference of fruit pericarp color two forms are recognized: *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* O. Deg (yellow) and *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* Sabine (red); currently being studied for a taxonomic re-circumscription. Until now the most appropriate way of commercial propagation has not been determined. Low viability of pollen and evidence of apomixis as a way of reproduction have been reported. Although the development processes involved has not been characterized. The aim of this thesis was to study the ontogeny of flowers and early development of seeds and fruits in selected materials of both forms. As a way to interpret the embryological aspects which influence the mode of reproduction, to provide biological necessary data to implement commercial management plans and to identify traits that contribute to the definition of intraspecific taxonomic entities. We studied seven selected individuals, included in the selection program of native fruits of Uruguay (MGAP FAGRO-INIA). Flowers were collected at different stages of development and were processed through the conventional technique of paraffin embedding. The ontogeny of the reproductive organs: megagametophyte and microgametophyte, in *Psidium cattleyanum* species is described for the first time. Both forms showed the typical Myrtaceae ontogenetic pattern. The characteristics found in the ontogenetic development of androecia and gynoecia do not provide differences for the taxonomic re-circumscription of the forms. Abnormalities in the pollen grains were observed in the mature anthers. These were associated with high ploidy levels of the individuals and this is proposed considered the cause of low pollen viability. No evidences of meiosis were observed in the analyzed ovules. Neither apospory nor adventitious embryony evidences in the cytotypes were found. Diplospory with pseudogamy is proposed as an apomictically way for seed formation.

Keywords: arazá, native fruits, ontogeny, *Psidium*, reproductive biology.

1. INTRODUCCIÓN

Esta tesis analiza y describe el desarrollo de los órganos reproductivos florales de la especie frutal nativa *Psidium cattleianum* Sabine, para la forma típica *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* de frutos rojos y la forma *Psidium cattleianum* f. *lucidum* O. Deg. de frutos amarillos. Se prueba la hipótesis de que en la ontogenia de los órganos reproductivos se definen características que determinan o condicionan el modo de reproducción de una especie y se establecen características embriológicas de valor taxonómico. Los resultados obtenidos amplían el conocimiento del modo de reproducción de *Psidium cattleianum* y de su taxonomía.

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Sistemática, taxonomía y distribución de *Psidium cattleianum*.

El género *Psidium* L. pertenece a la subtribu Pimenta, tribu Myrteae, de la familia Myrtaceae (Lucas *et al.*, 2007). Comprende entre 50 y 100 especies nativas de América del Sur. La amplitud de este rango numérico se debe a la existencia de complejos de entidades que pueden considerarse una especie o un grupo de especies (Landrum, 2003). Crecen desde México y el Caribe hasta el norte de Argentina y Uruguay en el continente Americano (Landrum y Kawasaki 1997; Lucas *et al.* 2007) y se extiende a algunas islas del este del Océano Pacífico (Galápagos) (Landrum, 2003). Por otra parte *P. cattleianum* y *P. guajava* son especies invasoras problemáticas en algunas zonas tropicales y subtropicales del mundo como las islas Hawai, Tahiti, Mauricio, Florida y Norfolk (Koske y Gemma 2006, Ellshoff *et al.* 1995, Huenneke y Vitousek 1990).

En Uruguay crecen cuatro especies del género: *Psidium cattleianum* Sabine, *Psidium incanum* (O. Berg) Burret, *Psidium luridum* (Spreng) Burret y *Psidium pubifolium* Burret. Las últimas tres especies son sufrútices y alcanzan hasta un

metro de altura (Brussa y Grela, 2007). Según Landrum (2003) *P. incanum* y *P. luridum* pertenecen al complejo de especies *Psidium salutare* (Kunth).

1.1.1.1 *Psidium cattleianum*

Psidium cattleianum 'arazá' es un arbusto de 1.5-3 m de altura, que puede alcanzar hasta 10 m en el interior de bosques, tiene follaje denso y brillante, con tronco y ramas de corteza lisa, de color canela (Sobral 2003, Legrand 1968). Presenta flores solitarias, actinomorfas, bisexuales, pentámeras y de color blanco (Franzon *et al* 2009, Drehmer 2005); los elementos del perianto se encuentran libres en la flor, característico de algunas Myrtoideae (Landrum y Kawasaki 1997, Nic Lughadha y Proença 1996). El androceo es polistémono, con 250-480 estambres (Drehmer, 2005) insertos en varios ciclos en una ancha porción del hipantio, con filamentos filiformes y anteras globosas, de coloración amarilla (Nic Lughadha y Proença, 1996). El ovario es ínfero, generalmente 3-4 locular (2-5 locular en el género *Psidium*), pluriovulado, óvulos adheridos a una placenta proyectada en dirección al centro del lóculo, dispuestos en dos filas verticales (variando de 94 a 265 óvulos por ovario) (Drehmer 2005, Rasseira *et al.* 2004). El estilo es filiforme y el estigma capitado o peltado, seco (Landrum y Kawasaki 1997, Sanchotene 1989 citado por Rasseira *et al.*, 2004).

Los frutos son bayas carnosas de 2 a 3 cm de diámetro; existen individuos con frutos de pericarpo color amarillo o rojo (hasta violáceos). En base a esta diferencia en coloración y a algunos caracteres vegetativos Degener (1939) describió *Psidium cattleianum* f. *lucidum* O. Deg. para referirse a los materiales con frutos amarillos (figura 1a), característica que lo separa de la forma típica *P. cattleianum* f. *cattleianum* de frutos rojos (figura 1b).



Figura1. *Psidium cattleyanum*, formas amarillas y rojas en fructificación. a) *Psidium cattleyanum* f. *lucidum*. b) *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum*.

La distribución natural de *Psidium cattleyanum* abarca el litoral de Brasil, desde el estado de Espírito Santo hasta Río Grande do Sul, y llega a la zona serrana de Uruguay (Legrand 1968, Legrand y Klein 1977, Brussa y Grela 2007). Las referencias anteriormente citadas en Uruguay son referidas a materiales de ambas coloraciones de frutos. Recientemente, colectas realizadas por Speroni *et al.* (2012) y Bernaschina y Pereyra (2014) confirman la distribución en Uruguay para los departamentos de Cerro Largo, Treinta y Tres, y Rocha. Éstos también corroboran que las poblaciones naturales registradas en territorio nacional son escasas y corresponden a materiales de frutos amarillos, lo que significaría que el material de frutos rojos se encuentra solamente en condiciones de cultivo.

En las referencias bibliográficas no hay consistencia en el uso de las categorías taxonómicas infraespecíficas; por lo que es necesario aclarar que cuando se escribe *Psidium cattleyanum* se refiere a la especie en general. En los casos que se menciona *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* o *P. cattleyanum* var. *cattleyanum* se refiere a la misma entidad taxonómica con la característica de frutos de color rojo (categoría de frutos rojos). Del mismo modo ocurre con *Psidium cattleyanum* f.

lucidum o *P. cattleyanum* var. *lucidum* (categoría de frutos amarillos), en este caso sólo *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* es correcta (Tropicos.org, 2015). En este trabajo utilizo *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* para hacer referencia a la categoría de frutos rojos y *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* para hacer referencia a la categoría de frutos amarillos.

1.1.2 Usos e importancia económica y productiva de la especie

Psidium cattleyanum presenta un creciente interés productivo en la región debido a que sus frutos comestibles poseen buenas características para la comercialización fresca y la industrialización. Sus frutos han sido evaluados por sus propiedades nutraceuticas y se han encontrado cantidades significativas de compuestos fenólicos, antocianinas y carotenoides, que representan un beneficio para la salud incorporados a una dieta equilibrada (Fetter *et al.*, 2010).

La especie es también conocida popularmente por poseer propiedades medicinales (Campos, 2010). Sus aceites volátiles presentan alfa-pireno como compuesto principal, que tienen actividad anti-inflamatoria (Apel, 2001), expectorante y antimicrobiana (Raman *et al.*, 1995). Se ha comprobado su efecto bactericida sobre *Streptococcus mutans* bacteria involucrada en la aparición de caries (de Menezes *et al.* 2010, Brighenti *et al.* 2008)

Dentro de las especies nativas del sur del Brasil, estudiadas en el centro de investigación agropecuaria de clima templado (CPACT), ha sido elegida por los productores como la que presenta mayor potencial para el aprovechamiento a corto plazo (Franzon, 2004). Existen dos cultivares lanzados para la producción por la Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria de clima templado (Embrapa-CT): "Yaci" de frutos amarillos e "Irapuá" de frutos rojos (Rasseira *et al.*, 2004).

En Uruguay, *Psidium cattleyanum* fue incorporada al Programa de Selección de Frutas Nativas con potencial comercial, que llevan adelante la Facultad de Agronomía, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) desde el año 2000. En los jardines de

introducción de la Estación Experimental de la Facultad de Agronomía en Salto (EEFAS) y de la estación de INIA Las Brujas ha tenido buen desarrollo y buena sanidad, tanto en planta como en fruto. Esta especie junto con el guayabo del país (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret), es considerada como una de las especies de Myrtaceae más promisorias en sistemas de producción (Vignale y Bisio, 2005).

Contradictoriamente a esto último, *Psidium cattleyanum* es una especie invasora problemática en regiones tropicales donde se introdujo como cultivo frutal. Actualmente se ha convertido en una especie invasora debido a su alta tasa de germinación de semillas, la exitosa reproducción por raíces gemíferas y su asociación con micorrizas arbusculares (Huenneke y Vitousek 1990, Koske y Gemma 2006).

1.1.3 Morfología floral y características embriológicas en *Psidium cattleyanum*

Los estudios embriológicos en la familia y en el género son escasos y no existen hasta el momento para la especie estudios embriológicos que abarquen el desarrollo de los órganos reproductivos. A continuación se presentan algunas de las características halladas para la especie, para el género, para la subfamilia y la mayoría para la familia.

1.1.3.1 Androceo

Myrtoideae -ex subfamilia, referida a la actual tribu Myrteae (Lucas *et al.*, 2007) presenta anteras tetrasporangiadas, bitecas y de dehiscencia longitudinal (Nic Lughadha y Proença, 1996). El desarrollo de la pared de la antera y del saco polínico es del tipo básico en Myrtaceae, la epidermis de las anteras puede ser persistente o efímera, las capas intermedias son efímeras, el endotecio es fibroso y el tapete es glandular (Tobe y Raven, 1983). *Psidium* generalmente presenta más de dos glándulas en el tejido conectivo de la antera (Landrum y Kawasaki, 1997). El polen se libera en mónadas en Myrtoideae excepto en *Myrtus communis* L. y *Psidium cattleyanum*, donde hay una mezcla de mónadas y tétradas tetraédricas (Patel *et al.*, 1984). El número de granos de polen de *P. cattleyanum* varía de 750 a 1560 por

antera (Donadio *et al.*, 2002) y pueden presentar diferentes formas: triangular, esférica, oval o disforme (esta última probablemente no viable) (Rasseira y Rasseira, 1995). Los granos de polen son bicelulares en Myrtoideae (Nic Lughadha y Proença, 1996).

1.1.3.2 Gineceo

El ovario en las Myrtaceae es ínfero, la placentación en Myrtoideae es mayormente axial (Nic Lughadha y Proença, 1996), también puede ser basal, apical y parietal (Schmid, 1980). La mayoría de las Myrtoideae presentan un *compitum*, descrito como un pasaje que conecta los lóculos y se comunica con el estilo. En algunos géneros del grupo puede ser conspicuo llevando a la interpretación errónea de la placenta axial como parietal (Schmid, 1980).

Los óvulos en *Psidium* son anátropos, bitégmicos (Narayanaswami y Roy, 1960) y crasinucelados así como en la mayoría de las Myrtoideae, la única excepción es *Syzygium* que es unitegmentado (Nic Lughadha y Proença, 1996). El grosor de los tegumentos varía de un género a otro y en el tegumento externo tiende a incrementarse durante la ontogenia del óvulo en Myrtales (Tobe y Raven, 1983). La micrópila está formada por los dos tegumentos en Myrtoideae (Nic Lughadha y Proença 1996) y en *Psidium* suele ser en zigzag (Narayanaswami y Roy, 1960).

La tétrada de megásporas en *Psidium* y en Myrtaceae es lineal y la megáspora funcional es la chalazal; el saco embrionario que se forma a partir de ella es de tipo *Polygonum* (Narayanaswami y Roy 1960, Tobe y Raven 1983) y está constituido por dos sinérgidas, una oósfera, dos núcleos polares y tres antípodas. La singamia de los gametos y la fecundación de los núcleos polares ocurren simultáneamente en *Psidium* (Narayanaswami y Roy, 1960). El camino del tubo polínico es porógamo en *Psidium* (Narayanaswami y Roy, 1960) así como en Myrtaceae (Tobe y Raven, 1983).

1.1.4 Endospermogénesis y embriogénesis, morfología de la semilla y desarrollo del fruto.

El endosperma en *Psidium* es nuclear y la celularización comienza desde la región micropilar (Narayanaswami y Roy, 1960). Generalmente se digiere en el desarrollo del embrión y se describe como ausente en las semillas maduras en Myrtaceae (Tobe y Raven, 1983). No obstante, estudios de Petit (1908) citado por Nic Lughadha y Proença (1996) mostraron que restos de endosperma están presentes en semillas de varias Myrtaceae, incluyendo los géneros *Acca*, *Myrtus* y *Psidium*.

El tipo de embriogénesis en Myrtaceae es Onagráceo, con suspensor corto y macizo y embrión con dos cotiledones del mismo tamaño (Tobe y Raven, 1983). La estructura del embrión de Myrtaceae fue descrita por De Candolle (1828) citado por Nic Lughadha y Proença (1996) en tres tipos básicos: eugenoide (cotiledones gruesos, carnosos e hipocótilo relativamente insignificante), myrcioide (cotiledones foliosos, mucho más amplios que el hipocótilo) y myrtoide/pimentoide (con hipocótilo bien desarrollado y cotiledones relativamente pequeños); siendo esta distinción un carácter taxonómico de peso en la familia.

El embrión en *Psidium* es en forma de "C", siendo el hipocótilo más grande que los cotiledones (Landrum y Kawasaki, 1997). *Psidium cattleyanum* presenta embrión de tipo pimentoide, craso y curvado (Santos *et al.*, 2004). Los embriones de algunos géneros de Myrtoideae, entre ellos *Psidium*, presentan glándulas esquizógenas secretoras de aceites (Nic Lughadha y Proença, 1996).

Beardsell *et al.* (1993) consideran que la cubierta de la semilla formada por ambos tegumentos es una característica de muchas Myrtaceae, sin embargo los reportes de Myrtoideae muestran que se forma únicamente del tegumento externo (van Wyk y Botha 1984, Narayanaswami y Roy 1960). Las cubiertas de las semillas varían desde membranosas, coriáceas, cartilaginosas a óseas; la testa usualmente es lisa y no esculpida (Nic Lughadha y Proença, 1996). Las células de la cubierta de la semilla en *Psidium* son alargadas y densamente empaquetadas sin ningún patrón

particular, la superficie es áspera u opaca en apariencia (Landrum y Kawasaki, 1997). La germinación es epigea, fanerodicotiledonar (los cotiledones funcionan como primeras hojas fotosintetizantes) (Santos *et al.*, 2004).

El fruto típico de las Myrtoideae es carnosos, generalmente uni-seminado, usualmente naranja, rojo o morado. La ex subtribu Myrtinae (actualmente varios de sus géneros en el grupo Pimenta, entre ellos *Psidium*) incluye muchas especies con frutos verdes o amarillos con muchas semillas (Nic Lughadha y Proença, 1996). La mayoría de las especies de Myrtoideae presentan un número de semillas en los frutos mucho menor al número de óvulos del ovario, que potencialmente podríaan desarrollarse en semillas (Nic Lughadha y Proença, 1996). *P. cattleianum* presenta entre 16 y 100 semillas por fruto (Sanchotene 1989 citado por Rasseira *et al.*, 2004).

1.1.5 Citogenética de la especie

La familia Myrtaceae tiene un número cromosómico básico, bastante regular, de $x=11$. Las poliploidías reportadas a este número básico son: tetraploides en *Psidium*, *Eugenia*, *Syzygium*, *Baeckea* sens. lat., *Scholtzia*, *Hypocalymma*, *Calytrix*, *Leptospermum* y *Melaleuca*; hexaploides en *Eugenia* and *Syzygium*; octoploides en *Psidium*; decaploides en *Syzygium*. Triploides se han reportado en *Eugenia* y *Melaleuca* y pentaploides y heptaploides en *Psidium* (Wilson, 2011). En poblaciones brasileras de *Psidium* se han determinado materiales $2n=22, 44, 66, 77$ y 88 , no presentando éstos mayores diferencias morfológicas entre sí (Costa y Forni-Martins, 2006, 2007).

En *Psidium cattleianum* se han reportado distintos niveles de ploidía. Atchison (1947) encontró que ambas formas de la especie presentan un número total de 88 cromosomas. En tanto, resultados de Rasseira y Rasseira (1995) muestran variación en los números cromosómicos de diferentes ejemplares analizados, desde 55, 60, 66, 78, tanto de individuos de frutos rojos como amarillos y hasta 88 sólo en individuos de frutos rojos. De Souza *et al.* (2014) confirman la presencia de estos genotipos y agregan los números cromosómicos 44 y 82.

Estudios en materiales seleccionados en el Programa de Selección de Frutos Nativos de Uruguay encontraron que los individuos analizados de frutos rojos presentan 77 cromosomas mientras que los amarillos presentan 88 cromosomas (Vázquez *et al.*, 2014).

1.1.6 Biología reproductiva

1.1.6.1 Modo de reproducción

La mayoría de las especies de Myrtaceae hermafroditas tienen flores protándricas (maduración de la fase masculina antes que la femenina) (Beardsell *et al.*, 1993), lo que potencialmente implicaría dicogamia, sin embargo no siempre es así en Myrtoideae (Nic Lughadha y Proença, 1996). Si bien la polinización cruzada es el mecanismo más frecuente en Myrtaceae (Wilson, 2011) y en Myrtoideae (Proença y Gibbs, 1994), existen tanto especies autocompatibles como autoincompatibles en ambas (Wilson 2011, Nic Lughadha y Proença 1996), indicando que existen diversos mecanismos de compatibilidad en la familia.

Los reportes sobre el modo de reproducción de *Psidium cattleianum* son escasos y en algunos casos contradictorios. Tanto *P. c.* var. *cattleianum* como *P. c.* var. *lucidum* fueron reportadas como autoincompatibles por Cheyhiyan (1988), mientras que Teatonia *et al.* (1970) concluyen que *P. c.* var. *lucidum* es autofértil. Por otro lado Rasseira y Rasseira (1995) sugieren, de observaciones de producción de frutos en plantas aisladas, que la especie es autofértil. Asimismo reportan mayor producción de frutos en polinizaciones abiertas en diferentes variedades de *P. cattleianum*. Donadio *et al.* (2002) observó polinización cruzada y autoincompatibilidad en algunas variedades de la especie y reporta baja fructificación en autopolinización (12 a 26%). Estudios de Fidalgo y Kleinert (2009) concluyen que *P. cattleianum* es xenógama facultativa y que no produce frutos en ausencia de polinizadores, indicando la necesidad de un vector para la autopolinización.

Por otro lado se han encontrado distintas evidencias de apomixis como modo de reproducción. Se ha detectado escasa variabilidad en la descendencia obtenida por semilla, tanto en trabajos llevados adelante en materiales nacionales como brasileños (Vignale y Bisio 2005, Franzon 2004, Franzon *et al.* 2004, Morton 1987). Por otra parte Morton (1987) reporta que progenies de semillas de arazá rojo segregan ocasionalmente en hábito, tamaño de fruto y ausencia de semilla. En cambio, las progenies de semilla de arazá amarillo tienden a ser uniformes, lo cual estaría indicando posibles diferencias a nivel del sistema reproductivo entre ambas formas.

1.1.6.2 Apomixis

La apomixis fue definida por Winkler (1908) citado por Maheshwari (1950) como la sustitución de reproducción sexual por un proceso asexual que no involucra ninguna fusión nuclear. En ésta ocurre formación de semillas conteniendo embriones, provenientes de células gametofíticas o esporofitas del óvulo, sin ocurrencia de meiosis completa ni doble fecundación (Raghavan, 2006). Maheshwari (1950) establece tres vías recurrentes de apomixis: aposporia generativa o diplosporia, es la formación de saco embrionario diploide a partir de la célula arqueospórica y consecuente formación del embrión a partir de alguna de las células del saco embrionario no reducido; aposporia somática o aposporia, es la formación del saco embrionario diploide a partir de células del nucelo y consecuente formación del embrión a partir de las células del saco embrionario no reducido; y embrionía adventicia, los embriones se forman directamente a partir de células del nucelo o tegumento, sin formación previa de saco embrionario, en tanto se forma también el saco embrionario reducido donde puede ocurrir fecundación.

Davis (1966) reporta la apomixis como ocurrente en Myrtoideae, donde generalmente es apomixis por embrionía adventicia, aunque existe alguna evidencia indicando la posibilidad de aposporia (Nic Lughadha y Proença, 1996). Los reportes de poliembrionía en Myrtoideae refieren a varias especies de *Syzygium*, algunos incluyen a *Luma apiculata* (DC.) (Jonson 1936 citado por Nic Lughadha y

Proença, 1996), sin embargo en esta especie la poliembrionía no es constante (Nic Lughadha y Proença, 1996). Gurgel y Soubiher Soubriho's (1951) estudiando 16 especies fructíferas de Myrtaceae reportan poliembrionía para especies de *Syzygium* y *Plinia*.

Rye (1979) postula una correlación positiva entre la ocurrencia de apomixis en Myrtoideae y la alta frecuencia de poliploidía en este grupo, sin embargo sólo ejemplifica esto para *Syzygium jambos* Alston (citado como *Eugenia jambos*). Según Nic Lughadha y Proença (1996) la correlación podrá ser corroborada cuando se realicen suficientes conteos cromosómicos en otros géneros de Myrtoideae (*Syzygium*, *Plinia*, *Luma*) que han sido documentados como poliembriónicos.

En *Psidium cattleyanum* Manshardt y Aradhyta (1990) citado por Ellshoff *et al.* (1995) observaron una uniformidad muy alta en el análisis de isozimas de la progenie de tres plantas de *P. c. f. cattleyanum* y dos de *P. c. f. lucidum*. Consistentemente observaron un único patrón electroforético en la progenie que coincidía con el del pie materno, sugiriendo apomixis. Estudios preliminares de marcadores RAPDs en materiales de ambas formas taxónomicas cultivados revelan únicamente haplotipos maternos en la progenie (Clara Pristch, comunicación personal, 27 de febrero de 2015). Adicionalmente en estudios de Rasseira y Rasseira (1995) encontraron fructificación con formación de semillas en flores emasculadas sin polinizar, lo que indicaría que ocurre apomixis.

1.1.6.3 Viabilidad y germinación de polen

Los estudios de la viabilidad y geminación de polen en la especie han reportado valores bajos en varios individuos analizados, lo que también estaría condicionando su modo de reproducción. En estudios de Speroni *et al.* (2012) realizados sobre materiales cultivados se encontró baja viabilidad de polen en materiales de ambas formas: en *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* alcanzó un 42% y en materiales de *P. c. f. cattleyanum* resultó nula en varios individuos seleccionados. Adicionalmente análisis de germinación *in vitro* de granos de polen realizados en distintas variedades de la especie por Donadio *et al.* (2002)

encontraron valores promedios de 20%, la variedad con valores más altos que corresponde a *P. c. f. cattleyanum* presentó un 35% de germinación *in vitro*.

Hirano y Nakasone (1969) reportan un menor porcentaje de germinación de los granos de polen en citotipos de *Psidium* poliploides respecto a los diploides. Según Renner (1919) citado por Stanley y Linskens (1974) el nivel de ploidía también se relaciona con el tamaño del grano de polen. Esto va en consonancia con lo encontrado por Rasseira y Rasseira (1995) de que granos de polen de los individuos de frutos rojos son significativamente menores que los de frutos amarillos.

En el análisis de las formas de los granos de polen Rasseira y Rasseira (1995) encontraron números relativamente altos de anomalías: díadas, tríadas, políadas y tétradas, siendo lo más común la ocurrencia de tríadas; adicionalmente en anteras en fase de tétrada observaron células de tamaño desigual. Estos mismos autores analizaron el índice meiótico (porcentaje de tétradas normales) en materiales de ambas formas. El valor más alto encontrado fue de 65% (se considera 90% lo normal), con gran variación dentro de una misma población. Las plantas de frutos rojos presentaron siempre índices más bajos (Rasseira y Rasseira, 1995).

1.2 JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Justificación

Los antecedentes presentados muestran que existen importantes avances en el estudio de la embriología y modo de reproducción a nivel de familia y tribu (ex subfamilia), pero poco hay descrito sobre el género y menos aún sobre la especie. Estudios del desarrollo de los órganos reproductivos son una herramienta útil para contribuir a esclarecer aspectos importantes de la biología reproductiva. La ontogenia de los granos de polen, analizada en materiales con diferentes valores de viabilidad, puede contribuir a explicar los bajos porcentajes de viabilidad detectados en varios materiales. Del mismo modo, el análisis ontogenético del origen del saco embrionario puede esclarecer la vía de formación de los embriones y determinar si

existen procesos de apomixis que determinen la uniformidad de la descendencia obtenida por semilla.

Esta información, junto con los otros abordajes que se realizaron en el proyecto “Estudios biológicos y taxonómicos en la especie frutal nativa *Psidium cattleianum*” (CSIC I+D, 2010-2014), permitirá conocer el modo de reproducción de la especie y emplear esta información para programas de manejo y mejoramiento de la especie. Estos estudios además, constituyen una fuente de caracteres taxonómicos que aportarán a la confirmación de las entidades taxonómicas que crecen en territorio uruguayo.

1.2.2 Hipótesis de trabajo

En la ontogenia de los órganos reproductivos quedan definidas ciertas características que determinan o condicionan el modo de reproducción y definen caracteres taxonómicos morfológicos de una especie

En el caso de *Psidium cattleianum*, alteraciones en la formación de los granos de polen pueden afectar la viabilidad final de los mismos y su fertilidad, así como el origen del saco embrionario puede determinar la/s vía/s de formación sexual o asexual del embrión y el grado de su variabilidad genética de la descendencia.

1.2.3 Objetivos

1.2.3.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo es estudiar la ontogenia de las flores y primeras etapas del desarrollo de semillas y frutos en materiales seleccionados de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y *P. c. f. lucidum*, para interpretar algunos aspectos embriológicos que condicionan el modo de reproducción, aportar datos biológicos necesarios para instrumentar planes de manejo comercial e identificar caracteres embriológicos que contribuyan a la definición taxonómica de las entidades infraespecíficas descritas.

1.2.3.2 Objetivos específicos:

1. Describir el desarrollo del microsporangio, la microsporogénesis, microgametogénesis y formación de granos de polen en materiales de frutos rojos y amarillos de *Psidium cattleianum* para determinar si existen alteraciones que influyan en la viabilidad de los granos de polen.
2. Describir el desarrollo del megasporangio, la megasporogénesis, megagametogénesis y formación de saco embrionario en ambos tipos de materiales para establecer si ocurren procesos de apomixis.
3. Analizar y describir la fecundación, desarrollo de endosperma y embrión, hasta etapas iniciales de formación de semilla y fruto.
4. Analizar si existen diferencias entre los materiales seleccionados de frutos rojos y amarillos, en todos estos aspectos, que condicionen las características productivas o el modo de propagación y/o permitan establecer diferencias taxonómicas entre ambos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se emplearon individuos de *Psidium cattleianum* cultivados en la Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto (EEFAS), Uruguay (31°19'S; 57°41'W) y en la Estación Experimental Las Brujas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Canelones, Uruguay (34° 40'S; 56° 20'W). Estos son materiales seleccionados en base a características productivas y a datos existentes sobre la calidad de los frutos, el sabor, y las propiedades de los productos elaborados a partir de los mismos.

2.1 SELECCIÓN Y COLECTA DE MATERIALES

Se analizaron siete genotipos, tres de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* provenientes de la EEFAS y cuatro de *Psidium cattleianum* f. *lucidum*: dos provenientes de la EEFAS y dos provenientes del INIA. Los genotipos se eligieron teniendo en cuenta los siguientes criterios: coloración de fruto, para establecer si hay diferencias en el desarrollo y formación entre ambas formas; porcentajes de viabilidad de polen (utilizando cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio), para determinar si ésta se relaciona a la coloración del fruto o al genotipo; porcentaje de fructificación alto, por su interés productivo (datos publicados en Speroni *et al.*, 2012) (Tabla 1). En cuanto a este último aspecto, si bien en el individuo III7 el porcentaje de fructificación es bajo, la producción total del árbol es alta en general y es considerado un material interesante comercialmente.

Tabla 1. Individuos analizados de *Psidium cattleianum*. Características de cada genotipo.

Código del individuo	Estación Experimental	Coloración Frutos	Viabilidad de Polen (%)	Fructificación (%)
IV-1	EEFAS ¹	Rojo	14	62,39
III-7	EEFAS ¹	Rojo	0	1,77
IV3	EEFAS ¹	Rojo	0	35,61
III-5	EEFAS ¹	Amarillo	19,9	36,82
IV6	EEFAS ¹	Amarillo	21,98	62,22
24	INIA ²	Amarillo	24,96	35,04
61	INIA ²	Amarillo	47,41	103,28

¹Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto

²Estación INIA Las Brujas

Las colectas se efectuaron en la primavera del 2011 en EEFAS y en la primavera del 2012 en INIA Las Brujas. En cada individuo se colectaron flores en distintas etapas de desarrollo, desde estadios muy jóvenes previos a la antesis hasta el comienzo del cuajado del fruto (Apéndice tablas 1 y 2) con el propósito de captar todas las etapas de desarrollo de los órganos reproductivos de la flor. Las flores colectadas se fijaron en FAA (formol, ácido acético, alcohol 70%, 5:5:90) durante 24 horas (Johansen, 1940) y luego se almacenaron en alcohol 70% hasta su procesamiento.

En cada individuo se definieron, para su análisis, entre 10 y 12 estadios florales (dependiendo del individuo), que fueron caracterizados por su morfología externa y categorizados según la cantidad de días en relación a la antesis como “días previos a la antesis” (dpra) y “días posteriores a la antesis” (dpta). Los estadios florales se caracterizaron morfológicamente según el tamaño y la posición relativa de los verticilos florales (cáliz y corola fundamentalmente). Las figuras 2 y 3 muestran los estadios definidos con sus características para *Psidium cattleianum* f.

cattleyanum y *P. c. f. lucidum* respectivamente. Las medidas y las ilustraciones de los estadios florales se realizaron empleando un microscopio estereoscópico Nikon SMZ-10 con cámara clara.

2.2 PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

Las flores fueron procesadas de distintos modos para mejorar la infiltración hacia los óvulos: remoción mecánica (con hoja de afeitar) de la epidermis y el parénquima hipodérmico del hipantio en estadios más jóvenes, y aislamiento de óvulos, anteras y semillas en estadios más avanzados. El material fue deshidratado en una serie de alcoholes de graduación ascendente, utilizando toluol o alcohol butílico terciario como intermediario para su procesamiento con la técnica clásica de inclusión en parafina (Li, 1978). Se realizaron cortes seriados con micrótomo de rotación a un grosor de entre 7 y 10 μ m, y se montaron en porta-objetos de vidrio. Los cortes se colorearon con la doble tinción Safranina-Fast Green (Johansen, 1940), donde la lignina y el ADN se colorean de rojo (Safranina) y la celulosa de verde-azulado (Fast Green). Los cortes se montaron con bálsamo de Canadá.

Las anteras de todos los individuos se procesaron también con la técnica clásica de inclusión en resina plástica (Gerrits y Smid, 1983), previa deshidratación en graduación ascendente de alcoholes. Esta técnica se aplicó sólo a anteras dado que no permite hacer cortes seriados, sin embargo permite realizar cortes muy finos (hasta 1 μ m) que permiten analizar más detalles. Se obtuvieron cortes de 2 a 5 μ m de espesor con micrótomo semiautomático, se colorearon con azul de toluidina al 0,25% y se montaron en bálsamo de Canadá.

Los cortes resultantes de ambas técnicas se observaron con microscopio óptico Nikon E100. Los cortes seleccionados se analizaron, midieron y fotografiaron la cámara digital Dino Eye 2.0.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN LOS SACOS POLÍNICOS MADUROS

Se realizó una cuantificación de los sacos polínicos maduros según el estado de desarrollo de los granos de polen formados en su interior. Se distinguieron dos categorías: sacos polínicos con granos de polen normales y sacos polínicos con granos de polen anómalos (en este conteo se incluyeron todos los tipos de anomalías encontradas). Se contaron sacos polínicos totales por corte observado en los estadios 16 dpra y la suma de 8 dpra y 2 dpra. En cada corte se contabilizaron entre 10 y 40 anteras según la disponibilidad en el preparado de las cuales se podían observar los cuatro sacos polínicos o menor número de ellos según la orientación que disponían en el corte. Los cortes analizados se seleccionaron con una distancia tal que asegurara no repetir el mismo saco polínico. Para las comparaciones se utilizaron sólo los individuos de los que se pudieron contar más de seis cortes.

Se analizaron las variables SPN (número de sacos polínicos normales) y GRD (número de sacos polínicos con granos anómalos) utilizando un modelo lineal generalizado y se asumió una distribución binomial para ambas. Se compararon medias de individuos utilizando la prueba de formación de grupos excluyentes DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002), particionando por sitio y por estadio, y sólo por sitio; a fin de considerar si hay diferencias en lo encontrado entre los estadios en que ya se encuentra desarrollado el polen, pero no está abierta la flor. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05 para las pruebas realizadas. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

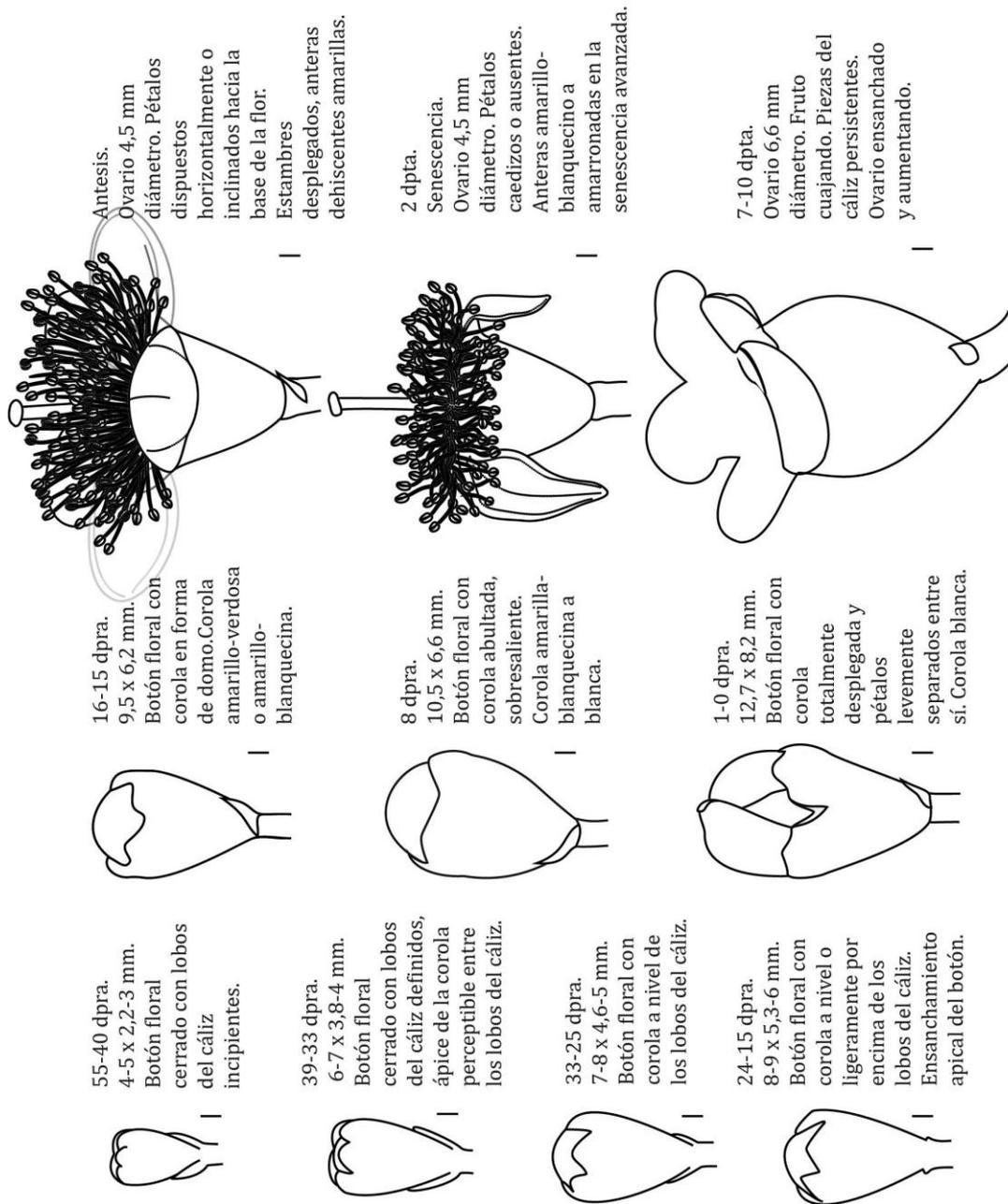


Figura 2. Estadios florales de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* analizados en este estudio. Descripción de morfología externa y promedios en milímetros del largo y el ancho de los botones florales. Referencias: *dpra*: días previos a la antesis; *dpta* días posteriores a la antesis. Barra 1 mm.

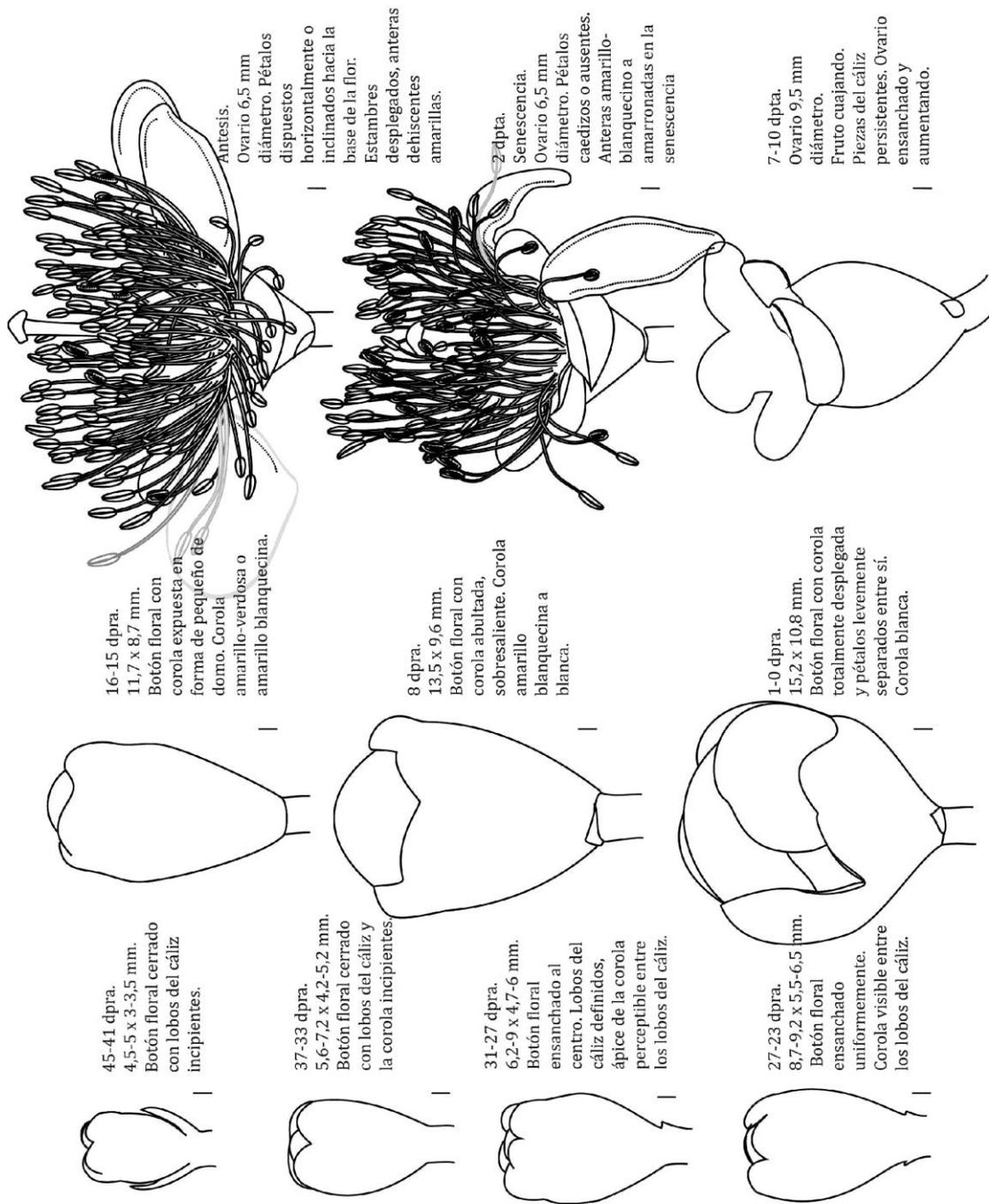


Figura 3. Estadios florales de *Psidium cattleyanum* f. *lucidum* analizados en este estudio. Descripción de morfología externa y promedios en milímetros del largo y el ancho de los botones florales. Referencias: dpra: días previos a la antesis; dpta días posteriores a la antesis. Barra 1 mm

3. RESULTADOS

La especie presenta una etapa de botón floral prolongado, el primordio floral se hace visible en la planta 55-45 días antes de la antesis. El desarrollo ontogenético de las flores en *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* se inicia primero que en *P. c. f. lucidum*. En el año de estudio en la EEFAS (2011), la floración de los materiales de frutos rojos comenzó 15 días antes que en los materiales de frutos amarillos (19-09-2011 vs 3-10-2011).

Ambas formas mostraron patrones ontogenéticos similares tanto de androceo como de gineceo. Las principales diferencias encontradas en este estudio fueron a nivel de tamaños celulares y tiempos de duración de las etapas de desarrollo. Los resultados de los estudios ontogenéticos que se presentan a continuación, se refieren a ambas entidades taxonómicas y se especifican las diferencias encontradas cuando corresponde.

3.1 PATRONES ONTOGENÉTICOS EN EL ANDROCEO

Los estambres poseen filamentos largos, tres a cuatro veces el largo de la antera, recubiertos por una epidermis de células cuadrangulares y con parénquima rodeando un haz vascular central (figura 4a). Las anteras son tetrasporangiadas con una epidermis simple de células rectangulares. Presentan un tejido conectivo central con células parenquimáticas de sección poligonal a redondeada, vacuoladas. Un único haz vascular llega hasta la zona apical proveniente del filamento (figura 4b). El parénquima del conectivo presenta drusas, probablemente de oxalato de calcio, más abundantes en estadios avanzados de desarrollo.

En la zona apical de la antera se ubica una glándula de forma globosa tapizada de células grandes que dejan un hueco interior. Estas células son poliédricas y se tiñen intensamente con safranina (figura 4c). En algunas anteras de desarrollo avanzado se observan procesos de lisis en las células (figura 4d).

En el desarrollo ontogenético de los microsporangios se reconocieron las etapas de formación del tejido esporógeno, células madres de micrósporas, microsporas, y granos de polen, para ambas formas. En cada etapa se describe también el desarrollo de las paredes del saco polínico.

3.1.1 Desarrollo del microsporangio y microsporogénesis

3.1.1.1 Tejido esporógeno

La formación de los sacos polínicos comienza desde los 55-47 dpra en *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 45-38 dpra en *P. c. f. lucidum*. En todos los casos se observó una duración aproximada de esta etapa de 14 días. Las paredes de las anteras se desarrollan a partir de las dos capas parietales secundarias (figura 4e) que se dividen periclinalmente para incrementar el número de capas celulares. La capa parietal secundaria externa originará el endotecio y una de las capas intermedias. La capa parietal secundaria interna originará el tapete y la otra capa intermedia (figura 4f). Al mismo tiempo que se diferencian las capas parietales del saco polínico, en el centro del lóculo se diferencian las células esporógenas primarias, de citoplasma denso, con núcleos grandes y nucléolos notorios, que forman un tejido compacto sin espacios intercelulares (figuras 4e y 4f).

3.1.1.2 Células madre de las Microsporas

La diferenciación de las células madres de microsporas (cmm) abarcó un período de 8 a 14 días en los individuos de *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y 6 a 7 días en los individuos de *P. c. f. lucidum*. A partir de este estadio de desarrollo se observa una asincronía de los eventos de desarrollo entre las anteras de una misma flor e incluso entre los sacos polínicos de una misma antera.

La epidermis no presenta divisiones celulares que acompañen el aumento de volumen en el crecimiento del saco polínico, y las células se van estirando, tornándose alargadas. Las capas constitutivas de las paredes de los sacos polínicos comienzan la diferenciación celular (figuras 5a y 5b). El endotecio consiste en una

capa única de células de sección cuadrada-rectangular. Las capas intermedias presentan dos capas de células rectangulares alargadas. El tapete está formado por una capa simple de células grandes de sección rectangular-poligonal, citoplasma denso, núcleo grande, que está en contacto directo con las células madres de microsporas en el interior de los sacos polínicos (figura 5a). A medida que las cmm se desarrollan, los núcleos del tapete sufren mitosis sin citocinesis para dar un tapete con células binucleadas (figura 5b).

Las células esporógenas se multiplican y se diferencian en células madre de la micróspora a partir de los 41-33dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 31-27dpra en *P. c. f. lucidum*. Estas son células grandes con núcleos de gran tamaño en relación al tamaño de la célula (figura 5a). Los tamaños de los núcleos están entre 10,6 -12,6 μm en *P. c. f. cattleyanum* y 11,6- 14,7 μm en *P. c. f. lucidum*. Se comienza a depositar la calosa alrededor de las cmm, que se tiñe de celeste con Fast Green (figura 5b). En las células con pared de calosa desarrollada, el contenido nuclear muestra signos de condensación de los cromosomas (figura 5c). Se observaron filamentos condensados o la totalidad del contenido nuclear condensado (figura 5d).

3.1.1.3 Microsporas

Cuando ocurre la microsporogénesis en el lóculo del saco polínico, la epidermis de la antera se encuentra mayormente aplastada (figura 6a). Las células del endotecio aumentan en altura y ya presentan la deposición de los espesamientos típicos de la pared celular. Las capas intermedias se encuentran colapsadas en la mayoría de los sacos polínicos (figura 6a). Las células del tapete se separan y sus paredes celulares comienzan a degenerarse (figura 6a) al mismo tiempo que comienza a disolverse la calosa. En esta etapa se observan corpúsculos pequeños en toda la superficie de las células del tapete con aspecto de orbículas (cuerpos de Ubisch) (figura 6b).

Las células madres de microsporas presentan meiosis con citocinesis simultánea. Esto comienza a los 33-21 dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum*

y los 25-23 dpra en *P. c. f. lucidum*. Inicialmente se forman tétradas tetraédricas de núcleos libres (figura 6c) y luego ocurre la citocinesis para dar las cuatro microsporas (figura 6d). Luego de formadas las cuatro células, la calosa continúa rodeándolas hasta que comienza a disolverse dejando a las microsporas libres en el saco polínico (figura 6e). Las microsporas libres poseen paredes gruesas y se observan tanto esporas turgentes como esporas con clara pérdida de turgencia (figura 6f).

3.1.2 Granos de polen

Los granos de polen se encuentran formados entre los 16 dpra y 8 dpra en todos los individuos y las paredes del saco polínico llegan a su máximo desarrollo a los 8 dpra. Las células del endotecio son altas y alcanzan su máximo tamaño, presentan espesamientos visibles de tipo fibroso, como rayos paralelos a las paredes radiales de la célula (figura 7a). Las capas intermedias y el tapete se desintegraron completamente. En la zona de unión de los sacos polínicos las células del endotecio no tienen espesamientos desarrollados, constituyendo el estomio (figura 7b).

Los granos de polen maduros son bicelulares. Están formados por la célula vegetativa, con núcleo generalmente central y cuyo citoplasma ocupa la mayor parte del grano, y la célula generativa, más pequeña y con forma lenticular (figura 7c). Los granos de polen presentan diferentes formas: esféricos, ovalados o triangulares (figuras 7c y 7d) y también amorfos. En los granos triangulares se observan tres colporos. En los demás morfos no se identificó claramente la cantidad de colporos.

3.1.3 Anomalías en el desarrollo de los granos de polen

En las anteras maduras, a partir de los 8 dpra, se observaron varios sacos polínicos con desarrollos anormales de los granos de polen. Estos fueron encontrados en la mayoría de los individuos, aunque con mayor frecuencia se

observaron en los individuos de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum*. En todos los casos el endotecio mostró desarrollo normal con espesamientos fibrosos, independientemente del comportamiento del contenido interno (figura 8 a, b, c).

Se registraron sacos polínicos que, en 8 dpra, mantenían las células madre de microsporas. En el lóculo de estos sacos polínicos se observaron cmm cubiertas de calosa y con el contenido celular retraído, rodeadas por restos de tapete (figura 8a). También se registraron tétradas de esporas con paredes gruesas y contenido retraído o totalmente vacía en su interior (figura 8b). Otra anomalía detectada fueron los grupos de células con paredes gruesas, formando una aglomeración en el lóculo del saco polínico (figura 8c). También se encontraron granos de polen deformes y/o vacíos (figura 8c y 8e) o células madres rodeadas de un esporoderma típico de granos de polen (figura 8d).

3.1.3.1 Cuantificación de sacos polínicos con contenidos anómalos

En el estadio 16 dpra sólo se compararon el individuo IV1 con el III7. El primero de ellos presenta una proporción de sacos polínicos normales significativamente mayor que el segundo (Tabla 2, A). En los estadios 8dpra-2dpra, el individuo IV6 presentó la mayor proporción de sacos polínicos con desarrollo normal, seguido por los individuos III7 y IV3 (Tabla 2, B). Comparando la proporción de sacos con granos de polen anómalos, el individuo IV3 fue el que presentó mayor proporción de sacos polínicos con granos de polen anómalos, seguido del individuo III7. El material que presentó menor proporción de sacos polínicos con granos de polen anómalos fue IV6 (Tabla 2, B).

De los individuos de la estación INIA, el individuo 61 mostró la mayor proporción de granos de polen normales. No se encontró efecto significativo del individuo sobre la proporción de sacos polínicos con granos de polen anómalos (Tabla 2, C).

En la partición por sitio, el individuo IV6 continúa presentando la mayor proporción de sacos polínicos con desarrollo normal y le sigue IV1. Los individuos IV3 y III7 presentaron los valores medios más bajos, no diferenciándose

significativamente entre sí (Tabla 2, D). En las medias de sacos polínicos con granos de polen anómalo se observó un comportamiento similar a lo encontrado en la partición por sitio y por estadio, se agrega que IV1 no se diferencia de III7 (Tabla 2, D).

Tabla 2. Comparación proporciones de sacos con granos de polen normales y sacos con granos de polen anómalos por Individuo.

Partición por sitio y por estadio				Partición por sitio			
A) EEFAS 16dpra				D) EEFAS			
Sacos con granos de polen normales				Sacos con granos de polen normales			
<u>Individuo</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>		<u>Individuo</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>	
IV1	0,73	0,02	A	IV6	0,79	0,02	A
III7	0,27	0,03	B	IV1	0,71	0,02	B
				IV3	0,44	0,02	C
				III7	0,41	0,02	C
B) EEFAS 8-2 dpra				Sacos con granos de polen anómalos			
Sacos con granos de polen normales				Individuo Media E.E.			
<u>Individuo</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>		IV3	0,46	0,02	A
IV6	0,79	0,02	A	IV1	0,28	0,02	B
III7	0,55	0,03	B	III7	0,28	0,02	B
IV3	0,44	0,02	C	IV6	0,20	0,02	C
Sacos con granos de polen anómalos				Individuo Media E.E.			
<u>Individuo</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>		IV3	0,46	0,02	A
IV3	0,46	0,02	A	III7	0,34	0,03	B
III7	0,34	0,03	B	IV6	0,20	0,02	C
IV6	0,20	0,02	C				
C) INIA 8-2dpra				Individuo Media E.E.			
Sacos con granos de polen normales				61 0,78 0,02 A			
<u>Individuo</u>	<u>Media</u>	<u>E.E.</u>		24 0,65 0,02 B			
61	0,78	0,02	A				
24	0,65	0,02	B				

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

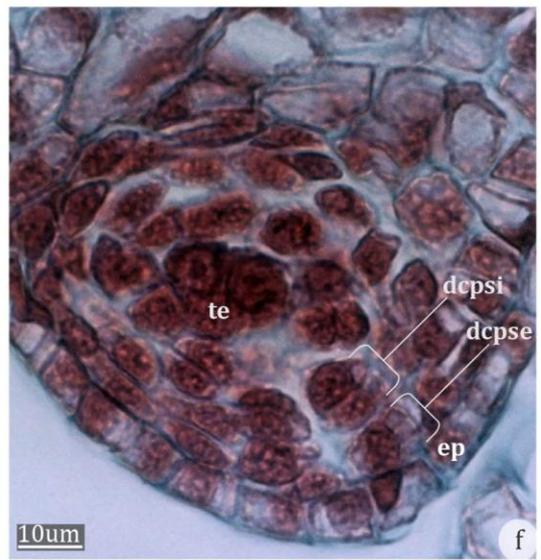
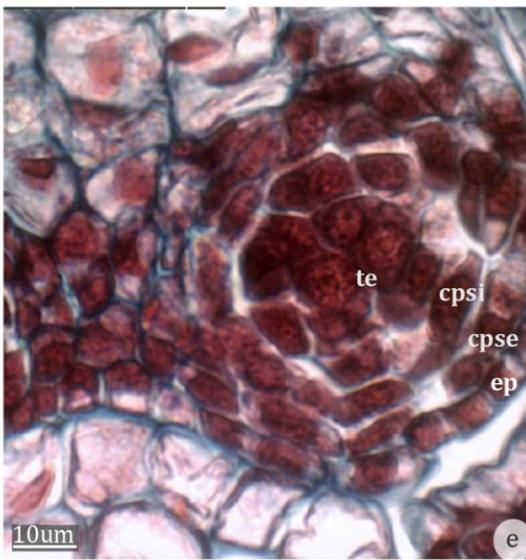
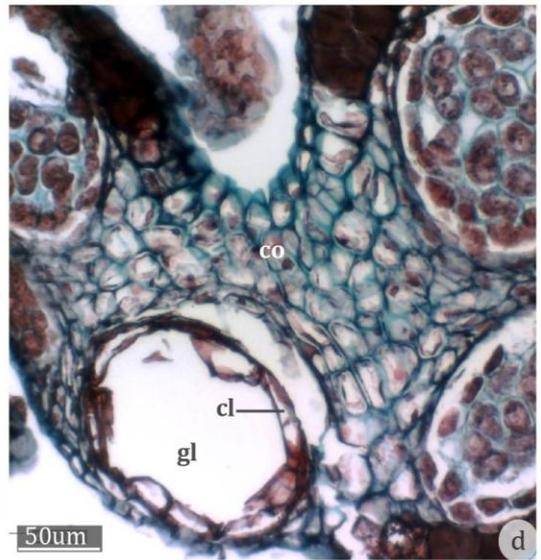
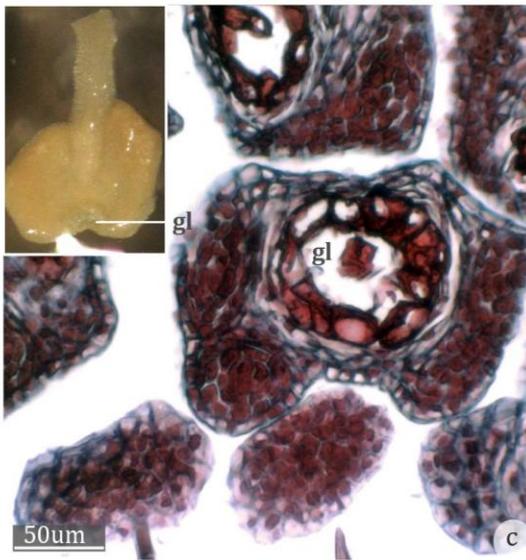
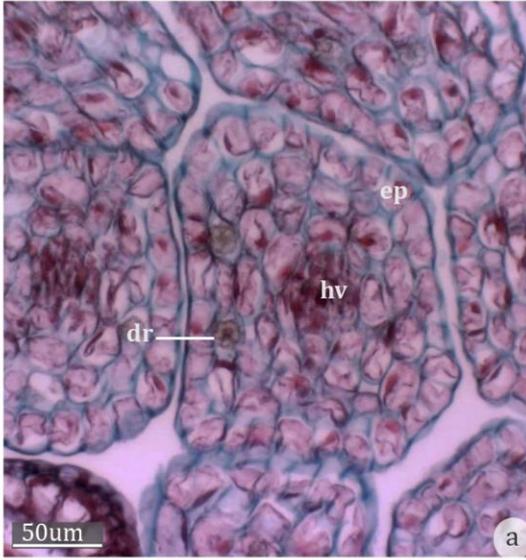


Figura 4. Ontogenia del androceo de *Psidium cattleianum*, tejido esporógeno y formación de las paredes del saco polínico. a) Corte transversal de filamentos de anteras, *P. c. f. cattleianum* (IV1). b) Antera tetrasporangiada, *P. c. f. lucidum* (24). c) Vista externa y corte de una antera joven con glándula apical, *P. c. f. cattleianum* (IV3). d) Glándula con células en procesos de lisis en antera con desarrollo avanzado, *P. c. f. cattleianum* (IV3). e) Corte transversal de un saco polínico joven con capas parietales secundarias y tejido esporógeno, *P. c. f. cattleianum* (IV1). f) Corte de saco polínico con capas parietales en división, *P. c. f. lucidum* (24). (co, tejido conectivo; cl, células lisadas; cpse, capa parietal secundaria externa; cpsi, capa parietal secundaria interna; dcpse, división de la capa parietal secundaria externa; dcpsi, división de la capa parietal secundaria interna; dr, drusas de oxalato de calcio; ep, epidermis; gl, glándula apical; hv, haz vascular; spol, saco polínico; te, tejido esporógeno).

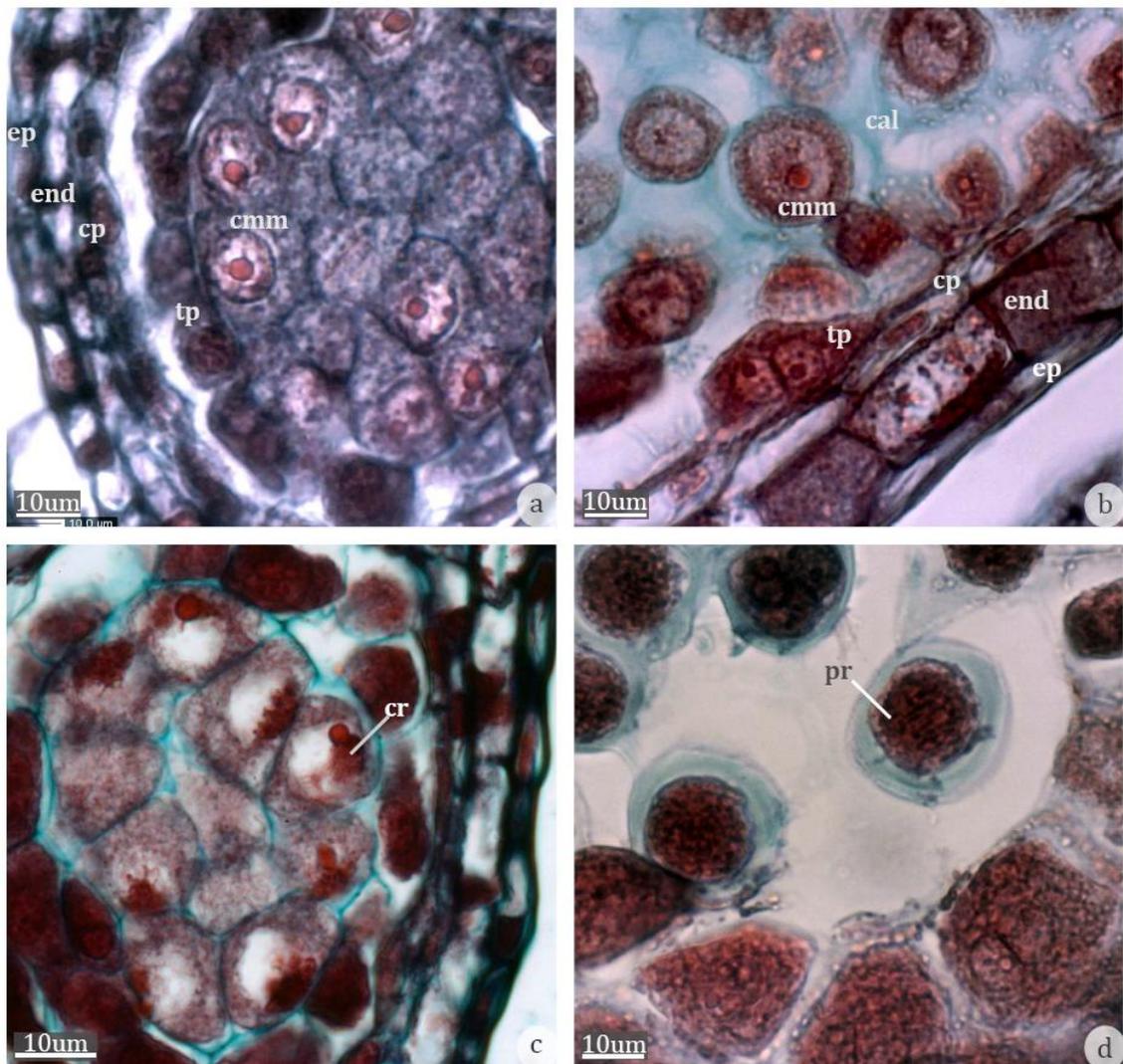


Figura 5. Ontogenia del androceo de *Psidium cattleianum*, células madre de la micróspora y paredes del saco polínico. a) Corte transversal de saco polínico con paredes en diferenciación, *P. c. f. lucidum* (III5). b) paredes de saco polínico diferenciadas, células madre rodeadas de calosa, *P. c. f. lucidum* (IV6). c) Saco polínico con células madre de la micróspora con condensación de cromosomas, *P. c. f. lucidum* (III5). d) Saco polínico con células madre de la micróspora en profase meiótica, *P. c. f. lucidum* (24). (cal, calosa; cmm, células madre de la micróspora; cp, capas medias; cr, cromosomas condensados; end, endotecio; ep, epidermis; pr, células madre la micróspora en profase meiótica; tp, tapete).

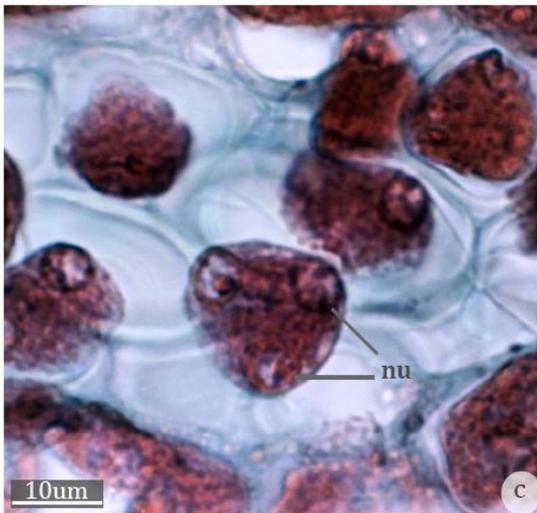
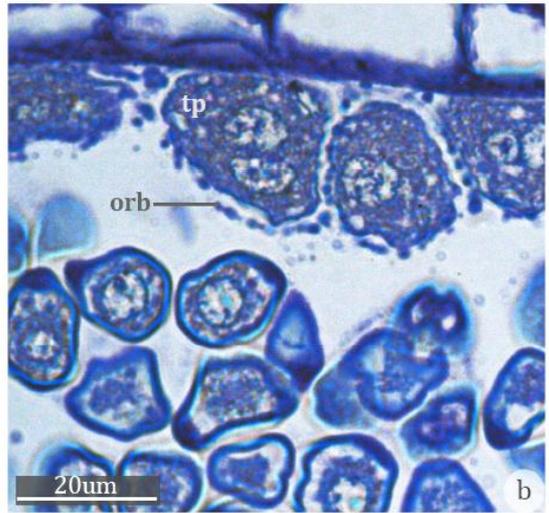


Figura 6. Ontogenia del androceo de *Psidium cattleianum*, microsporogénesis y micrósporas. a) Paredes del saco polínico en etapa de microsporogénesis, *P. c. f. lucidum* (24). b) Tapete con paredes disueltas y presencia de orbículas, *P. c. f. cattleianum* (IV1). c) Formación de tétradas de núcleos previo a citocinesis, *P. c. f. cattleianum* (IV1). d) Tétradas de micrósporas rodeadas de calosa, *P. c. f. cattleianum* (IV1). e) Micrósporas libres en el saco polínico, *P. c. f. cattleianum* (IV1). f) Micrósporas con pérdida de turgencia en el saco polínico, *P. c. f. lucidum* (IV6). (cal, calosa; cp, capas medias; end, endotecio; ep, epidermis; micr, micrósporas; nu, núcleos resultante de la meiosis; orb, orbículas; tp, tapete).

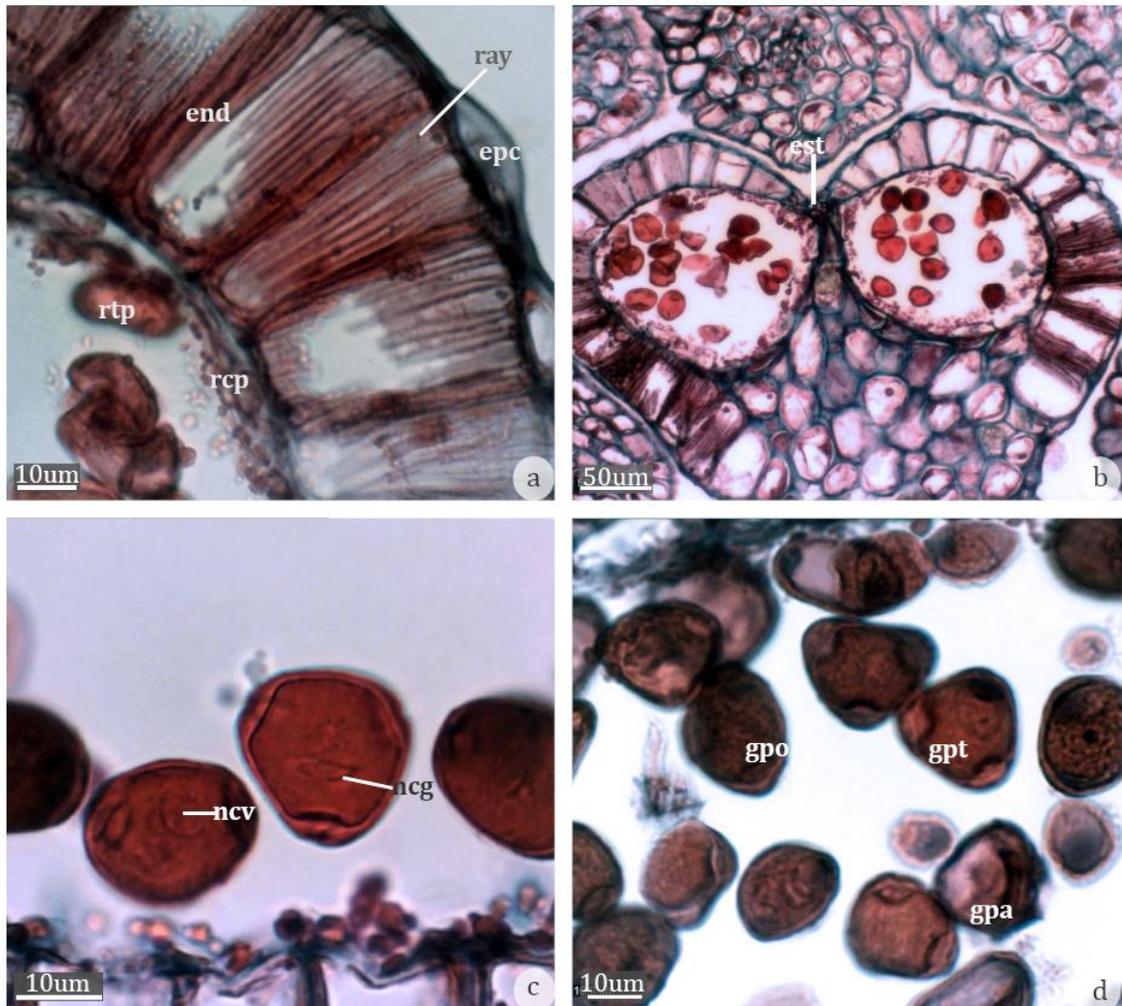


Figura 7. Ontogenia del androceo de *Psidium cattleyanum*, fin del desarrollo de la paredes del saco polínico y formación de granos de polen. a) Detalle del endotecio de tipo fibroso, *P. c. f. cattleyanum* (IV1). b) Teca con dos sacos polínicos evidenciando estomio, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). c) Granos de polen bicelulares, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). d) Morfología de los granos de polen, *P. c. f. cattleyanum* (III7). (end, endotecio; epc, epidermis colapsada; est, estomio; gpa, granos de polen amorfos; gpo, granos de polen de forma ovalada; gpt, granos de polen triangulares; ncg, núcleos de célula generativa; ncv, núcleos de célula veg vegetativa; ray, rayos de espesamiento fibroso; rcp, restos de capas medias; rtp, restos de tapete).

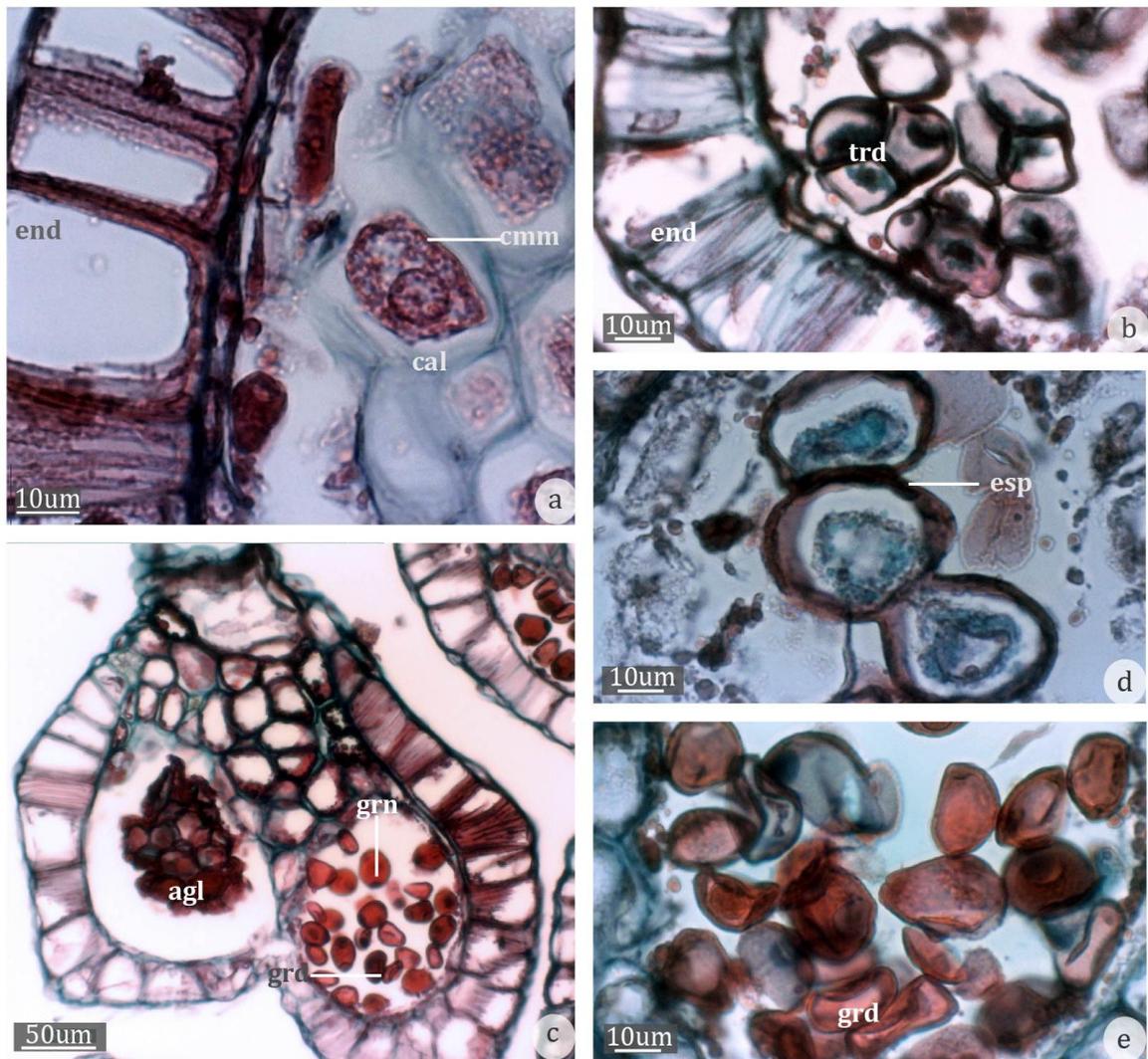


Figura 8. Ontogenia del androceo de *Psidium cattleianum*, anomalías encontradas en la formación de granos de polen a) Saco polínico de anteras maduras con células madre de la micróspora rodeadas de calosa, *P. c. f. cattleianum* (IV3). b) Saco polínico de anteras maduras con tétradas irregulares de aspecto colapsado, *P. c. f. cattleianum* (IV1). c) Saco polínico, izquierdo, con aglomeración de células, saco, derecho, con granos de polen normales y amorfos, *P. c. f. cattleianum* (III7). d) Detalle de células madre rodeadas de esporodermo, *P. c. f. lucidum* (24). e) Granos de polen deformes, *P. c. f. cattleianum* (IV1). (agl, aglomeración de células de pared gruesa; cal, calosa; cmm, células madre de la micróspora; end, endotecio; esp, esporodermo; grd, granos de polen deformes; grn, granos de polen normales; trd, tétradas irregulares

3.2 PATRONES ONTOGENÉTICOS EN EL GINECEO

El ovario es tetralocular, a veces pentalocular, en ambas formas de la especie. La epidermis externa de los carpelos es uniseriada, con células rectangulares de paredes delgadas y capa subepidérmica de células de igual aspecto, pero más altas en el plano de corte observado (figura 9a). La epidermis interna de los carpelos presenta células cuadrangulares de similares características. A medida que se desarrolla la flor las células epidérmicas externas e internas se alargan y las células subepidérmicas se tornan isodiamétricas, como el resto de las células parenquimáticas (figura 9b).

En toda la superficie del ovario se encuentran glándulas subepidérmicas globosas, con el interior hueco y tapizado por una capa continua de células. Estas células son de forma ovada-alargada con una vacuola que ocupa gran parte de ellas; las paredes y el citoplasma se observan teñidos densamente con Safranina (figura 9a). También se encuentran con frecuencia células en procesos de lisis, con restos de citoplasma en el interior de la glándula (figura 9b).

El parénquima del mesófilo de los carpelos posee células ovadas irregulares a isodiamétricas, de 14-22 μm de diámetro, con una gran vacuola (figura 9a). Por la base de la flor ingresan ocho haces vasculares que se ramifican en el mesófilo de los carpelos. En todo el parénquima se encuentran drusas dispersas de oxalato de calcio (figura 9a). Estas estructuras se hacen más numerosas en los estadios de desarrollo cercanos y posteriores a la antesis. En estos estadios también comienzan a aparecer en el parénquima, grupos de esclereidas que se incrementan con el cuajado del fruto (figuras 9c y 9d).

El estilo presenta una epidermis uniseriada y un parénquima de células isodiamétricas, con características anatómicas similares a las descritas anteriormente para el ovario (figura 9e). En el estilo también se encuentran las glándulas subepidérmicas. En el centro del estilo se observan haces vasculares alrededor de un tejido de trasmisión. El tejido de trasmisión ocupa un cilindro central continuo desde el estigma hasta el ovario, presenta células de paredes

gruesas teñidas de Fast green (figura 9e) y en algunos cortes se observa un canal central, perceptible a distintas alturas según la sección observada (figura 9f). El estigma posee células glandulosas de citoplasma denso, que se tiñen intensamente con safranina (figura 9f).

En la porción apical del ovario se observa un *compitum*, canal que comunica los carpelos entre sí. Se localiza en la base del estilo, sobre la región de unión de los carpelos y se continúa hasta los lóculos (figura 10a). El *compitum* está tapizado internamente por células epidérmicas aplanadas y el centro está ocupado por células de paredes gruesas y densamente teñidas de Fast green, similares a las presentes en el tejido de transmisión del estilo (figura 10b). En la zona del *compitum* más cercana a los lóculos de los carpelos, se observan verdaderos canales de comunicación, posiblemente formados por desintegración de las células centrales, dada la evidencia de los restos citoplasmáticos en su interior (figura 10c).

La placentación es axial y la placenta protruye en la cavidad del lóculo formando una estructura peltada (figura 10d). La epidermis de la placenta es uniseriada con células cuadrangulares y las células parenquimáticas son isodiamétricas (figura 10e). Las capas hipodérmicas presentan drusas de oxalato de calcio, que se hacen más numerosas en los estadios de desarrollo cercanos y posteriores a la antesis (figura 10f). Los óvulos se disponen en dos filas a cada lado de la placenta en el lóculo (figuras 10e y 10d).

3.2.1 Formación de los óvulos y megasporogénesis

3.2.1.1 Desarrollo del megasporangio

Los óvulos comienzan a desarrollarse entre los 55-41 dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 41-36 dpra en *P. c.* f. *lucidum*. Inician su formación como pequeños apéndices de nucela, con unas pocas capas celulares de espesor, de células poliédricas con citoplasma denso y núcleos grandes en relación al tamaño total de la célula (figura 11a). En la base de la nucela se comienzan a desarrollar los tegumentos. Estos se manifiestan como pequeñas prominencias basales, con

divisiones mitóticas anticlinales y periclinales de la capa protodérmica del primordio del óvulo. El tegumento interno tiene un desarrollo más avanzado que el tegumento externo.

Los óvulos son anátropos, bitégmicos y crasinucelados y alcanzan su desarrollo entre los 27-19 dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 20-16 dpra *P. c. f. lucidum* (figura 11b). El tegumento externo y el interno presentan dos capas de espesor cada uno. El tegumento externo puede presentar tres o cuatro capas en el extremo micropilar formando un exostoma de mayor volumen. La vascularización llega por el rafe hasta la chalaza y no se extiende hacia los tegumentos (figura 11c). En esa región de la chalaza, las células poseen citoplasma más denso y se tiñen intensamente con safranina (figura 11c). La micrópila se forma con los dos tegumentos desfasados y adopta la forma en zigzag (figura 11b). En el óvulo desarrollado, la nucela ha duplicado la cantidad de capas de espesor y las células de la epidermis externa del tegumento externo incrementan su longitud radial (figura 11b). Los óvulos continúan aumentando de tamaño hasta el desarrollo completo del saco embrionario.

3.2.1.2 Megasporogénesis

La célula madre de megásporas (CMM) se forma a partir de una única célula esporogénica visible en las primeras etapas de desarrollo del óvulo (figura 11a). La CMM se observa entre los 36-30 dpra en todos los individuos analizados, en el momento en que los tegumentos han sobrepasado la mitad de nucela (figura 11d). Esta se sitúa en el centro de la nucela, tres o cuatro capas de células por debajo de la epidermis nucelar. Inicialmente, la CMM es isodiamétrica a alargada, con núcleo de 8 a 10 μm de diámetro en ambas formas y nucléolo prominente; y se encuentra a la misma profundidad que la célula esporogénica que la generó (tres o cuatro capas por debajo) (figura 11d).

La CMM aumenta de tamaño y comienza a alargarse, entre los 27 y 16 dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 23 y 16 dpra en *P. c. f. lucidum* mientras continúa el desarrollo del óvulo. El núcleo, en esta etapa, se posiciona en el polo

micropilar de la célula (figura 11e). A medida que la CMM se alarga, ocurren divisiones mitóticas de las capas superficiales de la nucela que posicionan a la CMM a 5 o 6 capas celulares de profundidad con respecto a la micrópila (figura 11e).

Luego del alargamiento de la CMM no se observaron indicios de meiosis, ni tétradas de megásporas en la mayoría de los óvulos analizados. Se encontraron varios óvulos con una CMM alargada, algunas de éstas con condensación del ADN nuclear (figura 12a). En algunos óvulos se observaron dos células, formando una díada (figura 12b). Solamente uno de los óvulos analizados presentó rastros de otras células degradadas (figura 12c). En todos los casos el núcleo mantiene la posición micropilar.

Cuando el óvulo alcanza su mayor desarrollo, 16pra en todos los individuos analizados, se observa una célula ubicada en posición chalazal dentro en su interior y a más de 7 capas de células nucelares de profundidad (figura 11c). Estas células nucelares forman una hilera ordenada por debajo de la micrópila. La célula de posición chalazal es alargada y su núcleo mantiene el mismo diámetro que la CMM, con posición micropilar o central en la célula. En algunos óvulos analizados se observa la condensación del ADN nuclear, como preparación para la mitosis y megagametogénesis (figura 12d).

3.2.2 Megagametogénesis:

3.2.2.1 Formación de Saco embrionario

El saco embrionario comienza a formarse entre los 27-19 dpra en *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y los 23-16 dpra en *P. c. f. lucidum*. La célula tipo megáspora ubicada en la zona chalazal inicialmente se agranda y aplasta a las células circundantes (figura 13a). Posteriormente se observa una gran vacuola que desplaza el núcleo hacia un costado, y se observan divisiones mitóticas sucesivas (figuras 13b, 13c, 13d) que distribuyen a los núcleos resultantes en dos grupos ubicados en los polos micropilar y chalazal (figuras 13e, 13f). La región circundante al saco embrionario en formación presenta células aplastadas y con signos de

degradación (figura 13f). El desarrollo de los sacos embrionarios no es sincrónico en todos los óvulos de una misma flor.

El saco embrionario es de tipo *Polygonum* con 8 núcleos y 7 células (figura 14a). Este consta de tres antípodas, dos núcleos polares y un aparato oosférico con dos sinérgidas y una oósfera. Las antípodas persisten hasta los primeros estadios postantesis. Los núcleos polares se distinguen por su gran tamaño y el nucléolo prominente (figura 14b). Algunos sacos embrionarios analizados mostraron 3 núcleos polares en la célula media (figura 14c). En las sinérgidas se distingue el aparato filar en el extremo micropilar de las células por su intensa coloración con Fast-Green (figura 14d). La oósfera presenta una vacuola que desplaza al citoplasma y al núcleo hacia la célula media (figura 14e). En muchos óvulos no fue posible distinguir el aparato oosférico por presentarse colapsado y densamente teñido con safranina (figura 14f)

3.2.3 Fecundación y etapas iniciales de la formación de semilla

Luego de la antesis (2dpta) los óvulos comienzan a mostrar signos de desarrollo de semillas. Aumentan su tamaño general y el tegumento externo muestra mayor desarrollo de las células epidérmicas externas (figura 15a). A los 7-10 dpta se observa una semilla inmadura, con gran desarrollo del tegumento externo y con mayor número de capas celulares (figura 15b). El tegumento interno y nucela no aumentan el número de capas de espesor y paulatinamente van adelgazándose. Las semillas sin desarrollar mantienen su estructura debido a la consistencia proporcionada por el tegumento externo, mientras que el tegumento interno y la nucela colapsan (figura 15c).

Las antípodas persisten en estadios postantesis (hasta 2 dpta) en algunos de los óvulos. Los núcleos polares migran y se posicionan junto al aparato oosférico. En algunos casos están fusionados y presentan nucléolos de distinto tamaño (figura 15d). El aparato oosférico aparece intacto en algunos óvulos y totalmente degradado en otros.

3.2.3.1 Endosperma y Cigoto

En semillas inmaduras de 7 a 10 dpta, el endosperma ya comenzó su desarrollo con divisiones nucleares libres, que dan como resultado una masa de núcleos grandes, multinucleolados (figuras 16a y 16b). En el extremo micropilar de la semilla se encuentra una célula isodiamétrica con una gran vacuola y de núcleo prominente. Esta célula similar en morfología a la oósfera, pero de hasta dos veces su tamaño, correspondería al cigoto si ocurrió fecundación (figura 16c). En algunas de estas células se observan dos nucléolos de tamaño similar o diferente (figura 16d).

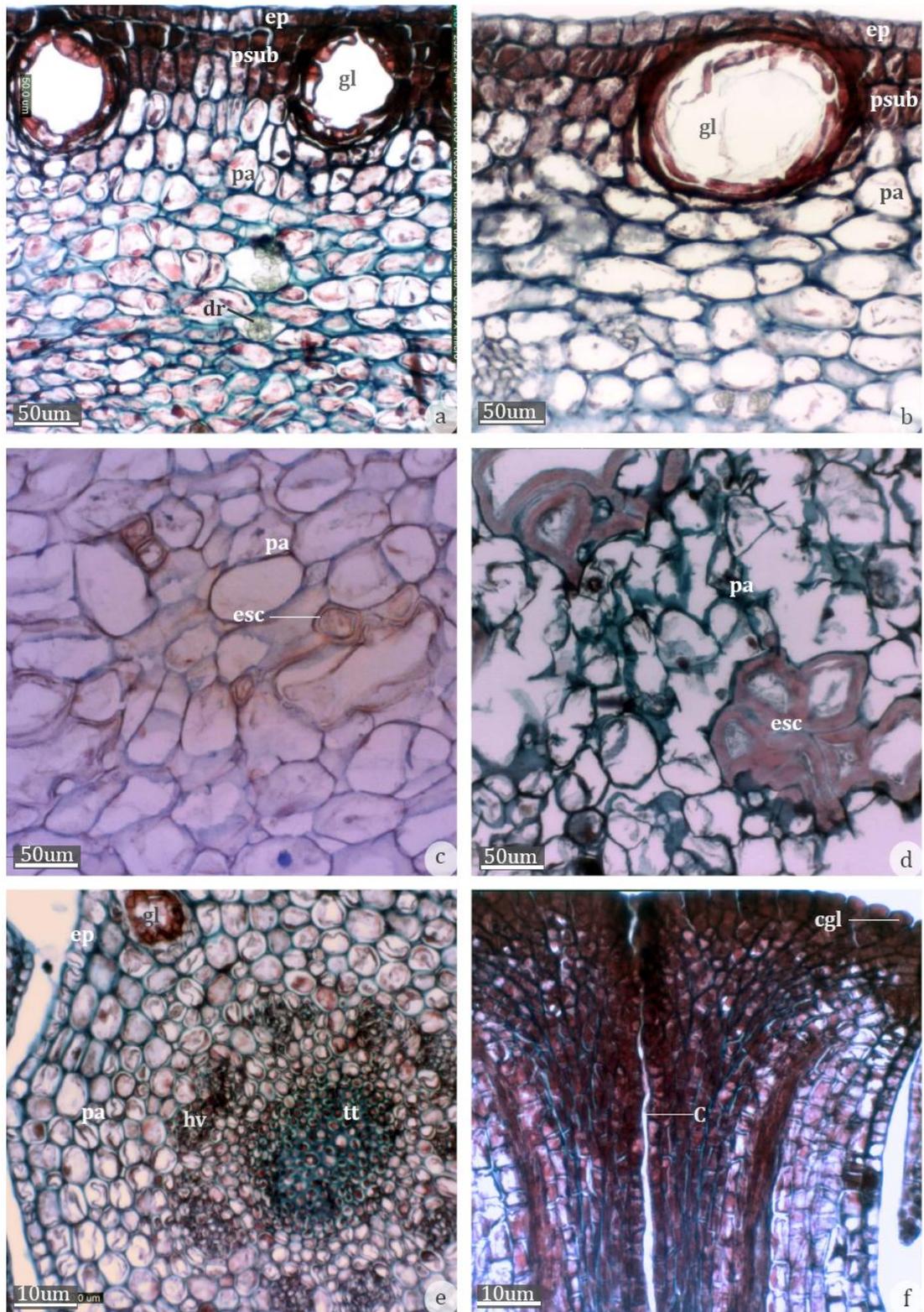


Figura 9. Anatomía del gineceo de *Psidium cattleianum*, paredes del ovario, estilo y estigma. a) Corte de pared del ovario de un botón floral joven, *P. c. f.*

cattleyanum (IV3). b) Corte de pared del ovario de un botón preantesis, *P. c. f. lucidum* (24). c) Corte transversal de pared del ovario en una flor en antesis, *P. c. f. lucidum* (IV6). d) Corte transversal de pared del ovario en un fruto cuajando, *P. c. f. lucidum* (III5). e) Corte transversal de estilo de un botón floral preantesis, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). f) Corte longitudinal estilo y estigma de un botón floral joven, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). (C, canal del estilo; cgl, células glandulosas; dr, drusas de oxalato de calcio; ep, epidermis; esc, esclereidas; gl, glándula subepidérmica; hv, haz vascular; pa, parénquima; psub, parénquima subepidérmico; tt, tejido de transmisión)

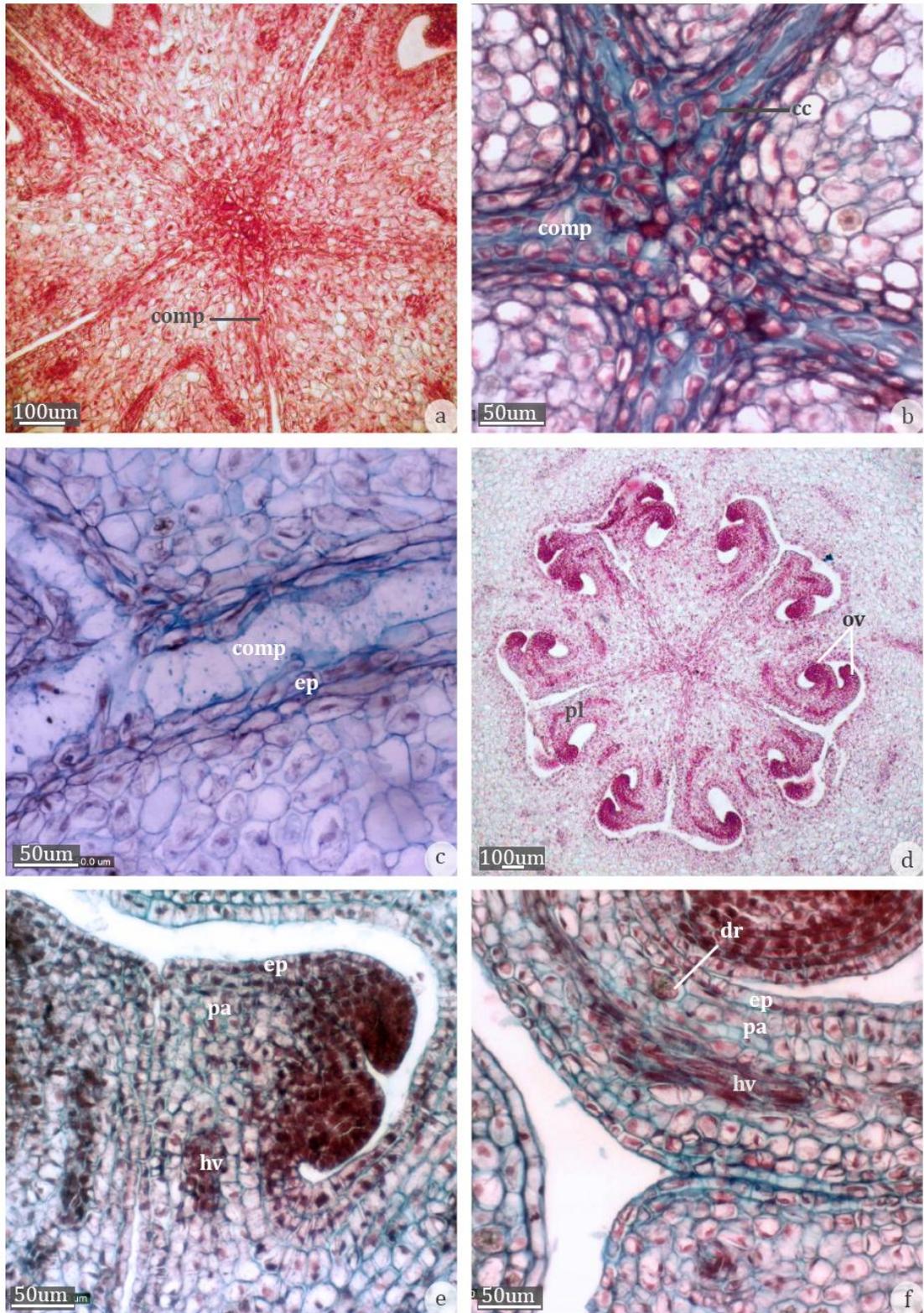


Figura 10. Anatomía del gineceo de *Psidium cattleianum*, *compitum* y placentación. a) Corte transversal de porción apical de ovario en la zona del

compitum, *P. c. f. lucidum* (IV6). b) Detalle del canal del compitum con células de pared gruesa, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). c) Detalle del canal del *compitum* sin relleno de células, *P. c. f. lucidum* (IV6). d) Corte transversal de porción apical de ovario con vista general de la placenta, *P. c. f. lucidum* (IV6). e) Detalle la anatomía de la placenta de un botón floral joven, *P. c. f. lucidum* (24). f) Detalle la anatomía de la placenta de un botón floral avanzado, *P. c. f. cattleyanum* (IV1). (comp, canal del compitum; cc, células del compitum; dr, drusas de oxalato de calcio; ep, epidermis; hv, haz vascular; ov, óvulos; pa, parénquima; pl, placenta).

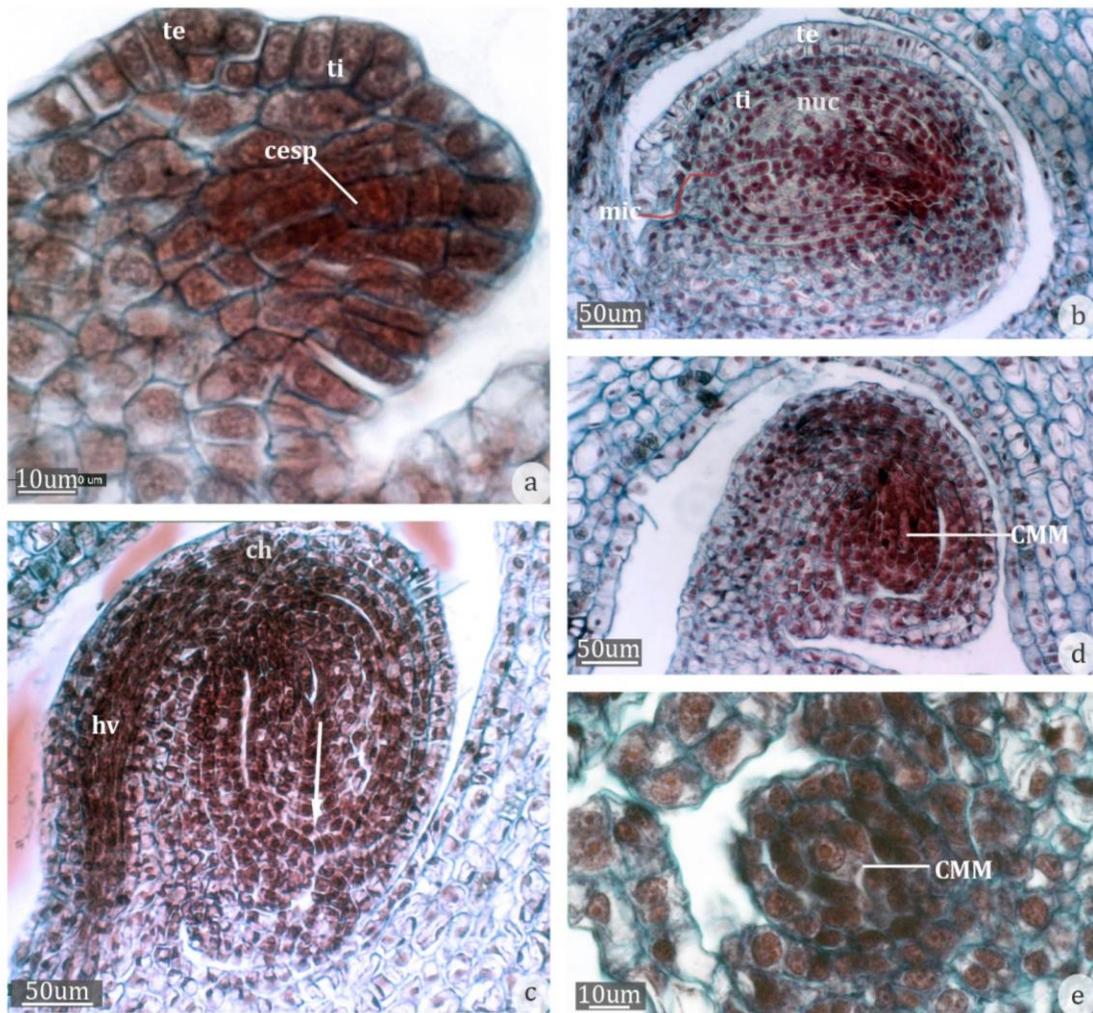


Figura 11. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleianum*, desarrollo de los megasporangios a) Óvulo muy joven, tegumentos incipientes, *P. c. f. lucidum* (IV6). b) Óvulo desarrollado completamente, detalle de todas las partes, *P. c. f. lucidum* (24). c) Óvulo desarrollado, detalle de haz vascular, chalaza e hilera de células de la nucela (flecha blanca), *P. c. f. cattleianum* (III7). d) Óvulo joven con célula madre de la megáspora alargada, *P. c. f. lucidum* (24). e) Nucela con célula madre de la megáspora, *P. c. f. lucidum* (24). (CMM, célula madre de la megáspora; cesp, célula esporogénica; hv, haz vascular; mic, micrópila; nuc, nucela; te, tegumento externo; ti, tegumento interno)

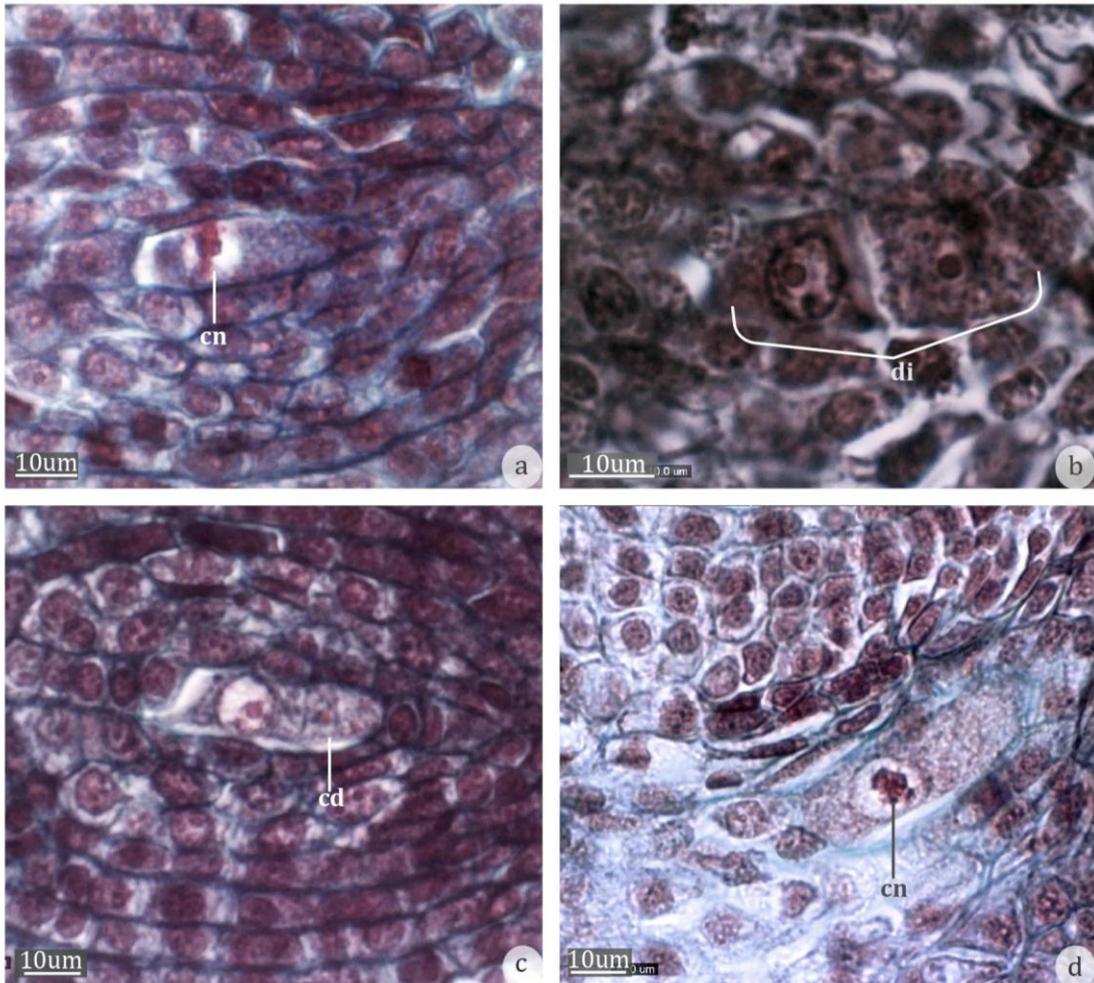


Figura 12. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleianum*, célula tipo megáspora. a) Detalle de célula madre de la megáspora alargada con condensación de ADN, *P. c. f. cattleianum* (IV1). b) Díada de células, *P. c. f. cattleianum* (IV1). c) Célula con núcleo en posición micropilar y células desintegrándose separadas por pared, *P. c. f. cattleianum* (IV1). d) Célula tipo megáspora con condensación del ADN, *P. c. f. lucidum* (24). (cn, condensación del ADN del núcleo; di, díada de células; rc, restos células).

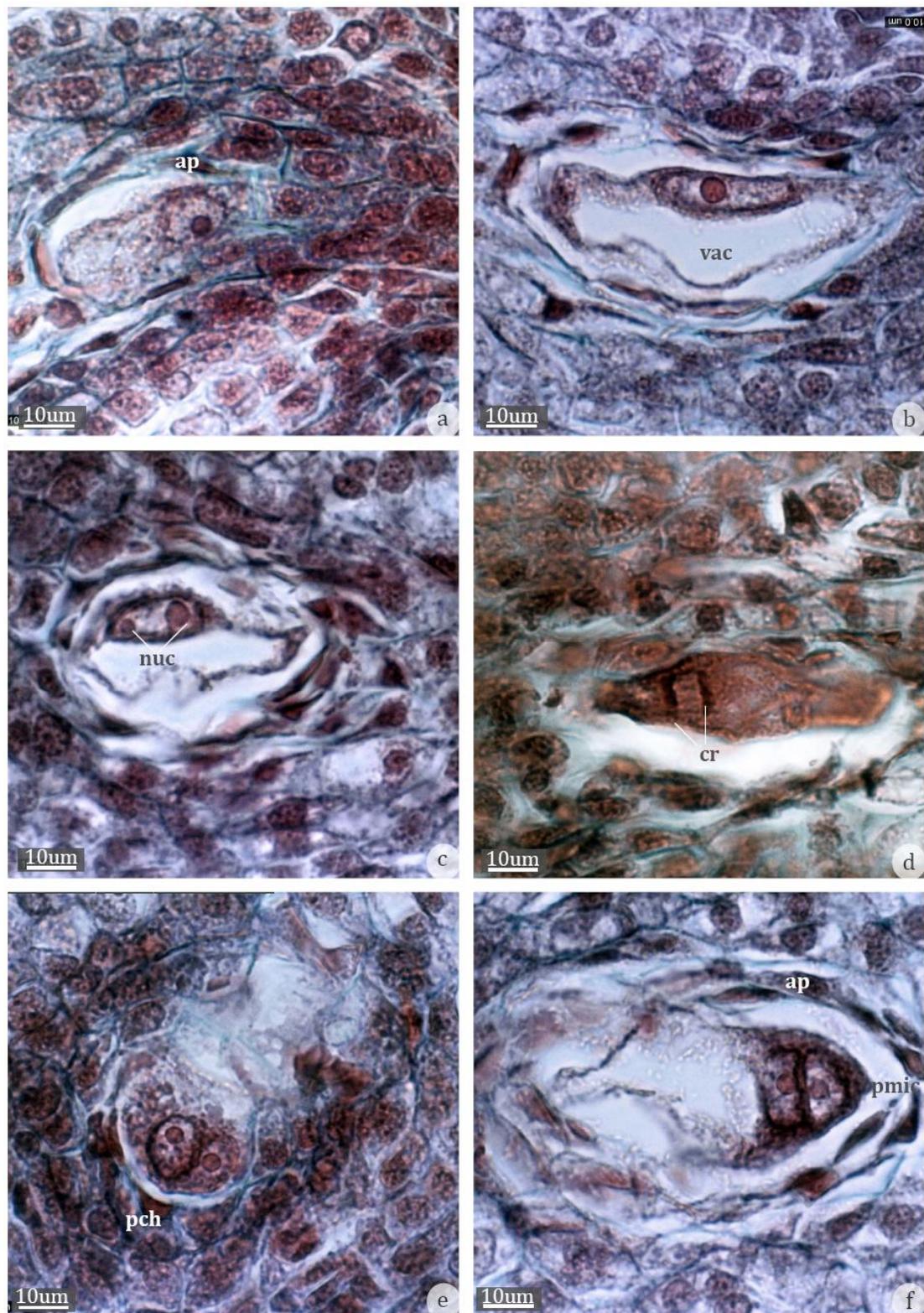


Figura 13. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleyanum*, formación del saco embrionario. a) Célula de tipo megáspora agrandada, *P. c. f. lucidum* (24). b)

Vacuolización de la célula de tipo megáspora, *P. c. f. lucidum* (24). c) Inicio de las mitosis, dos nucleolos, *P. c. f. lucidum* (24). d) Anafase de una mitosis, *P. c. f. cattleyanum* (III7). e) Par de células del polo chalazal, *P. c. f. lucidum* (24). f) Par de células del polo micropilar, *P. c. f. lucidum* (24). (ap, células aplastadas; cr, cromosomas agrupados; nuc, nucleolos; pch, polo chalazal del óvulo; pmic, polo micropilar; vac, vacuola).

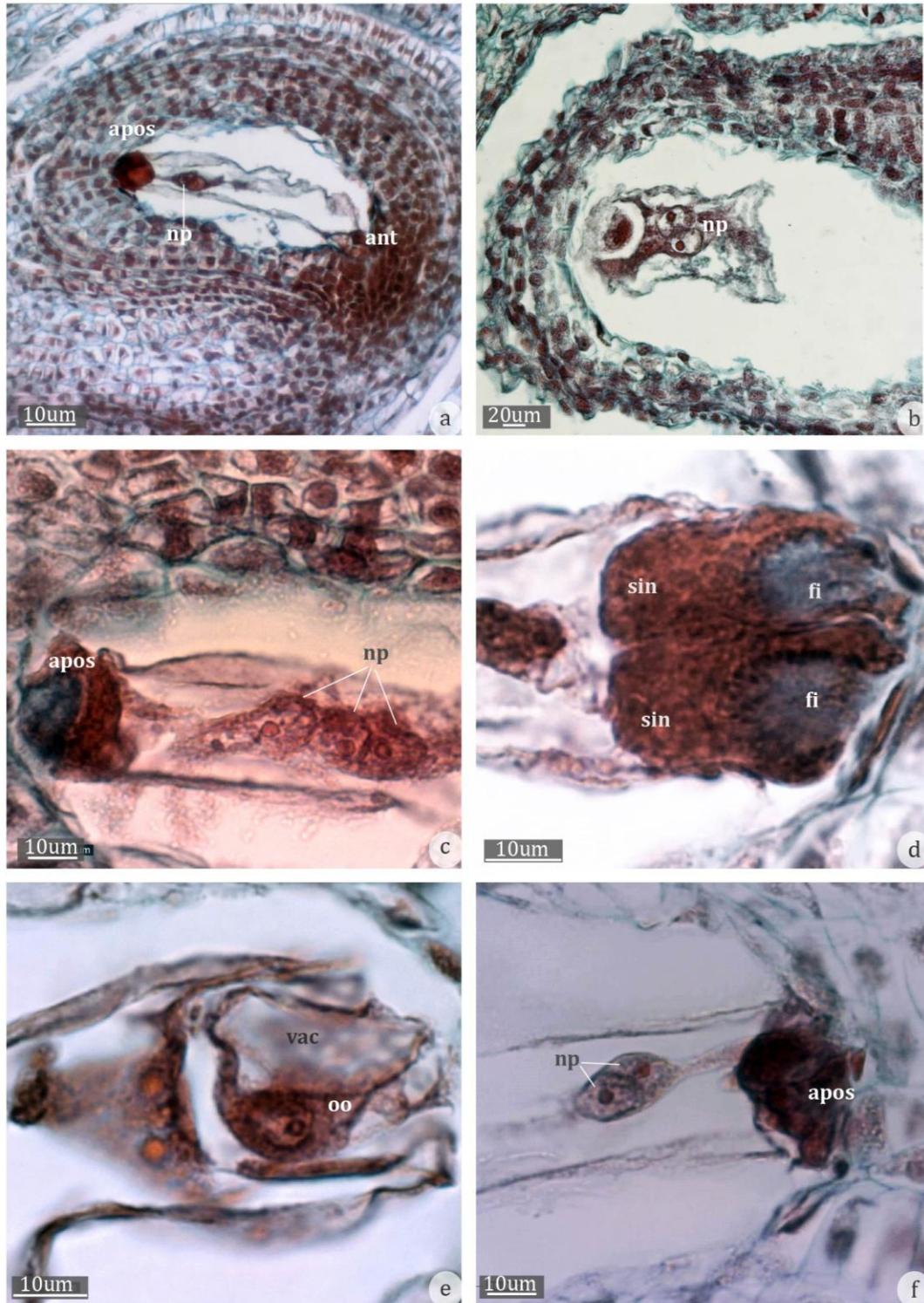


Figura 14. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleianum*, saco embrionario tipo *Polygonum*. a) Vista general del saco embrionario de tipo *Polygonum*, *P. c. f.*

lucidum (IV6). b) Detalle de los núcleos polares, *P. c. f. cattleyanum* (III7). c) Saco embrionario con tres núcleos polares, *P. c. f. lucidum* (IV6). d) Detalle de las sinérgidas, *P. c. f. lucidum* (III5). e) Detalle de la oósfera, *P. c. f. lucidum* (III5). f) Detalle de aparato oosférico colapsado, *P. c. f. lucidum* (IV6). (ant, antípodas; apos, aparato oosférico; fi, aparato filar; sin, sinérgida; np, núcleos polares; oo, oósfera; vac, vacuola).

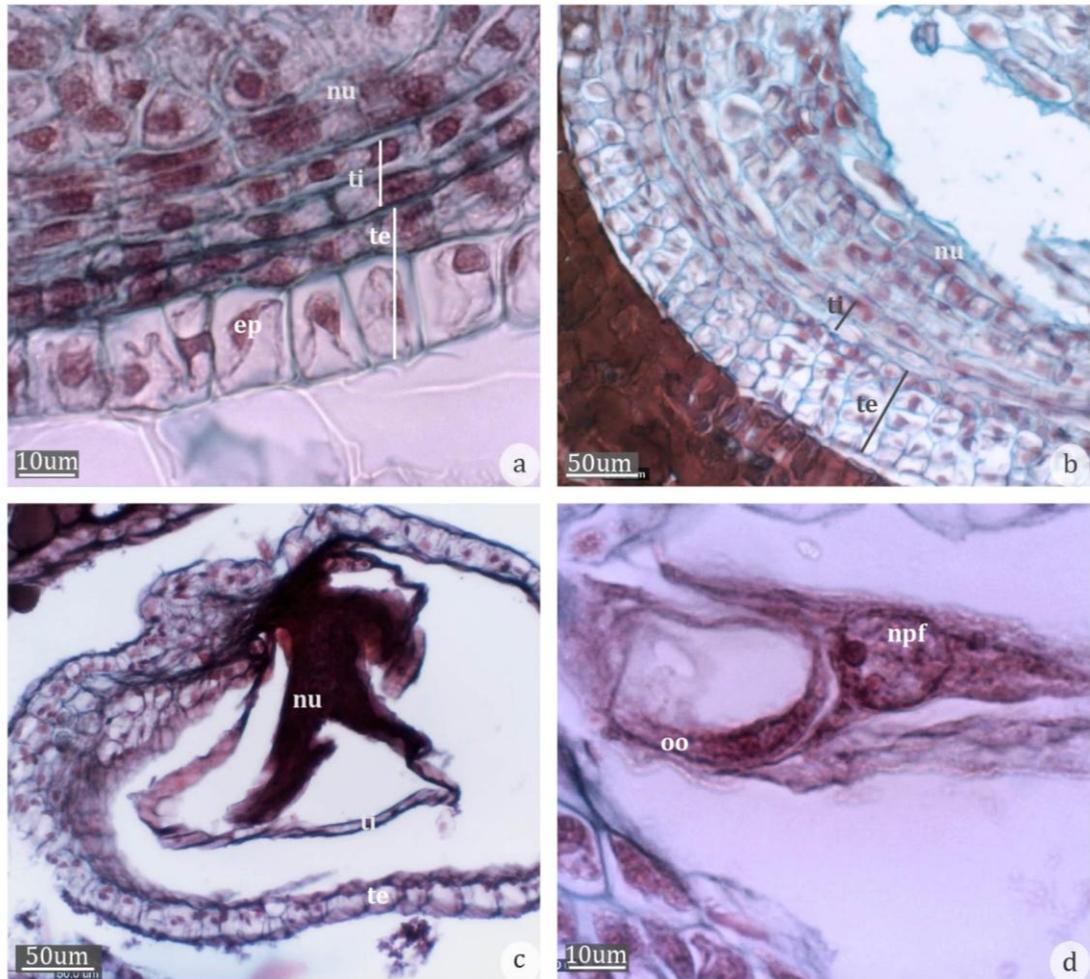


Figura 15. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleyanum*, semilla inmadura y fecundación. a) Detalle de ambos tegumentos de un óvulo post antesis, *P. c. f. cattleyanum* (IV3). b) Desarrollo de las paredes del óvulo en una semilla inmadura, *P. c. f. lucidum* (IV6). c) Semilla abortada, *P. c. f. cattleyanum* (IV1). d) Detalle de saco embrionario con núcleos polares fusionados, *P. c. f. lucidum* (III5). (ep, epidermis; npf, núcleos polares fusionados; nu, nucela; te, tegumento externo; oo, oófera; ti, tegumento interno).

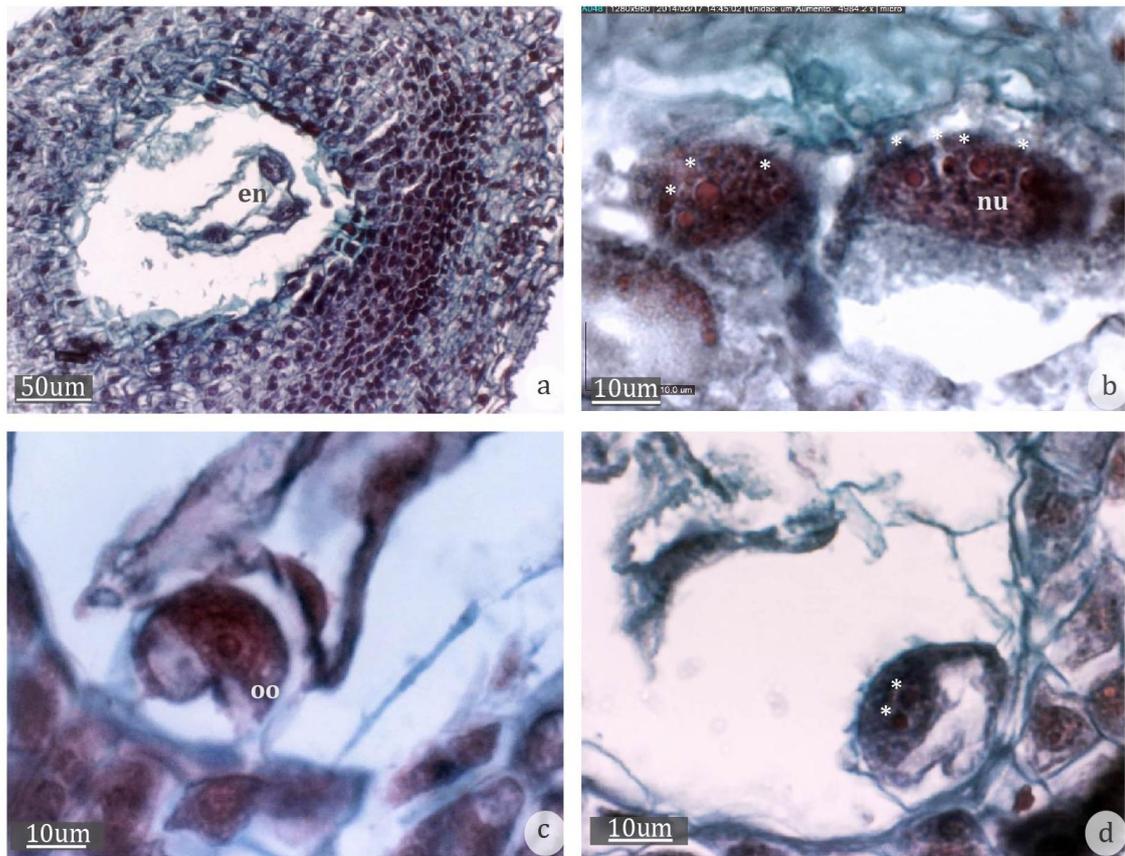


Figura 16. Ontogenia del gineceo de *Psidium cattleyanum*, Endosperma y cigoto u óosfera en semilla inmadura. a) Endosperma nuclear, *P. c. f. lucidum* (III5). b) Detalle de núcleos multinucleolados del endosperma, *P. c. f. lucidum* (III5). c) Oósfera, *P. c. f. lucidum* (IV6). d) Oósfera con dos nucleolos, *P. c. f. lucidum* (IV6). (*, nucleolos; en, endosperma; nu, núcleo; oo, óosfera).

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se describe por primera vez la ontogenia de los órganos reproductivos, microgametofito y megagametofito en la especie *Psidium cattleianum* y específicamente para materiales seleccionados de *P. c. f. cattleianum* y *P. c. f. lucidum* incluidos en el Programa de Selección de Frutos Nativos.

La similitud hallada en los caracteres ontogenéticos no permite realizar una diferenciación taxonómica a nivel infraespecífico utilizando esta información. Los caracteres ontogenéticos suelen ser evolutivamente más conservados por el desarrollo interno que presentan en los órganos florales, en un medio con condiciones más constantes, en contraposición a los caracteres morfológicos externos que están afectados por adaptaciones a las variaciones ambientales. Los patrones encontrados en ambas entidades infraespecíficas son muy similares a los descritos para el género (Corner, 1976) y para la familia y la subfamilia (Davis 1966, Tobe y Raven 1983, Nic Lughadha y Proença 1996). Esto reafirma lo sostenido por algunos autores de que esta familia y particularmente la subfamilia se caracterizan por su gran homogeneidad en los caracteres ontogenéticos (Mauritzon 1939, citado por Nic Lughadha y Proença, 1996, McVaugh 1968, Schmid 1980).

4.1 CARACTERES ONTOGENÉTICOS DEL ANDROCEO

El desarrollo normal de las anteras descrito en este estudio para *Psidium cattleianum* comparte muchas de sus características con los taxa jerárquicos superiores. Las anteras tetrasporangiadas y la desintegración de la epidermis en la madurez son característicos de la familia Myrtaceae (Davis, 1966). El desarrollo de la pared de los microsporangios encontrado en *Psidium cattleianum*, en que se forman dos capas distintas a partir de cada una de las capas parietales secundarias, fue clasificado por Davis (1966) como desarrollo de tipo básico y es el descrito para Myrtaceae (Tobe y Raven 1983).

Las características halladas en el desarrollo de las capas constitutivas de las anteras y de los granos de polen en los materiales de *Psidium cattleyanum* se resumen en la Tabla 3 y se comparan con las encontradas por otros autores para la especie, el género, la subfamilia y la familia.

4.1.1 Paredes de las anteras

P. cattleyanum presenta endotecio con engrosamientos de tipo fibroso, capas medias efímeras y tapete secretor binucleado. Estos son caracteres compartidos con la mayoría de las familias del orden Myrtales (Davis 1966, Tobe y Raven 1983). Por otra parte la presencia del estomio en la zona de unión de los sacos polínicos caracteriza la dehiscencia longitudinal de las anteras (Lestern, 2004) descrita para la subfamilia por Nic Lughadha y Proença (1996).

4.1.2 Tapete y orbículas

El tapete secretor o también denominado glandular, permanece *in situ* durante la maduración del saco polínico y funciona como una capa celular que secreta nutrientes al interior del saco polínico (Maheshwari, 1950). Una vez formadas las micrósporas las células del tapete se separan y comienzan el proceso de degeneración (Maheshwari, 1950). En este trabajo se observaron los corpúsculos de Ubisch en las paredes celulares del tapete cuando comienza la separación de sus células. Estos corpúsculos se asociaron inicialmente a los tapetes secretores (Huysmans *et al.*, 1998), sin embargo se han hallado en tapetes de tipo plamodial (Gotelli *et al.*, 2008).

La presencia de orbículas (cuerpos de Ubisch), detectada en este estudio para *Psidium cattleyanum*, es un reporte novedoso para el grupo, ya que en Myrtaceae sólo ha sido reportado para *Eucalyptus melliodora* A.Cunn. ex R. T.Baker y H.G.Sm (Huysmans *et al.*, 1998), especie filogenéticamente distanciada dentro de la familia. Las orbículas se originan en el tapete a partir del retículo endoplásmico y los ribosomas (Echlin y Godwin 1969, Christensen *et al.* 1972, Risueño *et al.* 1969), como vesículas lipídicas (proorbículas) en las que se deposita una pared de

esporopolenina en simultáneo a la formación de las paredes de los granos de polen (Christensen *et al.*, 1972).

Las orbículas están presentes en especies de todos los taxa de Angiospermas y también en Gimnospermas, Monilofitas y Briofitas (Huysmans *et al.*, 1998). Su función no ha sido determinada hasta el momento (Verstraete *et al.*, 2014). Si bien se han formulado diversas hipótesis al respecto, como función de transporte de esporopolenina del tapete a las micrósporas (Maheshwari, 1950), que no tienen función definida y son un vestigio del tapete (Christensen *et al.* 1972); entre otras hipótesis. Estudios de Galati *et al.* (2010) hallaron coincidencia entre el tipo de polinización y el tipo de orbícula en especies de distintas familias, y corroboran la hipótesis de Heslop-Harrison (1968) de que están involucrados en la liberación del polen.

4.1.3 Desarrollo de las microsporas

La pared de calosa que rodea a las cmm en los sacos polínicos con meiosis normales persistió durante toda la meiosis hasta que estuvieron formadas las esporas. Esto asegura la sincronización de los eventos de la meiosis dentro de los sacos polínicos, mediante la conexión por canales citoplasmáticos (plasmodesmos) de las células del lóculo (Heslop-Harrison, 1968). Esta sincronización de eventos, entre células de cada lóculo, no se observó entre sacos polínicos de una misma antera ni entre anteras de una misma flor. Esto también fue reportado para Melastomataceae en especies del género *Miconia* (Caetano, 2010). Sin embargo, no es un hecho comúnmente mencionado en la literatura y no se hallaron hasta el momento posibles interpretaciones a este fenómeno.

La citocinesis simultánea en la microsporogénesis es característica de la familia (Tobe y Raven 1983) y del 95% de las Eudicotiledóneas (Davis, 1966). A nivel anatómico se observó que la microspogénesis es normal en la mayoría de las anteras de todos los individuos analizados. Con esto se constata que es posible la formación normal de tétradas en los individuos con ploidías impares de esta especie.

Las microsporas una vez liberadas poseen una pared celular notoria, esta es la primexina y sobre la que paulatinamente se depositan los demás componentes de la pared del grano de polen (Heslop-Harrison, 1968). En esta etapa las células están creciendo y son permeables al medio y a los cambios de volumen (Heslop-Harrison, 1968). Esto podría explicar que muchas de las microsporas jóvenes se observen retraídas, sin turgencia, por efectos de la deshidratación en el proceso de infiltración.

4.1.4 Granos de polen

Los granos de polen de desarrollo normal se liberan en mónadas en los materiales estudiados. No obstante Patel *et al.* (1984) reportan liberación de polen en mónadas y tétradas para la especie. Las tétradas que se observaron en este estudio son las caracterizadas como anómalas dado su falta de contenido citoplasmático. Estas pudieron ser observadas y clasificadas como normales por Patel *et al.* (1984) dado que la observación fue sobre micrografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) con material acetolizado, y por ende carente de contenido interno.

Las formas de polen descrito como ovalado y triangular en este estudio coinciden con los que describen Erdtman (1966) y Patel *et al.* (1984) como la vista lateral del polen oblado-elíptica y la vista polar triangular en un grano sincolpado oblado, triaperturado, radiasimétrico (Erdtman, 1966). Los granos esféricos y los deformes encontrados en este estudio también fueron observados por Rasseira y Rasseira (1995) en *Psidium cattleianum*. Estos autores aseguran que si bien la especie puede presentar varias formas de granos, los granos de polen deformes son probablemente inviables.

Tabla 3. Características estructurales y del desarrollo del androceo de <i>Psidium cattleianum</i>. Resumen de lo encontrado en esta tesis y comparadas con lo encontrado por otros autores en la especie y los taxones superiores: <i>Psidium</i>, <i>Myrteae</i>, <i>Myrteaceae</i>.			
Características Androceo	<i>Psidium cattleianum</i>	<i>Psidium</i>	Myrtoideae/ tribu Myrteae (Sudamérica)
Tipo de antera	Tetrasporangiada **		Tetrasporangiada (Davis 1966, Schmid 1984)
Desarrollo de pared saco polínico	Tipo básico **		Tipo básico (Tobe y Raven, 1983)
Glándulas en el Conectivo	Una glándula **	1-4 (Landrum y Bonilla, 1996). Más de dos glándulas (Landrum y Kawasaki, 1997)	Glándulas presentes (Dahlgren y Thorne, 1984)
Epidermis	Efimeras (permanecen células estiradas, colapsadas) **		Persistente o efímera (Tobe y Raven 1983, Davis 1966)
Capas intermedias	Efimeras **		Efimeras (Davis, 1966)
Endotocio	Espesamientos de tipo fibroso **		Espesamientos Fibrosos (Davis, 1966)
Tapete	Glandular (secretor) **		Glandular (Davis, 1966)
Núcleos del tapete	Binucleado		2-nucleado (Davis, 1966)
Citocinesis de la tétrada de microsporas	Simultánea **		Simultánea (Tobe y Raven, 1983)
Liberación polen	Mónadas y tétradas (Patel <i>et al.</i> , 1984). Mónadas; Tétradas aspecto no viable **	Bicelular (Nic Lughadha y Proença, 1996)	Mónadas (Nic Lughadha y Proença, 1996)
Número de células del grano de polen maduro	Bicelular **		Bicelular (Davis, 1966)
Forma y tipo de grano polen	Triangular, esférico, oval o disforme (Rasseira y Rasseira, 1995). Triangular a ovalados, esférico, disformes **		Oblado-elíptico en vista lateral; triangular en vista polar (Patel <i>et al.</i> , 1984). Simetría radial 2(3)4colpados, peroblado oblado (Erdtman, 1966)

** Datos obtenidos en esta tesis

4.2 ANOMALÍAS VS VIABILIDAD DE POLEN

En las anteras maduras se observaron sacos polínicos conteniendo tétradas irregulares, granos de polen deformes y otras anomalías que se encontraron en menor medida. Estas fallas en el desarrollo normal del polen pueden ser la explicación de los bajos valores de viabilidad encontrados en los individuos analizados.

Existen diversas causas que pueden afectar la viabilidad del polen y podrían explicar las variaciones en la viabilidad de polen entre individuos, así como entre formas, en un determinado año o a lo largo del tiempo. Estas pueden ser intrínsecas del individuo, como variabilidad genética infraespecífica, condiciones durante la microsporogénesis, número de núcleos, metabolismo del polen, edad; o ambientales, como efectos de la estación, suplemento de nitrógeno, humedad, temperatura, tiempo de antesis (Dafni y Firmage, 1999).

Psidium cattleianum es poliploide y en especies poliploides es frecuente que ocurran desbalances cromosómicos en la meiosis que provoquen fallas que determinan la esterilidad y por ende la baja viabilidad del polen (Goldenberg y Shepherd 1998, Risso-Pascotto *et al.* 2006). Esto fue reportado en *Miconia albicans* (Sw) (Melastomataceae) (Caetano *et al.*, 2013) y *Paspalum notatum* Flüggé (Poaceae) (Podio *et al.* 2012). Pagliarini (2000) observó que la segregación irregular de cromosomas se correlaciona con problemas en la viabilidad de polen en todas las especies que la presentan.

Adicionalmente, los números cromosómicos impares presentan frecuentemente dificultad en la distribución equitativa de los cromosomas (Guerra 1998, Costa 2009). En plantas triploides y pentaploides la segregación al azar de cromosomas produce gametos aneuploides (no tienen el número básico de la especie) que varían en viabilidad (Comai, 2005). Estudios de Singhal *et al.* (1985) en *P. cattleianum* heptaploides reportan alta anormalidad de microsporocitos con esterilidad del polen de 80%.

Los individuos III7 y IV3 de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* con viabilidad de polen nula son heptaploides (7x) según lo analizado por Vázquez *et al.* (2014). Estos materiales son los que presentaron los porcentajes más bajos de sacos polínicos con granos de polen normales en el análisis cuantitativo. El individuo IV1 también es heptaploide (Vázquez *et al.*, 2014), su viabilidad de polen no es nula y en el análisis cuantitativo presentó proporción de sacos polínicos normales significativamente mayores que los dos anteriores.

Los individuos de *Psidium cattleianum* f. *lucidum* provenientes de la EEFA (IV6 y III5) son octoploides (8x) de acuerdo a los datos de Vázquez *et al.* (2014) y poseen los valores más altos de viabilidad de polen. De estos materiales, el individuo IV6 fue el que presentó la mayor proporción de sacos polínicos normales entre todos los individuos cultivados en la EEFA, aunque al individuo III5 no fue posible cuantificarlo. Los individuos de *P. c. f. lucidum* del INIA (24 y 61) presentaron valores de viabilidad de polen altos y porcentajes de sacos polínicos normales altos. El individuo 61 con el valor más alto de viabilidad de polen, presentó la mayor proporción de sacos polínicos normales. Para estos individuos no se ha determinado aún el nivel de ploidía, un elemento que será de utilidad para reforzar la hipótesis de este factor como causa de los desbalances.

El valor de ploidía elevado y los valores impares, por lo tanto, pueden ser un factor explicativo de las fallas en el desarrollo de los granos de polen. En los individuos con ploidías pares se encuentra menor frecuencia de anomalías y valores de viabilidad de polen más altos. Sin embargo dentro de las ploidías impares (heptaploides) hay diferencias significativas. Se ha visto que la viabilidad de los gametos aneuploides depende de las especies; y en el caso de las especies triploides que presentan variación en la fertilidad se desconocen los mecanismos de tolerancia a la aneuploidía (Comai, 2005). Estudios del comportamiento de los cromosomas en la meiosis arrojarían luz a estos resultados.

Independientemente de cuáles sean las causas (las fallas en el desarrollo o la suma de varios efectos) la baja cantidad de polen viable registrada, en todos los

individuos analizados y en los antecedentes de la especie, reduce la capacidad de polinización de un individuo y por lo tanto su éxito reproductivo ante la necesidad de fecundación. Esta es una característica importante a tener en cuenta en planes de manejo de la especie o actividades experimentales, que pueden llevar a interpretaciones erróneas acerca de su sistema reproductivo. Al mismo tiempo potencia la exploración de los procesos de apomixis citados para la especie por Manshardt y Aradhyta (1990) citado por Ellshoff *et al.* (1995), y del que se obtienen más evidencias en este trabajo.

4.3 CARACTERES ONTOGENÉTICOS DEL GINECEO

Los caracteres del gineceo de las Myrtaceae son de gran utilidad taxonómica y sistemática y se han incluido en diversos trabajos filogenéticos (Tobe y Raven 1983, Landum 1986, Tobe y Raven 1987, Landrum y Kawasaky 1997, Bohte y Drinnan 2005, Lucas *et al.* 2007, Pimentel *et al.* 2014). En este trabajo se realizó una descripción detallada del gineceo y la primera descripción de la ontogenia de los óvulos y el megagametofito de individuos seleccionados de *Psidium cattleyanum*.

Las características generales descritas para ambas formas de la especie se resumen en la Tabla 4, junto a las encontradas por otros autores para la especie, el género y la subfamilia.

4.3.1 Características morfológicas del gineceo

En el estilo se observó un canal central longitudinalmente dispuesto y un tejido de transmisión compacto. El canal estilar en Myrtaceae sólo ha sido registrado en especies de *Eucalyptus* y *Angophora* Cav. (Boland y Sedgley, 1986) y en *Kunzea ericoides* (Page *et al.*, 2010). No obstante, en las descripciones morfológicas de otras especies de Myrtaceae no se reporta el tipo de estilo, posiblemente porque se desconoce esta característica debido los escasos estudios anatómicos en la familia. En el tejido de transmisión las células aparentan tener paredes muy gruesas. Según van Went y Willemse (1984) estos espesamientos también pueden estar constituidos por sustancia intercelular que llega a ser muy conspicua en algunas especies. Para determinar exactamente la conformación del tejido de transmisión es necesario un estudio de ultraestructura celular.

Las células papilosas observadas en el estigma también se reportaron para *Eugenia* y se describen como características de Myrtaceae (van Wyk y Lowrey 1988, Silva y Pinheiro 2007). En varias especies de Myrtoidea, incluida una especie de *Psidium*, el estilo se clasifica como seco (Proença y Gibbs, 1994) y también en la mayoría de las especies de Myrtaceae (Wilson, 2011).

En el mesófilo de los carpelos se observaron drusas y esclereidas dispersas entre las células parenquimáticas. Tanto drusas como arenilla cristalina también fueron descritas para *Psidium* por Narayanaswami y Roy (1960). Estos cristales son comunes en los tejidos parenquimáticos y funcionan como lugares de deposición del exceso de calcio en las plantas (Volk *et al.* 2002, Monje y Baran 2002). Las esclereidas fueron anteriormente observadas en *P. cattleyanum* y también en *Syzygium jambos*, *S. malaccense* (L.) Merr. y L.M.Perry, *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk., y *P. guineense* Sw. (Pimentel *et al.*, 2014) y en *Eucalyptus* L'Hér. (Burrows, 2000). En las especies de la tribu Myrteae de frutos carnosos, *P. cattleyanum* y *Rhodomyrtus tomentosa*, las esclereidas otorgan rigidez y consistencia, protegen al gineceo y al fruto joven asegurando una dispersión eficiente de sus semillas (Pimentel *et al.*, 2014).

4.3.2 Compitum y placentación

En todos los individuos analizados se registró un *compitum*. Esta es una región comúnmente presente en gineceos sincarpicos (como canal, hendidura, poro, tubo etc) que conecta a los lóculos (Carr y Carr, 1961 citado por Schmid 1980). Por su ubicación se clasificaría como un *compitum* intra-gineceo (Endress, 2011a), que junto a la sincarpia es una innovación clave en la evolución en las Angiospermas (Endress, 2011a). Esto respresenta una ventaja ya que permite la distribución regular de los tubos polínicos hacia los carpelos y óvulos (Endress, 1982) e incrementa la probabilidad de fertilización efectiva si la polinización es limitada (Carr y Carr 1961, citado por Schmid, 1980). La presencia de un *compitum* es muy común y conspicua en la familia Myrtaceae (Schmid 1980, Nic Lughadha y Proença 1996).

Las células del canal del *compitum* son morfológicamente semejantes a las células descritas para del tejido de trasmisión del estilo. A diferencia del tejido de trasmisión, las células van perdiendo su citoplasma, hasta dejar sólo la estructura de la pared en el canal. Es probable que sea el último tramo de este tejido y actúen como éste en la dirección y nutrición del tubo polínico (van Went y Willemse, 1984).

Estudios recientes de Pimentel *et al.* (2014) indican dos orígenes de la placenta en las Myrteae: placentación caulinar, los óvulos se desarrollan a partir de un eje central caulinar, y placentación carpelar, los óvulos se desarrollan a partir de la zona de unión de los carpelos. En nuestros resultados no se observó un eje central, sino la continuación de las hojas carpelares, más notorio en la región del *compitum*, coincidiendo con lo descrito como placentación carpelar para *Psidium cattleyanum* por Pimentel *et al.* (2014).

La placentación axial y la placenta proyectada hacia el centro del lóculo también fue descrita para la especie (Rasseira, 2004) y el género (Narayanaswami y Roy, 1960). Según Pimentel *et al.* (2014) lo que se interpreta como placenta proyectada hacia los lóculos son, en realidad, los márgenes de los carpelos. La similitud anatómica encontrada en este trabajo entre los carpelos y la región entendida como placenta, apoya la interpretación de estos autores.

4.3.3 Características del megasporangio

Los óvulos anátropos, crasinucelados y bitegmentados observados en este trabajo coinciden con los patrones típicos descritos por otros autores como predominantes en la familia, la tribu y el género (Pimentel *et al.* 2014, Davis 1966, Narayanaswami y Roy 1960, Tobe y Raven 1983). Las características ontogenéticas descritas en este estudio junto a lo encontrado por otros autores, para la especie, el género, la subfamilia y la familia, se resumen en la Tabla 4.

La micrópila en zig-zag observada en *Psidium cattleyanum* no es una característica diagnóstica de la familia, pero si fue observada anteriormente en el género *Psidium* (Narayanaswami y Roy, 1960). Esta es considerada una característica derivada dentro de Angiospermas, aunque su ocurrencia se relaciona mayormente con óvulos campilótropos (Endress, 2011b).

En la región chalazal de los óvulos, la zona de células diferenciadas observadas en este trabajo coincide con lo descrito como hipostasis en etapas avanzadas del desarrollo de los óvulos en la especie *Psidium guajava* (Narayanaswami y Roy, 1960). La hipostasis es un tejido especializado situado a nivel del origen de los

tegumentos y el saco embrionario. Funcionalmente se interpreta como un tejido glandular exiguo con varias funciones propuestas: control hormonal del crecimiento del saco embrionario, comunicación de la vascularización y transporte de nutrientes al saco embrionario, regulación del transporte de agua, barrera para el crecimiento del saco embrionario (Boesewinkel y Bouman, 1984). Cualquiera de estas funciones deberán ser corroboradas en estudios futuros.

4.3.4 Desarrollo del megagametofito

La célula madre de la megáspora se origina directamente de una célula arqueosporica ubicada en la tercera o cuarta capa nucelar, esto fue descrito también para *Psidium guajava* (Narayanaswami y Roy, 1960). En Myrtaceae se describe como originada de una célula arqueosporica hipodérmica, sin especificar la profundidad de ésta (Davis, 1966).

La meiosis para la formación de megáspora no fue observada en los individuos analizados; en algunos pocos óvulos se encontraron díadas y sólo en uno se observó una aparente evidencia de tétradas. En la formación de megásporas de *Psidium guajava* la primera división meiótica da una díada y la célula micropilar degenera o completa la segunda división meiótica junto a la chalazal; al final de la meiosis puede observarse una hilera de tres o cuatro células, de las cuales la chalazal es la funcional (Narayanaswami y Roy, 1960). Las díadas que se observaron en los materiales analizados de *Psidium cattleyanum* en este trabajo podrían ser un paso intermedio de megasporogénesis completa. Del mismo modo, en el óvulo que encontramos restos de otras células degradadas, como evidencia de formación de tétradas, podría haber ocurrido meiosis completa.

La posición del núcleo de la célula madre de la megáspora alargada es micropilar y mantiene esa posición en la célula que actúa de megáspora. Normalmente, en las megásporas de origen meiótico, que originarán sacos embrionarios de tipo *Polygonum*, el núcleo de la célula se ubica en el extremo chalazal hacia el centro celular (van Went y Willemse, 1984). La posición micropilar del núcleo representa un indicio de que la célula madre de la megáspora actúa

directamente como megáspora no reducida. Asimismo no se observó en ningún óvulo la presencia de calosa asociada a la célula madre de la megáspora. De todos modos la calosa es muy difícil de ver con microscopía óptica en óvulos, por lo que a futuro sería necesario realizar observaciones con microscopía de fluorescencia para evidenciar si existe preparación para la meiosis en la megasporogénesis (Koltunow 1993, Naumova 2008).

Una célula con características citológicas típicas de megáspora fue observada en los óvulos en los estadios posteriores. Dada la ausencia de evidencia de meiosis, se establece la diplosporia como posible vía apomítica de formación del saco embrionario.

La diplosporia, formación de sacos embrionarios no reducidos a partir de la célula generativa, puede generarse de dos maneras (Nogler, 1984). En una diplosporia de tipo *Taraxacum* la célula madre de la megáspora comienza la meiosis y luego de la primera división se detiene y se restituyen las ploidías de los núcleos; como resultado se observa una díada de células de las cuales una actúa como megáspora y la otra degenera (Juel 1906, Osawa 1913, citados por Nogler, 1984). En una diplosporia de tipo *Antennaria* (Juel 1900, citado por Nogler, 1984) la célula madre de la megáspora funciona directamente como megáspora, siendo este el tipo más común de diplosporia (Koltunow, 1993). Este último podría ser el tipo que ocurre en *Psidium cattleianum*, dado la poca frecuencia de díadas encontradas y que posiblemente sean de meiosis completas no captadas en los materiales analizados, como ya se ha mencionado. Para confirmar cuál es la que ocurre serían necesarios estudios citogenéticos de esta etapa que admitan seguir las divisiones observando los cromosomas, complementados con análisis moleculares que permitan revelar si ocurre o no recombinación mediante el análisis de la identidad de las células o embriones resultantes.

4.3.4.1 Saco embrionario

El saco embrionario encontrado en los materiales estudiados de *Psidium cattleianum* es de tipo *Polygonum* y los patrones de formación y desarrollo son los

típicos descritos para la familia (Tobe y Raven, 1983) (Tabla 4). En especies apomícticas, el patrón de desarrollo es igual al de los sacos embrionarios reducidos, y en algunos casos no se han encontrado diferencias morfológicas entre sacos embrionarios reducidos y sacos embrionarios apomícticos (Koltunow 1993, van Baarlen *et al.* 2002).

El desarrollo de sacos embrionarios mostró asincronía entre los óvulos de una misma flor. Esto también fue observado en *Taraxacum* en sacos embrionarios apomícticos (van Baarlen *et al.*, 2002). Por lo que esta característica puede representar otro indicio del origen apomíctico del saco embrionario.

Las células constituyentes del saco embrionario: sinérgidas, oósfera, célula media y antípodas presentan la forma típica de un saco embrionario reducido de tipo *Polygonum* (Maheshwari, 1950); y según lo observado en los individuos analizados de *Psidium cattleianum*, cumplen el mismo rol. Esta similitud estructural y funcional parece ser un patrón común en sacos embrionarios diplospóricos (Koltunow, 1993).

Se registraron sacos embrionarios con tres núcleos polares en algunos óvulos. Esto también fue reportado en *Psidium guajava* y descrito como anomalías en el desarrollo (Narayanaswami y Roy, 1960). Sin embargo la recurrencia de esta característica en los individuos estudiados es llamativa. En algunas especies se han observado núcleos polares en número diferente del esperado (más de dos) en sacos embrionarios diplospóricos (Nogler, 1984). Esta característica ha sido confirmada para algunas especies apomícticas gametofíticas (Murbeck 1902, Fagerlind 1944, Rutishauser 1954a, Hair 1956, Izmailow 1967, citados por Nogler, 1984).

Las antípodas en Myrtaceae se describen como ausentes o efímeras (Davis 1966, Tobe y Raven 1983). En las observaciones de los individuos de *Psidium cattleianum* las antípodas persisten hasta la antesis, como ocurre en *Psidium guajava* (Narayanaswami y Roy, 1960) e incluso pueden persistir hasta 48 horas después de la antesis. Según van Went y Willemse (1984) estas células podrían cumplir una de las siguientes tres funciones: actuar de células de transferencia

entre la nucela y las células centrales, almacenar nutrientes para el desarrollo del endosperma y el embrión (su degeneración luego de la fertilización sirve como suplemento adicional de nutrientes) o producir y secretar sustancias que controlen el crecimiento y regulen el desarrollo del endosperma. Sería necesario ampliar el procesamiento de muestras en esta etapa del desarrollo para establecer hasta qué momento exacto permanecen las células antipodales y relacionarlas con algunas de las funciones descritas.

En varios óvulos se observaron sacos embrionarios total o parcialmente colapsados. Estos podrían ser resultados de divisiones reduccionales fallidas y formación de aneuploides, como lo observado de especies triploides de *Taraxacum*, cuyas megasporogénesis resultan en sacos embrionarios no viables (van Baarlen *et al.*, 2002). Sin embargo también los sacos embrionarios diplospóricos, pueden presentar modificaciones en la forma o poca diferenciación de células o ausencia de sinérgidas (Richards, 1997 citado por Caetano *et al.*, 2013), como se observó en algunos individuos analizados.

En los óvulos maduros de las flores en antesis, no se encontraron evidencias de sacos embrionarios apospóricos en los individuos analizados. Las células iniciales apospóricas en diversos taxa se forman en simultáneo con el saco embrionario reducido (Naumova, 2008) y se diferencian de las células nucelares adyacentes por poseer un núcleo grande y citoplasma denso (Koltunow, 1993). En los óvulos en desarrollo analizados no se encontró ningún indicio de este tipo de desarrollo en la nucela.

4.3.5 Fecundación y desarrollo inicial de semilla

Luego de la antesis, los óvulos presentan núcleos polares fusionados o libres y próximos al aparato oosférico. La fusión de los núcleos polares se describe como posterior a la fecundación en *Psidium* (Narayanaswami y Roy, 1960) y en Myrtaceae (Davis, 1966). Estos antecedentes conducen a la interpretación de que los sacos embrionarios con núcleos polares no fusionados en postantesis corresponden a óvulos no fecundados.

El tegumento externo luego de la anthesis se destaca por su desarrollo en tamaño y número de capas celulares con respecto a las demás capas del óvulo en las semillas inmaduras. Eso indica su rol principal en la formación de la testa de la semilla, coincidiendo con lo descrito para Myrtoideae (van Wyk y Botha, 1984) y *Psidium* (Narayanaswami y Roy 1960, Corner 1976) respecto al origen de la testa a partir únicamente del tegumento externo. Adicionalmente las semillas abortadas, con saco embrionario, nucela y tegumento interno colapsados, mantienen su forma externa debido al desarrollo y persistencia del tegumento externo.

4.3.5.1 Endosperma

En la semilla inmadura (7-10 dpta) el endosperma es una masa citoplasmática multinucleolada. Esta disposición es característica de un endosperma de tipo nuclear, que comienza con múltiples divisiones nucleares libres y eventualmente se vuelve celular o se mantiene en este estado hasta ser consumido totalmente por el embrión en desarrollo (Vijayaraghvan y Prabhakar, 1984). El endosperma nuclear es descrito como característico de Myrtaceae (Tobe y Raven, 1983).

En tratamientos de polinizaciones manuales de Speroni *et al.* (2014a) sobre los mismos materiales analizados en esta tesis, se vio que no ocurre apomixis autónoma y es necesaria la polinización para la formación de fruto y semilla. La necesidad de polinización ya se había reportado para *Psidium cattleianum* (Fidalgo y Kleinert, 2009). Según Richards (1986) citado por Koltunow (1993) la mayoría de los sacos embrionarios apomícticos necesitan polen para un desarrollo apropiado del endosperma, donde al menos uno de los núcleos generativos del tubo polínico se fusione con al menos uno de los núcleos polares. Este fenómeno se denomina pseudogamia, en oposición a la apomixis autónoma donde el saco embrionario no requiere de polinización para el desarrollo del endosperma (Nogler, 1984).

Una forma de confirmar la cantidad de núcleos que dan origen al endosperma es analizar el contenido de ADN por citometría de flujo en semillas. Los picos de ADN obtenidos representan los distintos niveles de ploidías de los núcleos. Esta técnica permite que, basados en la interrelación entre el contenido de ADN de los

núcleos del embrión y los núcleos del endosperma, se puedan reconstruir los diferentes eventos reproductivos que ocurren en las plantas (Matzk *et al.*, 2000). Así, una semilla, de una especie diploide, formada por vía sexual mostrará dos picos de ADN: uno 2C para el embrión y otro 3C para el endosperma; una semilla, de la misma especie, formada por vía apomíctica mostrará un pico 2C para el embrión y un pico 4C o 5C para el endosperma originado sin fecundación o con fecundación respectivamente.

4.3.5.2 “Cigoto”

La célula que originará al embrión no muestra signos de división al menos hasta los 10 días post antesis. En este momento no es posible distinguir si la célula observada es un cigoto o la oófera no fecundada. Las diferencias entre ambas son generalmente apreciables a nivel de estudios ultraestructurales, en cuanto a las características de los organelos (mitocondrias, RE, cloroplastos), pero no detectables con microscopía óptica (Natesh y Rau, 1984).

En algunas de estas células se observó un nucleolo adicional en el núcleo de similar tamaño o menor. Esto también fue observado en *Psidium guajava* y descrito como cigoto) por Narayanaswami y Roy (1960). En los materiales se puede interpretar como una oófera fecundada y los dos nucléolos de tamaños desiguales pertenecientes cada uno a un gameto como lo reportado para *P. guajava* por Narayanaswami y Roy (1960). Alternativamente puede tratarse de una oófera no fecundada cuyos dos nucléolos evidencian una gran actividad metabólica de la célula, que se prepara para la embriogénesis.

En los individuos analizados la fecundación podría tener distintas consecuencias según el origen de la oófera, como se explica a continuación.

La fecundación de oóferas reducidas origina embriones con igual ploidía que los parentales: la fecundación de oófera no reducida origina embriones de mayor ploidía que la planta madre. Esto último, aunque con baja frecuencia, pueden encontrarse en especies apomícticas facultativas, donde también se da la reproducción sexual (Nogler, 1984). Otra posibilidad es la degeneración posterior de

ese núcleo masculino sin que ocurra fusión, fenómeno denominado “hemigamia” por Battaglia (1946b) citado por Nogler (1984) y ha sido observado en especies pseudógamas. El estudio de citometría de flujo anteriormente mencionado aportaría en la interpretación de lo que efectivamente ocurre en estos materiales.

Las semillas inmaduras no mostraron indicios de desarrollo de embriones adventicios. Estos, cuando presentes, surgen como grupos de células de núcleo grande y citoplasma denso entre las células nucelares o en los tegumentos (Koltunow, 1993). Este fenómeno fue descrito para Myrtaceae en *Syzygium jambos* (Gurgel y Soubihe Soubrinho, 1951) y otras especies del género (Nic Lughadha y Proença, 1996) y es el tipo de apomixis más frecuente en la naturaleza (Naumova 2008, Hörandl 2010). Sin embargo no existen antecedentes de poliembrionía en la especie y en *P. guajava* tampoco se ha encontrado poliembrionía (Narayanaswami y Roy, 1960).

4.3.6 Óvulos abortados

Las semillas abortadas, según un conteo preliminar sobre material fijado, constituyen un 18 a 20% del total de semillas en un fruto inmaduro (7-10 dpta). Las causas de aborto de semillas pueden ser asociadas a la disponibilidad de polen y polinización; sin embargo en plantas que producen gran cantidad de óvulos, como es el caso de *Psidium cattleianum*, la muerte programada de éstos se asocia a la escasa disponibilidad de recursos (Stephenson, 1981), y a que las semillas polinizadas primero y con mayor ‘aptitud biológica’ serían seleccionadas sobre las más débiles (Lee, 1984). En *Syzygium cumini* (L) Skeels se demostró que los embriones en desarrollo producen factores que median el aborto de otros óvulos, y esto se relaciona a un mecanismo de “competencia entre hermanos” por los recursos (Arathi *et al.* 1996, Krishnamurthy *et al.* 1997).

Tabla 4. Características estructurales y del desarrollo del gineceo <i>Psidium cattleyanum</i>. Resumen de lo encontrado en esta tesis y comparadas con lo encontrado por taxones superiores: <i>Psidium</i>, <i>Myrteae</i>, <i>Myrtales</i>.	
Características del Gineceo	<i>Psidium cattleyanum</i>
Ovario: n. de óvulos	94 a 265 óvulos en dos filas verticales (Donadio <i>et al.</i> , 2002)
Placentación y compitum	Placenta proyectada en dirección al centro del lóculo **/ (Drehmer 2005, Rasseira <i>et al.</i> 2004). Compitum presente **/ (Pimentel <i>et al.</i> , 2014)
Estigma	Células papilosas **/Seco y capitado (Sanchotene, 1989 citado por Rasseira <i>et al.</i> 2004, Landrum y Kawasaki 1997). Receptividad temprana y duradera (Speroni <i>et al.</i> , 2014)
Óvulos tipo	Anátropo **
Espesor	Crasinucelados **
Tegumentos	Bitégmicos **/ (Pimentel <i>et al.</i> , 2014)
Micrópila	Zig-zag **
Megasporo-rogénesis	No se observa tétrada, megáspora con núcleo micropilar **
Desarrollo del Saco embrionario	<i>Polygonum</i> **
Células antipodales	Presentes en saco embrionario y en algunos persisten hasta post antesis **
Endosperma	Nuclear, masa densa de núcleos con muchos nucleolos **
Desarrollo del Pericarpo	Glándulas esquizógenas o esquizo- lisígenas en la pared del ovario; grupos de esclereidas y drusas en el parénquima del ovario **
** Datos obtenidos en esta tesis	

4.4 APOMIXIS

La formación de semillas por apomixis es una característica ventajosa en especies de interés comercial por la rápida generación y multiplicación de germoplasma nuevo de formas superiores a través de semillas, la reducción de costos y tiempos de reproducción, la evasión de complicaciones asociadas a la reproducción sexual (polinizadores, compatibilidad) y la disminución de la transmisión de virus en plantas que son típicamente propagados vegetativamente (Bicknell y Koltunow, 2004). Sin embargo ésta no es una característica frecuente en los cultivos y hasta el momento se ha fracasado en la mayoría de los intentos de introducirla en especies de interés comercial (Bicknell y Koltunow, 2004).

La apomixis en *Psidium cattleianum* representaría una gran ventaja en la inclusión como cultivo frutícola, por la condición natural en la especie de una característica tan codiciada. Existen diversos antecedentes que sugieren la posibilidad de que la especie presente apomixis como modo de reproducción: homogeneidad de la descendencia obtenida por semillas (Rasseira *et al.* 2004, Vignale y Bisio 2005); baja viabilidad de polen (Speroni *et al.*, 2012), uniformidad de la descendencia evaluada por isozimas (Manshardt y Aradhyta 1990 citado por Ellshoff *et al.* 1995); únicamente haplotipos maternos en la progenie con marcadores moleculares RAPDS (Clara Pristch, comunicación personal, 27 de febrero de 2015). Sin embargo en ninguno de estos estudios se menciona cuál podría ser el mecanismo de formación de semillas sin fecundación. En la familia, como ya fue mencionado se ha reportado embrionía adventicia y posible aposporia (Nic Lughadha y Proença, 1996) para los géneros *Syzygium*, *Plinia* y *Luma* (Nic Lughadha y Proença 1996, Gurgel y Soubihe Soubrinho's 1951).

Dentro de las posibles vías de formación de semillas sin fecundación, en este trabajo podemos descartar la vía apospórica y la embrionía adventicia, ya que no se encontraron indicios de ninguno de estos procesos en el estudio ontogenético de los óvulos. Sin embargo, se encontraron evidencias de formación de sacos

embrionarios sin previa meiosis de la célula madre de la megáspora, proceso que coincide con la apomixis por vía diplospórica.

La diplosporia, como apomixis de tipo gametofítica, está comúnmente asociada a las especies poliploides (Koltunow 1993, Hörandl 2010) en la que los niveles impares son los mejores predictores de la apomixis (Asker y Jerling, 1992). *Psidium cattleianum* es una especie poliploide, con distintos niveles de ploidía reportados. Es posible que los distintos niveles de ploidía en la especie se hayan originado de la eventual fecundación de gametos no reducidos, que ocurre antes de que se establezca un mecanismo de inhibición de la fecundación en especies apomícticas (Whitton *et al.*, 2008).

Los individuos analizados de *Psidium cattleianum* presentan distintos porcentajes de polen viable, desde bajos hasta nulos, pero en todos se constató formación de microsporas. La conservación de reducción meiótica se ha visto en la mayoría de los taxa con apomixis gametofíticas (Hörandl, 2010). De este modo la especie, pese a ser bajo, posee cierto potencial para la fecundación. Adicionalmente los datos de Speroni *et al.* (2014a) indican que en estos individuos no ocurre fructificación sin polinización. Esto indica que la apomixis es pseudógama, por lo que es necesaria cierta proporción de polen viable para la fecundación del endosperma y subsecuentemente el desarrollo de las semillas.

La ocurrencia de apomixis no implica necesariamente la supresión total de sexualidad en la reproducción de la especie, dado que las especies apomícticas, en su mayoría, retienen la capacidad de reproducción sexual y son por tanto apomícticas facultativas (Koltunow, 2003). En éstas la descendencia estará conformada por semillas con embriones de origen sexual y embriones de origen asexual. Estos últimos incluso pueden tener cierta variabilidad genética debido al crossing over o automixis (Thompson y Ritland, 2006) que puede ocurrir antes de que cese la meiosis en la diplosporia. En análisis preliminares de la progenie obtenida de cruzamientos de los individuos analizados en esta tesis, empleando marcadores moleculares ISSRN3 se observó un patrón de bandas correspondiente al

genotipo paterno en algunos individuos de la progenie (Clara Pristch, comunicación personal, 27 de febrero de 2015). Este último admite postular una apomixis de tipo facultativa.

La apomixis facultativa resulta una ventaja para la especie en varios sentidos. La reproducción asexual asegura la reproducción de la especie y permite la colonización rápida de un nicho favorable, con una combinación particular fija de genes (Koltunow, 1993). La combinación con la reproducción sexual actúa evitando la reducción de heterocigosis de la descendencia que ocurre en las propagaciones clonales, que mantienen el genotipo parental (Hörandl 2010, Hörandl *et al.* 2001). La presencia de reproducción sexual genera diversidad genética, que permite la evolución ante cambios de condiciones ambientales (Richards 1986, citado por Koltunow, 1993). El grado de ocurrencia de uno u otro mecanismo en la apomixis facultativa puede estar influenciado por diversos factores como el polen paterno, el fotoperíodo, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes (Nogler, 1984). Sin embargo se desconoce cómo afectan estos parámetros al balance entre sexualidad y apomixis (Koltunow, 1993).

4.5 GLÁNDULAS ESQUIZO-LISÍGENAS

Tanto en el gineceo (ovario y estilo) como en el androceo (anteras) se observaron glándulas subepidérmicas, de interior hueco tapizado por células grandes densamente teñidas con safranina. La presencia de glándulas es una característica diagnóstica de Myrtaceae y se han descrito distribuidas en todos los órganos de la planta (Wilson *et al.* 2001, Dahlgren y Thorne 1984). Sin embargo existen escasos reportes de su morfología y anatomía. Se han descrito como productoras de aceites esenciales de tipo monoterpenos, sesquiterpenos, phloroglucina derivativa de baecckerol, eugenina y tipos de tasmonoles, etc (Dahlgren y Thorne, 1984).

La presencia de glándulas apicales en el conectivo de las anteras es frecuente en Myrtoideae (Nic Lughadha y Proença, 1996). En el género *Psidium* fueron

descriptas como 1 a 4 glándulas por Landrum y Bonilla (1996) y 2 o más por Landrum y Kawasaki (1997). En los materiales analizados tanto en *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* como en *P. c. f. lucidum* se observó una única glándula. Las glándulas subepidérmicas encontradas en la pared del ovario se observaron también en *Psidium guajava* y se describen como glándulas de origen lisígeno y productoras de aceites (Narayanaswami y Roy, 1960). La forma general de estas glándulas fue descrita inicialmente en *Eucalyptus* como cavidades esquizógenas con células secretoras (Carr y Carr, 1970 citado por Ladd *et al.*, 1999). Por otra parte, en *Verticordia* D.C., Ladd *et al.* (1999) describen a las glándulas de las anteras como glándulas inicialmente esquizógenas y luego lisígenas en la madurez. En *Myrtus communis* L. se describen a estas glándulas como esquizo-lisígenas y presentes en todos los órganos de la flor (Ciccarelli *et al.*, 2008).

Las glándulas observadas en el material analizado de *Psidium cattleianum* inicialmente aparentan ser de tipo esquizógeno y las células secretoras se mantienen enteras, sin embargo también se observaron glándulas con el contenido lisado y más comúnmente en órganos maduros. Esto coincide con lo descrito por Ciccarelli *et al.* (2008) y Ladd *et al.* (1999) como glándulas esquizógenas-lisígenas. La lisis celular observada, también podría ser producto de la técnica utilizada para preparar el material, como fuera planteado por Turner (1999). No obstante, estos datos son una evidencia más que aporta a la interpretación de la ontogenia de estas glándulas.

La función de las glándulas no ha sido específicamente determinada aún. Los diferentes lípidos y aceites esenciales podrían estar relacionados a distintas funciones ecológicas dependiendo del órgano en el que estas se encuentren (Ciccarelli *et al.*, 2008). En las anteras se les adjudican algunas funciones como la emisión de aroma floral (Landrum y Bonilla, 1996), la protección de la antera contra insectos predadores, recompensa para polinizadores o una ayuda en la adhesión del polen al polinizador (Landrum y Bonilla 1996, Ladd *et al.* 1999, Beardsell *et al.* 1989). Según lo observado por Speroni *et al.* (2012) los polinizadores buscan polen

como único recurso, ya que además no hay néctar evidente. En el ovario las glándulas podrían tener una función de protección contra predadores

4.6 ASPECTOS TAXONÓMICOS Y FENOLÓGICOS

Se obtiene, por primera vez para la especie, la correspondencia entre los estadios morfológicos externos de la flores y los procesos ontogenéticos internos (figura 17), que abarca tanto la morfología externa como los duración en días de cada etapa ontogenética. Esto constituye una herramienta muy importante para continuar estudiando la biología reproductiva de la especie, realizar intervenciones, cruzamientos y diversos análisis de etapas específicas del desarrollo floral.

Los individuos de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* mostraron un desarrollo floral extendido en el tiempo que implica mayor duración de las diferentes etapas ontogenéticas, especialmente de las primeras etapas del desarrollo del botón floral (figura 17). Por el contrario *P. c. f. lucidum* presenta un desarrollo floral más acotado en el tiempo. Si bien existen diferencias individuales, es posible distinguir un patrón ontogenético común dentro de cada forma de la especie.

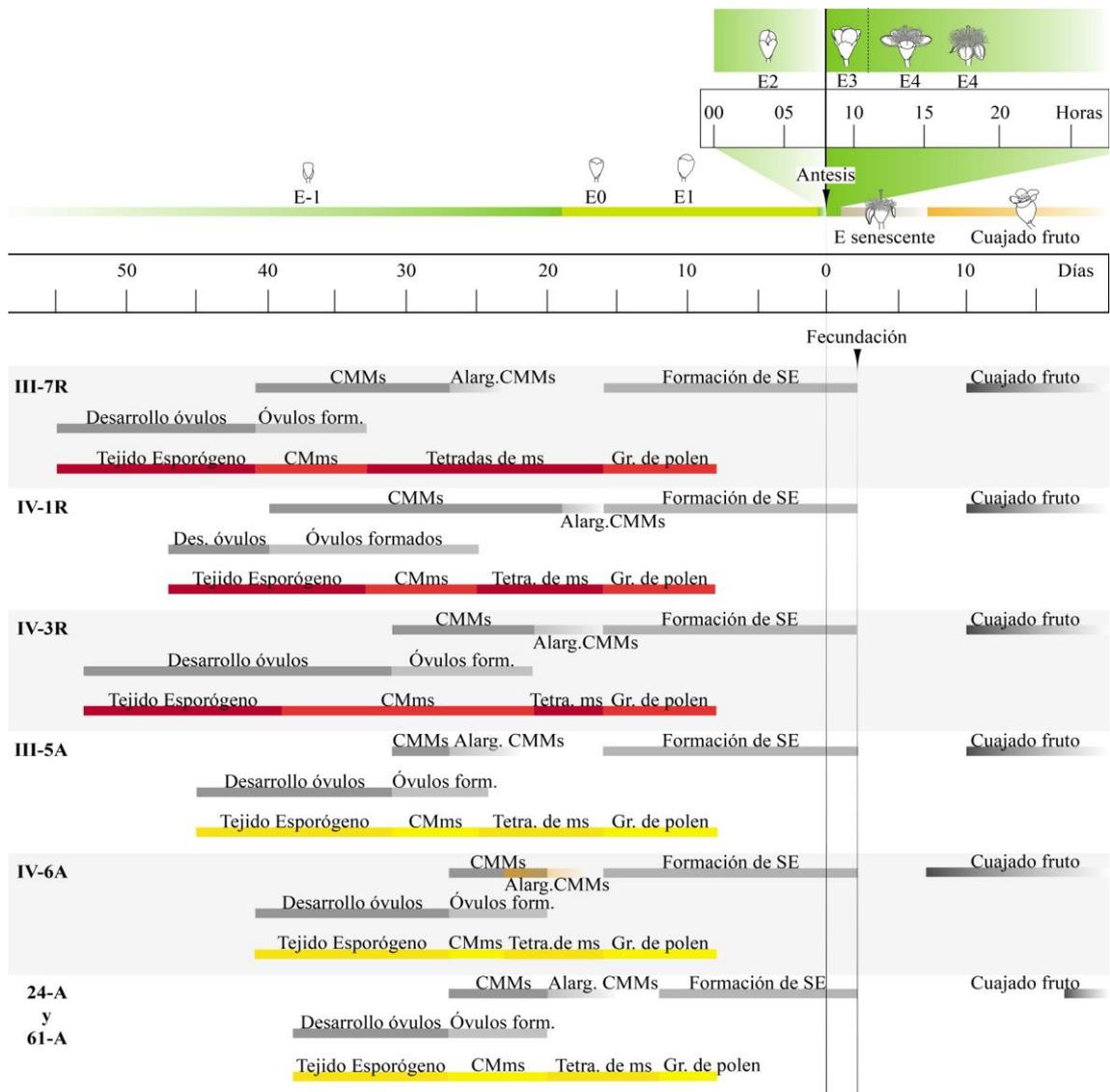


Figura 17. Esquema de Ontogenia y Fenología Intrafloral de los siete individuos analizados en esta tesis. En gris los procesos ontogenéticos del gineceo para todos los individuos. Los procesos ontogenéticos del androceo se muestran en rojo para *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y en amarillo para *Psidium cattleyanum* f. *lucidum*. Autor: Lic. Cristina Trujillo

Adicionalmente a estas diferencias se observó un desfase en los períodos de floración entre ambas formas (Speroni *et al.* 2012, Speroni *et al.* 2014b). Esto dificulta la polinización entre ellas, ya que en el corto período en que se solapan las floraciones deben darse las condiciones ideales, relacionadas por ejemplo, con la disponibilidad de polinizadores. Esta es una barrera reproductiva que se traduce en la ausencia de flujo genético entre ambas formas (Rieseberg y Willis, 2007) y por lo tanto es un elemento que aporta a la diferenciación entre *P. cattleyanum* f. *lucidum* y *P. c. f. cattleyanum*. La acumulación de diferencias genéticas entre los grupos lleva a separarlos adaptativamente y luego aislarlos genéticamente (Rieseberg y Willis, 2007).

En cruzamientos dirigidos de los individuos estudiados provenientes de la EEFAS se observó interfertilidad (Speroni *et al.*, 2012), lo que indica que potencialmente estas formas pueden cruzarse.

4.7 PERSPECTIVAS

Los resultados de esta tesis junto a los resultados obtenidos en el proyecto en el que se enmarca este trabajo arrojan luz al conocimiento de la biología reproductiva de *Psidium cattleyanum* y abren el camino hacia nuevas interrogantes.

Las anomalías detectadas en la formación de los granos de polen parecen tener correlación con los altos niveles de ploidía y especialmente con los niveles de ploidía impares. Sin embargo, esto no explica la marcada diferencia de viabilidad de polen entre los individuos heptaploides de arazá rojo. Para verificar esta correlación es necesario realizar estudios de viabilidad de polen comparando mayor número de genotipos de ploidías semejantes entre sí, así como de ploidías diferentes entre sí.

En los óvulos se forman sacos embrionarios no reducidos por diplosporia. Para establecer si la diplosporia que ocurre en *Psidium cattleyanum* es de tipo *Taraxacum* o de tipo *Antennaria*, se deben llevar adelante estudios citogenéticos de la megasporogénesis que permitan verificar si ocurre alguna división y qué ocurre con los cromosomas en ese proceso.

La ocurrencia de la apomixis puede ser facultativa, si se combina con la reproducción sexual en el ciclo reproductivo de la planta, u obligada, si es la única forma de formación de semillas del individuo. El tipo de apomixis que presenta *Psidium cattleianum* es una de las respuestas que está siendo abordada por el grupo de investigación del proyecto en el que se enmarca esta tesis, mediante tratamientos de polinizaciones manuales, análisis estadísticos de los resultados y análisis de progenie con marcadores moleculares especialmente desarrollados para la especie.

En los datos obtenidos en los abordajes anteriormente mencionados se constató que la polinización es necesaria para la fructificación. De estos resultados surge la interpretación de que es necesaria la fecundación de la célula media para formar el endosperma que alimentará al embrión. Los estudios de citometría de flujo de semillas que se están llevando en los materiales seleccionados apuntan a responder esta interrogante, a través de la determinación de los niveles de ploidía del tejido nutricional que se desarrolla en las semillas de *Psidium cattleianum*.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se realiza la primera descripción del desarrollo ontogenético del gametofito femenino y del gametofito masculino en la especie. Ambas formas analizadas de la especie, *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y *P. c.* f. *lucidum*, mostraron un desarrollo ontogenético típico de la familia y la tribu respecto a la mayoría de las características.

No se encontraron diferencias en las características del desarrollo ontogenético de los individuos analizados que ayuden a separar taxonómicamente a ambas formas de la especie.

Las orbículas (o cuerpos de Ubisch) encontradas en las paredes celulares del tapete de los sacos polínicos son un registro novedoso para la especie y para la tribu. Las glándulas secretoras se describen como de tipo esquizogeno-lisígenas, descripción que representa un aporte a la interpretación del origen y el tipo de estas estructuras en Myrtaceae.

Los sacos polínicos maduros presentaron anomalías como granos de polen deformes, tétradas vacías, acúmulos de células y células madre sin desarrollar. Estas fueron más frecuentes en las especies con menores valores de viabilidad de polen. Las anomalías encontradas se asocian en este trabajo a los altos niveles de ploidía de la especie y a las ploidías impares, y son consideradas las causantes de la baja viabilidad de polen.

Teniendo en cuenta los antecedentes de aposporia y embrionía adventicia citados para la familia se descartan en este trabajo ambas vías apomícticas para los materiales analizados por la falta de evidencias anatómicas. Se propone la formación de sacos embrionarios diplospóricos por la ausencia de meiosis de la célula madre de la megáspora. Esta interpretación es coincidente además con los bajos niveles de viabilidad de polen detectados, las anomalías halladas en la formación de los granos de polen y los distintos niveles de ploidía citados para la especie.

En este trabajo se logró establecer una relación entre fenología intrafloral y ontogenia para la especie. Esto implica una herramienta muy útil para continuar con las investigaciones sobre la biología reproductiva de la especie.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apel MA. 2001. Óleos voláteis de espécies da subtribo Eugeniinae (Myrtaceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória. Tese Doutorado em Farmácia. Porto Alegre, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 256pp
- Arathi HS, Ganeshiah KN, Uma Shaanker R, Hegde SG. 1996. Factor affecting embryo abortion in *Syzygium cuminii* (L). *International Journal of Plant Sciences*, **157**: 49–52.
- Asker S, Jerling L. 1992. Apomixis in plants. Florida: CRS Press.303pp
- Atchison E. 1947. Chromosome Numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany*, 34: 159–164.
- Beardsell DV, O'Brien SP, Williams EG, Knox RB, Calder DM. 1993. Reproductive biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*, 41: 511-526.
- Beardsell DV, Williams EG, Knox RB. 1989. The structure and histochemistry of the nectary and anther secretory tissue of the flowers of *Thryptomene calycina* (Lindl.) Stapf (Myrtaceae). *Australian Journal Botany*, 37:65- 80.
- Bernaschina Y, Pereyra G. 2014. Caracterización de frutos y biología de semillas de poblaciones silvestres de *Psidium cattleianum* Sabine, "arazá" (Myrtaceae). Tesis Ingeniero Agrónomo. Montevideo, Uruguay. Facultad Agronomía. Universidad de la República. 65pp
- Bicknell RA, Koltunow AM. 2004. Understanding Apomixis : Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell*, 16:228–245.
- Boesewinkel FD, Bouman, F. 1984. The seed: structure. En: Johri MB (Ed.).*Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- Bohte A, Drinnan A. 2005. Ontogeny, anatomy and systematic significance of ovular structures in the 'eucalypt group' (Eucalypteae, Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 255:17–39.

- Boland DJ, Sedgley M. 1986. Stigma and style morphology in relation to taxonomy and breeding systems in *Eucalyptus* and *Angophora* (Myrtaceae). *Austral Journal of Botany*, 34:569–584.
- Brighenti FL, Luppens SBI, Delbem ACB, Deng DM, Hoogenkamp MA, Gaetti-Jardim E, Dekker HL, Crielaard W, ten Cate JM. 2008. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on *Streptococcus mutans* viability, protein expression and acid production. *Caries Research*, 42:148–54.
- Brussa C, Grela I. 2007. Flora arbórea del Uruguay, con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Uruguay: COFUSA. 544 pp
- Burrows GE. 2000. An anatomical study of epicormic bud strand structure in *Eucalyptus cladocalyx* (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*, 48: 233–245.
- Caetano APS, Simão DG, Carmo-Oliveira R, Oliveira PE. 2013. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. *Plant Systematic and Evolution*, 299:1253–1262.
- Caetano APS. 2010. Apomixia y reproducción sexuada en especies de *Miconia* Ruiz & Pavon, Melastomataceae. Tesis de Mestrado en Biología Vegetal. Campinas, Sao Paulo, Brasil. Instituto de Biologia, Universidade estadual de Campinas.
- Campos LZO. 2010. Etnobotánica do gênero *Psidium* L. (Myrtaceae) no cerrado brasileiro. Tesis Maestría en Botánica. Brasilia, Brasil. Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Brasilia. 71 p.
- Cheyhiyan N. 1988. Stigma receptivity, flower seedling, flower abnormality and pollination studies in *Psidium* sp. *Madras Agricultura Journal* 75: 1-2, 29-32.
- Christensen JE, Horner HT, Lersten NR. 1972. Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor* (Gramineae). *American Journal of Botany*. 59:43–58.
- Ciccarelli D, Garbari F, Pagni AM. 2008. The flower of *Myrtus communis* (Myrtaceae): Secretory structures, unicellular papillae, and their ecological role. *Flora*, 203:85–93.

- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews Genetics*, 6: 836–46.
- Cortez PA, Carmello-Guerreiro SM, Teixeira SP. 2012. Understanding male sterility in *Miconia* species (Melastomataceae) a morphological approach. *Austral Journal of Botany*, 60, 506–516
- Costa IR. 2009. Estudos evolutivos em Myrtaceae: Aspectos citotaxonomicos e filogeneticos em Myrteae, enfatizando *Psidium* e generos relacionados. Tesis Doctorado en Biologia Vegetal. Campinas- SP, Brasil. Universidade Estadual de Campinas. 235p
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2007. Karyotype analysis in South American species of Myrtaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155: 571-580.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz et Pavon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia*, 59: 7- 13.
- Corner EJH. 1976. The seeds of dicotyledons. New York: Cambridge University Press.
- Dafni A y Firmage D. 1999. Pollen viability and longevity : practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 113–132.
- Dahlgren R, Thorne RF. 1984. The Order Myrtales : Circumscription, Variation, and Relationships. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71: 633–699.
- Davis GL. 1966. Systematic embryology of the Angiosperm. New York: John Wiley & Sons.
- Degener O. 1939. Flora Hawaiensis: the new illustrated flora of the Hawaiian islands, fam. 273. *Psidium cattleianum*. Honolulu: Publication privately. 2pp
- de Menezes TEC, Delbem ACB, Brighenti F L, Okamoto AC, Gaetti-Jardim E. 2010. Protective efficacy of *Psidium cattleianum* and *Myracrodruon urundeuva* aqueous extracts against caries development in rats. *Pharmaceutical Biology*, 48:300–305.
- De Souza ADG, Resende LV, De Lima IP, Martins LSS, Techio VH. 2014. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to

- Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. *Plant Systematics and Evolution*, 301(1): 231–237.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Acceso 23 de Mayo de 2005. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo JA, Guzmán AW, Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a Binary Tree. Obtained by average linkage of the Matrix of Euclidean Distances between treatment means. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* 7: 129-142.
- Donadio LC, Môro FV, Servidone AA. 2002. Frutas brasileiras. Jaboticabal: Novos Talentos. 288 p.
- Drehmer MAF. 2005. Efeitos do estágio de maturação e do manejo da temperatura sobre a fisiologia e qualidade pós-colheita de araçá-vermelho. Tesis Maestría en Producción Vegetal. Lages SC, Brasil. Universidade do Estado de Santa Catarina. 34p.
- Echlin P, Godwin H. 1969. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. III. The formation of the pollen grain wall. *Journal of Cell Science*, 5: 459–477.
- Ellshoff ZE, Gardnerl DE, Wickle C, Smith CW. 1995. Annotated bibliography of the genus *Psidium*, with emphasis on *P. cattleianum* (strawberry guava) and *P. guajava* (common guava), forest weeds in hawai'i. 105.
- Endress PK. 2011a. Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. *Annals of Botany*, 107:1465–89.
- Endress PK. 2011b. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany*, 98:370–96.

- Endress PK. 1982. Syncarpy and Alternative Modes of Escaping Disadvantages of Apocarpy in Primitive Angiosperms. *Taxon*, 31: 48–52.
- Erdtman G. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. New York: Hafner Publishing.
- Fetter MDR, Vizzotto M, Corbelini DD, Gonzalez TN. 2010. Propriedades funcionais de araçá-amarelo, araçá-vermelho (*Psidium cattleyanum* Sabine) e araçá-pera (*P. acutangulum* D.C.) cultivados em Pelotas/RS. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13: 92–95.
- Fidalgo ADO, Kleinert ADMP. 2009. Reproductive biology of six Brazilian Myrtaceae:-is there a syndrome associated with buzz-pollination? *New Zealand Journal of Botany*, 47:355–365.
- Franzon R, Campos LZO, Proenca CEB, Sousa-Siva JC. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrências, descrição e usos. Planaltina, DF. Embrapa Cerrados. (266). 48p.
- Franzon RC. Caracterização de Mirtáceas nativas do Sul do Brasil. 2004. Dissertação Mestrado em Agronomia. Pelotas, Brasil Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. 114 p.
- Franzon RC, Rasseira MdoCB, Correa ER. 2004 Potencialidades agrônômicas de algumas mirtáceas frutíferas nativas do Sul do Brasil. En: Rasseira M do CB, Antunes CLE, Trevisan R, Goncalves DE, (Eds). 2004. Espécies Frutíferas nativas do Sul do Brasil. Pelotas, R: Embrapa Clima temperado.124p
- Galati BG, Gotelli MM, Rosenfeldt S, Torretta JP, Zarlavsky G. 2010. Orbicules in relation to the pollination modes. En: Kaiser B J. (Ed.). *Pollen: Structure, Types and Effects*. New York: Nova Science Publishers, Inc. 15
- Gerrits PO, Smid L.1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscience*, 132:81–85

- Goldenberg R, Shepherd GJ. 1998. Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in 'cerrado' vegetation. *Plant Systematics and Evolution*, 211: 13–29
- Gotelli MM, Galati BG, Medan D. 2008. Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). *Annals of Botany Fennici*, 45: 81–96.
- Guerra M. 1998. Introdução a citogenética general. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 142pp
- Gurgel J, Soubiê Sobrinho J. 1951. Poliembryonia em Mirtáceas Frutíferas. *Bragantia*, 11: 141–163.
- Heslop-Harrison J. 1968. Pollen wall Development. *Science*, 161: 230–237.
- Hirano RT, Nakasone HY. 1969. Pollen germination and compatibility studies of some *Psidium* species. *Journal American Society Horticultural Science*, 94: 287-290.
- Hörandl E. 2010. The evolution of self-fertility in apomictic plants. *Sexual Plant Reproduction*, 23:73–86.
- Hörandl E, Jakubowsky G, Dobes C. 2001. Isozyme and morphological diversity within apomictic and sexual taxa of the *Ranunculus auricomus* complex. *Plant Systematics and Evolution*, 226:165–185
- Huenneke LF, Vitousek PM. 1990. Seedling and Clonal Recruitment of the Invasive Tree *Psidium cattleianum*: Implications for Management of Native Hawaiian Forests. *Biological Conservation*, 53: 199–211.
- Huysmans S, El-Ghazaly G, Smets E. 1998. Orbicules in Angiosperms: Morphology, Function, Distribution, and Relation with Tapetum Types. *The Botanical Review*, 64: 240–272.
- Johansen DA. 1940. *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Koltunow AM, Grossniklaus U. 2003. Apomixis: a developmental perspective. *Annual review of plant biology*, 54:547–74.
- Koltunow AM. 1993. Apomixis: Embryo Sacs and Embryos Formed without Meiosis or Fertilization in Ovules. *The Plant Cell*, 5:1425–1437.

- Koske RE, Gemma JN. 2006. Arbuscular mycorrhizae effects on growth of two Hawaiian species: Indigenous *Osteomeles anthyllidifolia* (Rosaceae) and invasive *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). *Pacific Science*, 60:471–482.
- Krishnamurthy KS, Uma Shaanker R, Ganeshiah KN. 1997. Seed abortion in an animal dispersed species, *Syzygium cuminii* (L.) Skeels (Myrtaceae): The chemical basis. *Curr. Sci.* 73: 869–876.
- Ladd PG, Parnell JAN, Thomson G. 1999. Anther diversity and function in *Verticordia* DC. (Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 219: 79–97.
- Landrum LR. 2003. A revision of the *Psidium salutare* complex (Myrtaceae). *Sida*, 20:1449–1469.
- Landrum LR, Kawasaki ML. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, 49: 508–536.
- Landrum LR, Bonilla J. 1996. Anther glandularity in the american Myrtinae (Myrtaceae). *Madroño*, 43: 58–68.
- Lee TD. 1984. The University of Chicago Patterns of Fruit Maturation : A Gametophyte Competition Hypothesis. *The American Naturalist*, 123: 427–432.
- Legrand D, Klein RM. 1977. Mirtáceas. En: Reitz PR(Ed.): *Flora Ilustrada Catarinense*. Parte 1. Itajaí: Herbario Barbosa Rodrigues. 158p.
- Legrand D. 1968. Las Mirtáceas del Uruguay, III. Uruguay: Boletín Facultad Agronomía. (Nº 101). 80p.
- Lestern NR, 2004. Flowering plants embryology. With emphasis on economic species. Iowa: Blackwell publishing. 212p.
- Li ZL. 1978. The technology of making sections in plant tissues. Beijing: Science Press, Beijing.
- Lucas EJ, Harris SA, Mazine FF, Belsham SR, Nic Lughadha EM, Telford A, Gasson PE, Chase MW. 2007. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). *Taxon*, 56: 1105–1128.

- Maheshwari P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. New York, U. S. A: McGraw-Hill Book Company, Inc. 453p.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient Sceer for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*, 21(1): 97-108.
- McVaugh R. 1968. The genera of American Myrtaceae an interim report. *Taxon*, 17: 354–418.
- Monje PV, Baran EJ. 2002. Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. *Plant Physiology*, 128:707–713.
- Morton J. 1987. Cattley Guava. En: Morton JF (Ed). *Fruits of warm climates*. Miami: Julia F. Morton. 363–364.
- Narayanaswami S, Roy SK. 1960. Embryology of the genus *Psidium*. *Journal of the Indian Botanical Society*, 39: 35–45.
- Natesh S, Rau MA. 1984. The Embyo. En: Johri MB (Ed.).*Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- Naumova TN. 2008. Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Cytology and Genetics*, 42:179–188.
- Nic Lughadha EM, Proença C. 1996. A Survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 83: 480–503.
- Nogler GA. 1984. Gametophytic Apomixis. En: Johri MB (Ed.).*Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- Page T, Moore GM, Will J, Halloran GM. 2010. Breeding behaviour of *Kunzea pomifera* (Myrtaceae): self-incompatibility, intraspecific and interspecific cross-compatibility. *Sexual Plant Reproduction*, 23:239–53.
- Pagliarini MS. 2000. Meiotic behavior of economically important plant species : the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and Molecular Research*, 1002: 997–1002.
- Patel VC, Skvarla JJ, Raven P. 1984. Pollen Characters in relation to the delimitation of Myrtales. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71: 858–969.

- Pimentel RR, Barreira NP, Spala DP, Cardim NB, Souza MC, Sá-Haiad B, Machado SR, Rocha JF, Santiago-Fernandes L D R. 2014. Development and evolution of the gynoecium in Myrteae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*. 62: 335–346.
- Podio M, Siena LA, Hojsgaard D, Stein J, Quarin CL, Ortiz JPA. 2012. Evaluation of meiotic abnormalities and pollen viability in aposporous and sexual tetraploid *Paspalum notatum* (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 298:1625–1633..
- Proença CEB, Gibbs PE. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist*, 126:343–354.
- Raghavan V. 2006. Double Fertilization. Embryo and endosperm development in flowering plants. Germany, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 249p.
- Raman A, Weir U, Bloomfield SF. 1995 Antimicrobial effects of tea tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters Applied Microbiology*, Oxford, 4: 242-245
- Rasseira M do CB, Antunes CLE, Trevisan R, Goncalves DE, (Eds). 2004. Espécies Frutíferas nativas do Sul do Brasil. Pelotas, R: Embrapa Clima temperado.124p
- Rasseira M do CB, Rasseira A. 1995. Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum*. Pelotas, RS: Embrapa-CPACT.95p
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science*, 317:910–914.
- Risso-Pascotto C, Pagliarini MS, Valle CB. 2006. Microsporogenesis in *Brachiaria dictyoneura* (Fig. & De Not.) Stapf (Poaceae: Paniceae). *Genetics and Molecular Research*, 5: 837–45.
- Risueño MC, Gimenez-Martín G, López-Sáez JF, García MIR. 1969. Origin and Development of Sporopollenin Bodies. *Protoplasma*, 374: 361–374.
- Rye B. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its Taxonomic Implications. *Austral Journal of Botany*, 27: 547–573.

- Santos CMR, Ferreira AG, Áquila MEA. 2004. Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae sativas do Rio Grande Do Sul. *Ciencia Forestal*, 14:13–20.
- Schmid R. 1984. Reproductive anatomy and morphology of Myrtales in relation to Systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71: 832-835
- Schmid R. 1980. Comparative Anatomy and Morphology of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*, and the Subfamilial and Tribal Classification of Myrtaceae. *Taxon*, 29 (5): 559–595.
- Silva L da, Pinheiro MC. 2007. Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 21: 235–247.
- Singhal VK, Gill BS, Bir SS. 1985. Cytology of woody species. *Proceedings: Plant Sciences* 94 (4-6): 607-618.
- Sobral M. 2003. A família Myrtaceae no Rio Grande do Sul. São Leopoldo: Unisinos. 215 p.
- Speroni G, Trujillo C, Millan C, Cabrera D, Vignale B. 2014a. Rol de la polinización en la biología reproductiva de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae). En: XI Congreso Latinoamericano de Botánica. 2014, Salvador, Bahía, Brasil. Acceso 23 de mayo de 2015. Disponible en: <http://botanica.org.br/ebooks>
- Speroni G, Millán C, Trujillo C, Vignale B, Cabrera D. 2014b. Fenología de la floración e intrafloral de materiales seleccionados de arazá (*Psidium cattleianum* Sabine) en Uruguay. En VI Encontro Sobre Pequenas frutas e frutos nativos do Mercosul. 2014. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil. Acceso 29 de mayo de 2015. Disponible en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102799/1/Pequenas-frutas-2014.pdf>
- Speroni G, Mazzella C, Vignale B, Pritsch C, Cabrera D, Bonifacino M, Quezada M, Silva MP, Jolochin G, Tardáguila A, Gaiero P, Millán C, Trujillo C. 2012. Estudios biológicos y taxonómicos de la especie frutal nativa *Psidium cattleianum*

- (Myrtaceae). En: Sexto encuentro nacional de Frutos nativos, 19 - 20 de Abril de 2012, Canelones, Uruguay, INIA, UdelaR, MGAP. SAD, 679. 69p
- Stanley RG, Linskens HF. 1974. Pollen biochemistry management. Berling Heidelberg: Springer. 307p.
- Stephenson AG. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology Systematics*, 12: 253–279.
- Teaotia SS, Phogot KPS, Srisvatava VS. 1970. Blossom biology studies inf *Psidium* species. *Progressive Horticulture*, 2:101-112.
- Tobe H, Raven PH. 1987. Embryology and systematic position of *Heteropyxis* (Myrtales). *American journal of Botany*, 74(2): 197–208.
- Tobe H, Raven PH. 1983. An embriyological analysis of Myrtales: its Definition and Characteristics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 70: 71-94.
- Thompson SL, Ritland K. 2006. A novel mating system analysis for modes of self-oriented mating applied to diploid and polyploid arctic Easter daisies (*Townsendia hookeri*). *Heredity*, 97:119–26.
- Tropicos.org. 2015 (En línea) Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. © 2015 Missouri Botanical Garden - 4344 Shaw Boulevard - Saint Louis, Missouri 63110. Acceso 23 de Mayo de 2015 Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/22106968>
- Turner GW. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *Botanical Review*, 65: 76–88
- van Baarlen P, de Jong H, van Dijk P. 2002. Comparative cyto-embryological investigations of sexual and apomictic dandelions (*Taraxacum*) and their apomictic hybrids. *Sexual Plant Reproduction*, 15(1): 1–38.
- van Went JL, Millemse MTM. 1984. Fertilization. En: Johri MB (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berling Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- van Wyk AE, Lowrey TK. 1988. Studies on the reproductive biology of *Eugenia* L. (Myrtaceae) in southern Africa. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 25: 279–293.

- van Wyk AE, Botha R. 1984. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in southern Africa: ontogeny and taxonomic value of the seed. *South African Journal of Botany*, 3:63-80.
- Vázquez SN, Vaio M, Gaiero P, Mazzella C. 2014. Caracterización cariotípica en poblaciones silvestres y genotipos seleccionados en programas nacionales de mejoramiento de arazá y guayabo del país. En: II Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Genética (2014, Montevideo, Uruguay).
- Verstraete B, Moon H-K, Smets E, Huysmans S. 2014. Orbicules in Flowering Plants: A Phylogenetic Perspective on their Form and Function. *The Botanical Review*, 80:107–134.
- Vignale B, Bisio L. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia*, 9: 35–39.
- Vijayaraghvan MR, Prabhakar K. 1984. The Endosperm. En: Johri MB (Ed.). *Embryology of Angiosperms*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer-Verlag.
- Volk GM, Lynch-Holm VJ, Kostman TA, Goss LJ, Franceschi VR. 2002. The Role of Druse and Raphide Calcium Oxalate Crystals in Tissue Calcium Regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biology*, 4:34–45.
- Whitton J, Sears CJ, Baack EJ, Otto SP. 2008. The Dynamic Nature of Apomixis in the Angiosperms. *International Journal of Plant Sciences*, 169 (1): 169–182 .
- Wilson PG. 2011. Myrtaceae. En Kubitzki K. (Ed.). *Families and Genera of Vascular Plants*. Berlin: Springer-Verlag (vol. 10).
- Wilson PG, O'Brien MM, Gadek PA, Quinn CJ. 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial group. *American journal of botany*, 88(11): 2013–2025.

7. ANEXOS.

Tabla 1. Materiales colectados y fijados en FAA, Estación experimental Facultad de Agronomía, Salto.

Fechas	Individuo IV3	Individuo III7	Individuo IV1	Individuo IV6	Individuo III5
19/9/2011	53 dpa	55 dpa	47 dpa		
26/09/2011	46 dpa	47 dpa	40 dpa		
3/10/2011	39 dpa	41 dpa	33 dpa	41 dpa	45 dpa
11/10/2011	31 dpa	33 dpa	25 dpa	33 dpa	37 dpa
17/10/2011	25 dpa	27 dpa	19 dpa	27 dpa	31 dpa
21/10/2011	21 dpa	23 dpa	15 dpa	23 dpa	27 dpa
26/10/2011	16 dpa				
29/10/2011		16 dpa	8 dpa	16 dpa	
3/11/2011	8 dpa				
4/11/2011			2 dpa		
5/11/2011			1 dpa		
6/11/2011		8 dpa	Antesis	8 dpa	
7/11/2011			1dpta		
9/11/2011	2 dpa		2 dpta		
10/11/2011	1 dpa				
11/11/2011	Antesis				
12/11/2011	1 dpta	2 dpa		2 dpa	
13/11/2011	2 dpta	1 dpa		1 dpa	
14/11/2011		Antesis		Antesis	
15/11/2011		1dpta		1 dpta	2dpa
16/11/2011		2 dpta		2 dpta	1dpa
17/11/2011					Antesis
18/11/2011					1 dpta
19/11/2011			10 dpta		2 dpta
21/11/2011	10 dpta				
22/11/2011		7 dpta			
24/11/2011				10 dpta	7 dpa

dpa. Días pre antesis

dpta. Días post antesis

Tabla 2. Materiales colectados y fijados en FAA,
Estación Las Brujas INIA, Canelones.

Fechas	Individuo 24	Individuo 61
19/10/2012	40 dpa	40 dpa
25/10/2012	34 dpa	34 dpa
1/11/2012	28 dpa	28 dpa
8/11/2012	21 dpa	21 dpa
15/11/2012	14 dpa	14 dpa
21/11/2012	8 dpa	8 dpa
27/11/2012	2 dpa	2 dpa
28/11/2012	1 dpa	1 dpa
29/11/2012	Antesis	Antesis
30/11/2012	1 dpta	1 dpta
1/12/2012	2 dpta	2 dpta
15/11/2012	17 dpta	17 dpta

dpa. Días pre antesis

dpta. Días post antesis