



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Frecuencia de apomixis y rol de la pseudogamia en *Psidium cattleianum* (Myrtaceae): ontogenia y niveles de ploidía en estructuras seminales

Claudia Da Luz-Graña

Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Setiembre 2021

**Frecuencia de apomixis y rol de la
pseudogamia en *Psidium cattleianum*
(Myrtaceae): ontogenia y niveles de
ploidía en estructuras seminales**

Claudia Da Luz-Graña

Magíster en Ciencias Agrarias
Opción Ciencias Vegetales

Setiembre 2021

Tesis aprobada por el tribunal integrado por Ing. Agr. PhD. Clara Pritsch, Ing. Agr. PhD. Pablo Speranza e Ing. Agr. Dra. Ana María González, el (9) de setiembre de 2021. Autora: Lic. en Química Claudia Da Luz Graña. Directora Lic. Dra. Gabriela Speroni, Co-directora Lic. Dra. Magdalena Vaio.

AGRADECIMIENTOS

Hoy llego al final de un recorrido que empezó ya hace un tiempo. Por eso quiero agradecer a todos los que estuvieron y compartieron mi camino o parte de él. Todos importantes porque todo suma en la aventura de la vida...

En primer lugar, agradezco a la Comisión Sectorial de Investigación Científica que a través del programa Proyectos I+D y MIA financió distintas actividades, sin las cuales no hubiera podido realizar esta tesis. Al programa Proyectos Iniciación a la Investigación que junto a la Comisión Académica de Posgrados de la Universidad de la República Uruguay financiaron mis estudios de posgrado.

A la Comisión de Posgrados de Facultad de Agronomía donde realicé mis estudios. Siempre atentos, eficientes y cordiales.

A mi amado país, por la libertad que le da al ser y a la Universidad de la República por los principios éticos por los que se rige. Un honor y un orgullo de formar parte.

A mis tutoras y maestras Gabriela Speroni y Magdalena Vaio quienes me acompañaron durante todo el camino, enseñándome, guiándome, aconsejándome, corrigiéndome, sosteniéndome y creyendo en mí. Gracias.

Al comité asesor Cristina Mazzella, Beatriz Vignale y Clara Pritsch y a los integrantes del Tribunal Ana María González, Pablo Speranza y Clara Pritsch por sus sugerencias, comentarios y aportes.

A Beatriz Vignale y su equipo, por permitirnos trabajar con sus tan preciadas y cuidadas plantas, y por colectarme frutos durante todo un verano salteño.

A Joerg Fuchs y a Andreas Houben por su generosidad y cordialidad al recibirme y ayudarme a concretar la pasantía. Joerg gracias por enseñarme y por dejarme trabajar en tu laboratorio como si fuera mío.

A Alejandra Borges por su colaboración.

A mi amiga Gabriela Jolochín, siempre dispuesta a ayudar, en las alegrías y en las tristezas, compartiendo sus conocimientos con una sonrisa. Genia!

A Meche y Crischis con quienes compartí vida, trabajo, conversaciones profundas, catarsis y amor por la investigación.

A todos en el Laboratorio de Botánica, en el Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas y en el Laboratorio de Biotecnología de Facultad de Agronomía.

A Eduardo Alonso Paz y María Julia Bassagoda por mostrarme el fascinante mundo de las plantas, contagiarme el entusiasmo por la investigación, enseñarme tanto y dejarme volar.

A mis compañeros del Labot, en particular a Gastón.

Al Departamento de Química Orgánica de Facultad de Química.

A María Laura Gómez, por ayudarme tantas veces.

A mi esposo, compañero de vida y más aún mi llama gemela, te amo.

A mis hermosos hijos que, aunque no entienden por qué mamá estudia y trabaja tanto, siempre la esperan con abrazos amorosos que recargan de energía.

A mi papá, mamá y abuelas que son mis grandes maestros de vida.

Al universo y a mis ancestros, por iluminar mi camino.

A mi madre y padre elevados que me dieron la vida para poder experimentar y evolucionar.

Y finalmente quiero agradecer a las plantas con las que trabajé, III5, IV6, IV1 y IV7. Hermosos seres que me permitieron trabajar en ellas, me brindaron sus semillas y me contaron sus secretos.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY	IX
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>.....	1
2. <u>ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DEL EMBRIÓN EN</u>	
<u>SEMILLAS POLIPLOIDES DE <i>Psidium cattleyanum</i> (MYRTEAE,</u>	
<u>MYRTACEAE)</u>	7
2.1. RESUMEN	7
2.2. SUMMARY	8
2.3. INTRODUCCIÓN	9
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.4.1. <u>Material vegetal</u>	13
2.4.2. <u>Polinizaciones manuales</u>	14
2.4.3. <u>Procesamiento de las semillas</u>	15
2.5. RESULTADOS	15
2.5.1. <u>Embrión originado por plantas octoploides</u>	18
2.5.2. <u>Embrión originado por plantas heptaploides</u>	22
2.5.3. <u>Endospermo</u>	24
2.5.4. <u>Nucelo</u>	26
2.5.5. <u>Cubierta seminal</u>	28
2.5.5.1. Tegumento externo	29
2.5.5.2. Tegumento interno.....	32
2.5.6. <u>Placenta</u>	33
2.6. DISCUSIÓN	38
2.6.1. <u>Embrión</u>	40
2.6.2. <u>Endospermo</u>	41
2.6.3. <u>Nucelo</u>	42

2.6.4. <u>Cubierta seminal</u>	44
2.6.4.1. Tegumento externo	45
2.6.4.2. Tegumento interno.....	47
2.6.5. <u>Placenta</u>	49
2.7. CONCLUSIONES	50
2.8. BIBLIOGRAFÍA	51
3. <u>APOMIXIS FACULTATIVA PSEUDÓGAMA EN <i>Psidium cattleianum</i></u> <u>SABINE (MYRTACEAE): DIVERSIDAD DE ORÍGENES DEL EMBRIÓN Y</u> <u>EL ENDOSPERMO DETERMINADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN</u> <u>SEMILLAS</u>	60
3.1. RESUMEN	60
3.2. SUMMARY	61
3.3. INTRODUCCIÓN	62
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	66
3.4.1. <u>Material vegetal</u>	66
3.4.2. <u>Polinizaciones manuales</u>	67
3.4.3. <u>Citometría de Flujo</u>	68
3.4.4. <u>Análisis Estadístico</u>	69
3.5. RESULTADOS	69
3.5.1. <u>Balances embrión:endospermo</u>	69
3.5.2. <u>Niveles de ploidía de gametofitos, embrión y endospermo</u>	73
3.5.3. <u>Apomixis vs sexualidad</u>	74
3.6. DISCUSIÓN.....	76
3.6.1. <u><i>Psidium cattleianum</i> presenta apomixis facultativa</u>	77
3.6.2. <u>La meiosis ocurre en <i>Psidium cattleianum</i>, aunque en baja proporción</u> .	81
3.6.3. <u>Gameto masculino reducido y no reducido</u>	82
3.6.4. <u>Contribución materna-paterna en la formación del endospermo</u>	84
3.7. BIBLIOGRAFÍA	86
4. <u>DISCUSIÓN</u>.....	95

5. <u>CONCLUSIONES</u>	100
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	101

RESUMEN

Psidium cattleianum Sabine, 'arazá', es una especie poliploide nativa de Uruguay y Brasil. Existen varias evidencias que sugieren que el modo de reproducción es por apomixis, tanto autónoma como pseudógama. En este trabajo se plantea describir los estadios del desarrollo ontogenético de la semilla de plantas heptaploides (7x) de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y octoploides (8x) de *P. cattleianum* f. *lucidum*, para establecer el origen de las estructuras seminales en la madurez y contribuir al conocimiento taxonómico y de su biología reproductiva. Además, mediante citometría de flujo aplicada en semillas, se propone 1) Determinar si presenta apomixis facultativa, 2) Establecer la frecuencia de apomixis y sexualidad y 3) Analizar la contribución materna-paterna a la formación del endospermo. Las semillas se obtuvieron de cruzamientos dirigidos entre individuos de frutos rojos 7x y frutos amarillos 8x. Para el análisis ontogenético se procesaron diferentes estadios de desarrollo de las semillas por la técnica de inclusión en parafina. Para la citometría de flujo se analizaron individualmente 492 semillas maduras. Las observaciones anatómicas mostraron que las semillas adoptan forma campilótropa. El patrón del embrión es globular, cordiforme y torpedo, para finalmente curvar el eje hipocótilo-radícula (h-r) y adoptar forma de 'C', los cotiledones en la madurez están bien desarrollados y recostados al eje h-r. El nucelo forma una hipostasa y el endospermo nuclear persiste en la semilla madura. La cubierta seminal, formada por el tegumento externo, presenta sarcotesta a nivel de la epidermis y lignifica el mesotegumento. El micrópilo está rodeado de un opérculo formado por el tegumento interno esclerosado. La placenta penetra en el micrópilo de la semilla en desarrollo y actúa como vía nutricional. La apomixis se presentó en un 86,2 % de las semillas analizadas, la sexualidad en un 13,4 % y la partenogénesis haploide en un 0,4 %. Las madres de ploidía par (8x) presentaron ocho veces más eventos sexuales que aquella de ploidía impar (7x) donde predominaron los eventos apomícticos. El análisis de semillas permitió confirmar que *Psidium cattleianum* es principalmente pseudógama con un balance embrión:endospermo 2:5 y facultativa mostrando varias otras combinaciones de células reproductivas del saco embrionario y gametos masculinos.

Palabras clave: ontogenia, semilla, poliploidía, apomixis-facultativa, diplosporia

Apomixis frequency and role of pseudogamy in *Psidium cattleyanum*
(Myrtaceae): ontogenetic studies and ploidy levels in seminal structures

SUMMARY

Psidium cattleyanum Sabine, 'arazá', is a polyploid species native to Uruguay and Brazil, several evidence suggest it is an autonomous and pseudogamous apomictic species. The aim of this work is to describe the stages of ontogenetic development of seeds of heptaploid (7x) *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* and octoploids (8x) *P. cattleyanum* f. *lucidum* individuals, to establish the origin of the seminal structures at maturity and contribute to the taxonomic knowledge and reproductive biology. In addition, through flow cytometry applied to seeds, it is proposed to 1) Determine if it presents facultative apomixis, 2) Establish the frequency of apomixis and sexuality and 3) Analyze the maternal-paternal contribution to the endosperm. The seeds were obtained from directed crosses among 7x and 8x individuals. For ontogenetic analysis, different stages of seed development were processed by the paraffin inclusion technique. For flow cytometry, 492 mature seeds were individually analyzed. Anatomical observations showed that seeds adopt a campylotropic shape. The embryo is globular, cordiform and torpedo, to finally curve the hypocotyl-radicle axis (h-r) and adopt a 'C' shape. Cotyledons at maturity are well developed and lying on the h-r axis and the nucellus forms a hypostase and the nuclear endosperm persists in mature seed. The seminal covering, presents sarcotes at the level of the epidermis and lignifies the mesotegument. The micropil is surrounded by an operculum formed by the sclerosed internal integument. The placenta penetrates the micropyle of the developing seed and acts as a nutritional pathway. Apomixis was present in 86.2% of the analyzed seeds, sexuality in 13.4% and haploid parthenogenesis in 0.4%. Mothers with even ploidy (8x) showed eight times more sexual events than those with odd ploidy (7x) where apomixis predominates. Seed analysis confirmed that *Psidium cattleyanum* is mainly pseudogamous with an embryo: endosperm 2: 5 ratio and facultative showing various other combinations of embryo sac reproductive cells and male gametes.

Keywords: ontogeny, seed, polyploidy, facultative-apomixis, diplospory

1. INTRODUCCIÓN

Psidium cattleianum Sabine (Myrtaceae), conocido vulgarmente como arazá, es un árbol nativo de Uruguay que produce frutos carnosos comestibles de agradable sabor. En el año 2000 fue elegido, junto a otras especies de la familia Myrtaceae, para ser incluido en el Programa de Selección de Frutos Nativos de Uruguay con potencial comercial (Facultad de Agronomía, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). La propuesta del programa es incluir nuevos cultivos comerciales en el sector productivo, distintos a los tradicionales (básicamente exóticos), aumentando así la diversidad para los consumidores y promoviendo productos con identidad nacional (Vignale y Bisio 2005). En particular el arazá fue elegido no sólo por su agradable sabor, sino también por sus propiedades nutraceuticas (Biegelmeier et al. 2011, Feippe et al. 2010, Feippe et al. 2008, Martínez et al. 2008, Natchigal 1994), excelentes condiciones para la elaboración de dulces, jaleas y bebidas (Benevenga et al. 2012) y por la buena sanidad bajo cultivo (Vignale y Bisio 2005).

Psidium cattleianum es una especie poliploide que se distribuye naturalmente en la Floresta Atlántica brasileña hasta el sureste uruguayo (Govaerts et al. 2008, Legrand y Klein 1977). Para esta especie fueron registrados niveles de ploidía $2n=3x=33$, $2n=4x=44$, $2n=5x=55$, $2n=6x=66$, $2n=7x=77$, $2n=8x=88$, $2n=9x=99$, $2n=10x=110$ y $2n=12x=132$ (Machado et al. 2022, Machado y Forni-Martins 2022, Machado et al. 2020, Vázquez 2014, Costa y Forni-Martins 2006, Raseira y Raseira 1996, Singhal et al. 1985, Atchinson 1947). Dentro de *Psidium cattleianum* se reconocen individuos que producen frutos de cáscara roja y otros que producen frutos de cáscara amarilla. Sabine en 1821 fue el primer botánico que describió la especie en base a material cultivado en Inglaterra, supuestamente obtenido a partir de semillas provenientes de China, el cual producía frutos de coloración roja. Posteriormente Degener en 1939 describió la forma *P. cattleianum* f. *lucidum* basándose en materiales de frutos amarillos, para diferenciarlos de la forma típica *P. cattleianum* f. *cattleianum* de frutos rojos. Ambas entidades infraespecíficas son similares vegetativamente y se diferencian claramente, además de por la coloración de sus frutos, por el tamaño y consistencia de sus flores (Millán 2015, Speroni et al.

2012). Los registros nacionales de herbario de la especie cuentan con muestras que incluyen sólo órganos vegetativos y carecen de flores o frutos, por lo que la verdadera distribución de ambas entidades taxonómicas no se distingue a través de estos datos. Trabajos recientes en nuestro país indican que las poblaciones silvestres de la especie son escasas y todas están integradas por plantas de frutos amarillos (Bernaschina y Pereyra 2014, Speroni et al. 2012). No se encontraron individuos de frutos rojos creciendo de manera natural por lo que estos serían cultivados y no silvestres (Speroni et al. 2012). En los Jardines de Introducción del Programa de Selección de Frutos Nativos con potencial comercial de la Estación Experimental Facultad de Agronomía Salto (EEFAS) y en la Estación Experimental Las Brujas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA LB), ambas formas se encuentran cultivadas y se evalúan agronómicamente materiales seleccionados.

La propagación vegetativa a través de injertos o estacas es la más extendida en la mayoría de los cultivos comerciales de frutos tradicionales, dado que la descendencia mantiene las mismas características de la planta madre. En el caso del arazá, la propagación por estacas mostró bajos porcentajes de enraizamiento, principalmente por la presencia de compuestos fenólicos que ocasionan la oxidación de los tejidos y determinan que ciertas técnicas tradicionales no sean viables económicamente (Franzon et al. 2009, Fachinello et al. 1993). Sin embargo, la propagación por semillas mostró altos porcentajes de germinación (Bernaschina y Pereyra 2014, Raseira y Raseira 1996). Tanto en los materiales cultivados en Embrapa Clima Templado en Brasil, como en los cultivados en la EEFAS y en INIA LB en Uruguay, se ha obtenido una buena propagación por semilla (Tomaz et al. 2011, Vignale y Bisio 2005, Franzon et al. 2004).

La semilla madura de arazá es exalbuminada (Rotman 1976), así como en las otras especies del género *Psidium* (Vijayaraghvan y Prabhakar 1984, Roy 1953) y demás especies de la familia estudiadas (Tobe y Raven 1983, Schmid 1980). En estas semillas, el endospermo es consumido por el embrión en el proceso de maduración seminal. El interior de la semilla madura está ocupado por el embrión y sólo quedan relictos de endospermo en la periferia del mismo (Nic Lughadha y Proença 1996). En arazá se ha observado que la descendencia obtenida en la germinación de semillas es

muy homogénea, tanto en materiales brasileños (Raseira y Raseira 1996) como en uruguayos cultivados en la EEFAS (Vignale y Bisio 2005). Manshardt y Aradhya (1990) analizaron la variabilidad genética de la progenie de *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* y de *P. cattleyanum* f. *lucidum* utilizando isozimas como marcadores y encontraron alta tasa de uniformidad. En estudios de polinización llevados adelante en materiales brasileños se registró fructificación en flores previamente emasculadas y aisladas de la llegada de polen (Raseira y Raseira 1996). Todos estos antecedentes nacionales y regionales condujeron a la hipótesis que la formación del embrión en las semillas de *P. cattleyanum* ocurre por vía apomíctica, donde el embrión no se forma a partir de la fecundación, sino a partir de células de la planta madre y mantienen las mismas características que ésta (Nogler 1984). Este tipo de reproducción asexual fue citado por Davis (1966) para representantes de la subfamilia Myrtoideae, mientras que Nic Lughadha y Proença (1996) reportan apomixis para el género *Syzygium* dentro de la familia Myrtaceae.

En tratamientos de polinizaciones manuales llevados adelante en materiales heptaploides de *Psidium cattleyanum* f. *cattleyanum* y octoploides de *P. cattleyanum* f. *lucidum*, seleccionados y cultivados en EEFAS e INIA LB, determinó que ambas formas necesitan de un vector de polinización y la fructificación se da sólo cuando llega polen viable al estigma, sin importar su origen (Speroni et al. 2015), con lo que se descarta la apomixis autónoma. En estudios ontogénicos del saco embrionario de los mismos materiales se identificó la célula madre de la megáspora pero no los procesos meióticos de la megasporogénesis por lo que se concluyó que el origen del saco embrionario no reducido se realiza por vía diplospórica (Souza-Pérez y Speroni 2017). Estudios realizados sobre la ontogenia y viabilidad de los granos de polen en las mismas plantas mostraron diversas anormalidades en la formación de los granos de polen que afectan la funcionalidad final de los mismos, detectada en la variación de los valores de viabilidad dentro de una misma planta y entre plantas de diferente coloración de frutos y niveles de ploidía (Souza-Pérez et al. 2021).

Todos estos antecedentes nacionales y regionales evidencian que la formación del embrión en las semillas de *Psidium cattleyanum* ocurre por vía apomíctica diplospórica y que necesita de la polinización (pseudogamia). La diplosporia es una

de las formas de apomixis gametofítica, donde el saco embrionario se origina a partir de la célula madre de la megáspora, ya sea por mitosis o luego de una falla en las etapas iniciales del proceso meiótico (Richards 2003, Maheshwari 1950). Los sacos embrionarios así formados contienen un gameto femenino diploide ($2n$), la oósfera, a partir de la cual se desarrolla directamente el embrión por partenogénesis, sin que exista fecundación. La ausencia de reducción permite que el embrión formado por partenogénesis también tenga una ploidía $2n$, siendo el contenido genético igual que el de la madre (Nogler 1984).

En la apomixis gametofítica la partenogénesis excluye uno de los procesos de la doble fecundación: la unión del gameto masculino con el femenino. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de la célula media. En algunos casos el endospermo puede desarrollarse en forma autónoma (sin la unión de un gameto masculino con los núcleos polares del saco embrionario apospórico o diplospórico), pero en muchas especies apomícticas es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula media del saco embrionario para formar el endospermo. A este proceso se lo llama pseudogamia (Nogler 1984). En el caso de apomixis pseudógama se origina un embrión de ploidía $2n$ y un endospermo de ploidía $5n$, mientras que en una apomixis autónoma se origina un embrión de ploidía $2n$ y un endospermo de ploidía $4n$ (Matzk et al. 2000).

La formación de sacos embrionarios reducidos o no reducidos y la alternativa de que ocurra fecundación o no de los mismos, genera diferentes balances de contenidos de ADN nuclear entre células del embrión y del endospermo (Matzk et al. 2000). La técnica de citometría de flujo permite cuantificar el contenido de ADN por núcleo en poblaciones de células de diferentes tejidos. Por tanto, a partir de estos resultados e información de referencia es posible inferir el nivel de ploidía de un tejido (Doležel 1991). Recientemente, se comenzó a utilizar con más frecuencia ésta técnica en semilla madura para determinar la relación entre la ploidía del embrión y endospermo. La citometría de flujo en semillas (flow cytometric seed screen, FCSS) se basa en determinar los distintos contenidos de ADN presentes en la semilla y la relación que existe entre los mismos. Una semilla con una relación de contenido de ADN entre embrión y endospermo de 2:3 por ejemplo corresponde a aquellas

semillas originadas por sexualidad (doble fecundación con gametos reducidos), mientras que aquellas con una relación 2:4 son originadas por apomixis autónoma (partenogénesis diploide y desarrollo autónomo de la célula media para la formación del endospermo) y 2:5 las originadas por apomixis pseudógama (partenogénesis diploide y fecundación de la célula media para la formación del endospermo) (Matzk et al. 2000). La técnica de FCSS ha sido utilizada en distintos grupos de plantas y con distintos tipos de semilla, inclusive en especies con semillas exalbuminadas (Hörandl 2010, Krahulcová y Rotreklová 2010, Matzk et al. 2000), permitiendo detectar y cuantificar todos los modos de reproducción.

Con los antecedentes anteriormente expuestos, se plantea la necesidad de determinar la frecuencia del origen apomíctico del embrión y confirmar la condición pseudógama para la formación del endospermo en semillas de materiales de *Psidium cattleyanum* seleccionados y obtenidas de polinizaciones dirigidas. La relación de los contenidos de ADN de los núcleos de las células del embrión y del endospermo medidos por el citómetro de flujo nos permitirá establecer la frecuencia de la apomixis en la formación de las semillas y si la formación del endospermo ocurre en forma autónoma (endospermo 4n) o si efectivamente necesita de la polinización para el proceso de fecundación (endospermo 5n). Para procesar las semillas en el citómetro de flujo y lograr poblaciones de núcleos que permitan diferenciar los distintos niveles de ploidía de endospermo y embrión, es necesario trabajar con semillas con una proporción de endospermo y embrión perceptibles por el equipo. La semilla madura de arazá es exalbuminada, por lo que se deberá establecer el estadio de desarrollo de la semilla donde es posible detectar los contenidos de ADN de embrión y endospermo con el citómetro de flujo. Para la selección del estadio seminal con la proporción indicada es necesario llevar adelante estudios ontogenéticos que permitan establecer este estadio.

El objetivo general de este trabajo es establecer la frecuencia del origen apomíctico del embrión y el origen del endospermo en semillas de materiales seleccionados de *Psidium cattleyanum* y el rol de la polinización, para contribuir al

conocimiento de la biología reproductiva de una especie frutal nativa incluida en el Programa de Selección de Frutos nativos con potencial económico.

Se establecen los siguientes objetivos específicos: 1. Describir el desarrollo ontogénico del embrión y endospermo de plantas heptaploides de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y plantas octoploides de *P. cattleianum* f. *lucidum*, para establecer las proporciones relativas de ambas estructuras a lo largo del desarrollo de la semilla exalbuminada; 2. Determinar los niveles de ploidía del embrión y del endospermo en ambas entidades taxonómicas para interpretar el origen reproductivo de ambas estructuras y definir la vía reproductiva que actúa en su formación.

2. ELUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA Y DEL EMBRIÓN DE SEMILLAS POLIPLOIDES DE *PSIDIUM CATTLEYANUM* SABINE (MYRTEAE, MYRTACEAE)

Claudia Da Luz^{1,2,3*}, Magdalena Vaio² y Gabriela Speroni³

¹Laboratorio de Botánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Isidoro de María 1614, Montevideo, Uruguay.

<https://orcid.org/0000-0002-5233-8252>.

²Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 809, Montevideo, Uruguay.

³Laboratorio de Botánica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay.

*cdaluz@fagro.edu.uy

2.1. RESUMEN

Introducción: Una semilla, sexual o asexual (apomíctica), es un óvulo maduro que consta de cubierta protectora, tejido nutricio y embrión. En Myrtaceae la forma del embrión y la consistencia de la cubierta seminal han sido utilizadas en las clasificaciones taxonómicas. Los escasos estudios en *Psidium cattleyanum* se han realizado en semilla madura, y por esto se desconoce el origen de cada estructura. Un análisis ontogenético aporta caracteres taxonómicos que contribuyen a la filogenia de la familia.

M&M: Las semillas en desarrollo, obtenidas de cruzamientos dirigidos entre accesiones de *Psidium cattleyanum* octoploides y heptaploides, se colectaron a 22, 29, 36, 43, 50, 57 y 67 días post-polinización. Fueron fijadas en FAA y procesadas por la técnica de inclusión en parafina para obtener cortes anatómicos seriados.

Resultados: Las semillas maduras adoptan forma campilótropa, con el interior seminal en forma de 'C'. La morfología que sigue el embrión en su desarrollo es secuencialmente globular, cordiforme y torpedo, para finalmente curvar el eje hipocótilo-radícula (h-r) y adoptar forma de 'C'. Los cotiledones, en la madurez, están bien desarrollados y se

encuentran recostados al eje h-r. El nucelo forma una hipostasa y el endospermo persiste en la semilla madura. La cubierta seminal formada por el tegumento externo genera sarcotesta a nivel de la epidermis y lignifica el mesotegumento. El micrópilo está rodeado de un opérculo formado por el tegumento interno. La placenta penetra en el micrópilo como vía nutricional.

Conclusiones: Las semillas de *Psidium cattleianum* son de tipo mesotestal-seed, presentan sarcotesta, hipostasa, opérculo y endospermo.

Palabras clave

semilla, poliploide, opérculo, sarcotesta, hipostasa, placenta intrusiva

2.2. SUMMARY

Introduction: Sexual or asexual (apomictic) seed is a mature ovule with seed-coat, nutritive tissue, and embryo. Embryo shape and seed-coat consistency have been used in taxonomic classifications of Myrtaceae. The few studies on *Psidium cattleianum* have been carried out on mature seed, where the origin of each structure is not known. An ontogenetic analysis generates information that might contribute to the phylogeny of the family.

M&M: Developing seeds, obtained from directed crosses between two accessions of *Psidium cattleianum* octoploids and two heptaploids, were collected at 22, 29, 36, 43, 50, 57 and 67 days post-pollination. They were fixed in FAA and processed by the paraffin embedding technique.

Results: The seeds adopt a campylotropic form, with the seminal interior in the shape of a 'C'. The morphology that the embryo follows in its development is globular, cordiform and torpedo, to finally curve the hypocotyl-radicle axis and adopt a 'C' shape. The cotyledons, at maturity, are well developed and lie on the hypocotyl-radicle axis. The nucellus forms a hypostase and the nuclear endosperm persists in the mature seed. The seminal cover is formed by the external integument, which sarcotestal epidermis and mesotegument lignificated. The micropyle is surrounded by an operculum exclusively formed by the internal integument. The placenta penetrates the micropyle to the base of the nucellus

Conclusions: The seeds of *Psidium cattleianum* are of the mesotestal-seed type, they present sarcotesta, hypostase, operculum and endosperm.

Keywords

seed, polyploidy, operculum, sarcotesta, hipostase, intrusive placenta

2.3. INTRODUCCIÓN

Una semilla puede generarse por diferentes vías reproductivas, en general el proceso es sexual pero también puede darse de forma asexual (apomixis). Cuando la vía es sexual la semilla se define como un óvulo maduro fecundado que posee un embrión, material de reserva (algunas veces ausente) y una o varias cubiertas protectoras (Kozłowski & Gunn, 1972 en Bhojwani & Bhatnagar, 1974). En el proceso sexual, luego de la doble fecundación, el cigoto forma el embrión, la célula endospermogénica origina el endospermo y los tegumentos del óvulo forman la cubierta seminal o testa (Boesewinkel & Bouman, 1984). Cuando la vía es asexual o apomíctica se elude la reducción meiótica y la fecundación. El óvulo desarrolla una semilla cuyo embrión contiene exactamente el mismo genotipo que la planta que lo origina. Los embriones apomícticos pueden formarse a través de una ruta esporofítica o gametofítica. En la primera, también llamada embrionía adventicia, los embriones surgen directamente de una célula somática de la nucela o de los tegumentos del óvulo. En la apomixis gametofítica se forman sacos embrionarios que difieren en algunos aspectos del gametofito femenino haploide (n) generado a partir de la megáspora funcional. Su principal diferencia es que presenta el mismo número cromosómico que el esporofito ($2n$), ya que los núcleos que lo conforman no provienen del proceso meiótico y por lo tanto no han reducido su número cromosómico. Por eso se dice que estos sacos embrionarios surgen por un proceso de apomeiosis (sin meiosis). De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario, la apomixis gametofítica puede ser clasificada como: diplospórica, cuando el saco embrionario se origina a partir de la célula madre de la megáspora misma, ya sea por mitosis o luego de una falla en la meiosis, o aposporia cuando el saco embrionario se origina directamente por mitosis a partir de una célula somática, usualmente una célula del nucelo (Maheshwari, 1950; Richards, 2003). Los sacos

embrionarios, sean éstos apospóricos o diplospóricos, contienen un gameto femenino $2n$, la oósfera, a partir de la cual se desarrolla directamente el embrión por partenogénesis sin que exista fecundación. En la apomixis gametofítica, la partenogénesis excluye uno de los procesos de la doble fecundación: la unión de un gameto masculino con el femenino. Sin embargo, no necesariamente se anula la segunda fecundación que involucra la célula media. Aunque en algunos casos el endospermo puede desarrollarse en forma autónoma (sin la unión de un gameto masculino con los núcleos polares de la célula media del saco embrionario apospórico o diplospórico) en muchas especies apomícticas, es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula media del saco embrionario para formar el endospermo. A este proceso se lo llama pseudogamia (Nogler, 1984). Independientemente del origen, la semilla es una estructura básica derivada de un óvulo, que perdió algunas partes y desarrolló algunas nuevas (Bhojwani & Bhatnagar, 1974).

Las semillas de las especies de la familia Myrtaceae son esencialmente exalbuminadas (Corner, 1976; Schmid, 1980; Tobe & Raven, 1983) y muy diversas morfológica y anatómicamente (Corner, 1976; Nic Lughadha & Proença, 1996; Landrum & Stevenson, 1986; Landrum & Kawasaki, 1997; Barroso *et al.*, 1984). Existe variabilidad en las formas y tamaños de las semillas maduras, así como en la forma del embrión, en su desarrollo y en la consistencia y textura de la cubierta seminal (Corner, 1976; Nic Lughadha & Proença, 1996; Landrum & Stevenson, 1986; Landrum & Kawasaki, 1997; Barroso *et al.*, 1984). Basados en esas diferencias, muchos trabajos taxonómicos y filogenéticos han utilizado caracteres del embrión (De Candolle, 1828; Berg, 1855-1856; Berg, 1857-1859; Landrum & Kawasaki, 1997) o de la cubierta seminal (Berg, 1855-1856; Berg, 1857-1859; McVaugh, 1968; Landrum & Kawasaki, 1997) para delimitar taxa. Barroso *et al.* (1984), considerando a los embriones como una fuente interesante de caracteres para la circunscripción taxonómica de las tribus dentro de la familia, describió ocho tipos de embriones. Estos autores se basaron principalmente en: 1. la forma del embrión (globoso, elipsoide, redondeado, enrollado o curvo), 2. la consistencia del mismo

(craso, muy craso o carnososo), 3. el tipo de cotiledones (foliáceos, membranáceos, rudimentarios, etc), 4. ubicación de los cotiledones (apical, rodeando al embrión, enrollados, etc) y 5. soldadura entre el eje hipocótilo-radícula y los cotiledones (presencia-ausencia), entre otros caracteres. En particular, la estructura del embrión ha aportado caracteres valiosos para la delimitación taxonómica dentro de la subfamilia Myrtoideae. De Candolle en 1828 distinguió, dentro de las Myrtoideae, tres tipos básicos de embrión comúnmente referidos como: Eugenioide, con cotiledones gruesos y carnosos e hipocótilo insignificante; Myrcioide, con cotiledones foliosos más amplios que el hipocótilo y Myrtoide/Pimentoide, con un hipocótilo desarrollado y cotiledones pequeños (Nic Lughadha & Proença, 1996). Basado en esta clasificación, Berg (1855-1856) definió tres subtribus, Eugeniinae con cotiledones carnosos, concrecentes, poco separados o rara vez libres, radícula pequeña o generalmente inconspicua, testa frecuentemente crustácea, adherente o libre; Myrciinae, cotiledones foliáceos contortuplicados, radícula larga y curva, testa generalmente crustácea, lisa, separada del embrión y Pimentinae, embrión arqueado, curvo o espiralado, con pequeños cotiledones en su extremo interior, tegumento blando u óseo (Legrand, 1968; McVaugh, 1968). A pesar del valor que se le ha adjudicado a los caracteres seminales mencionados para la taxonomía de Myrtaceae, el proceso de desarrollo embrionario ha sido escasamente estudiado. La falta de información en esta área puede ser atribuida a las dificultades presentadas en los procesos de fijación para los estudios histológicos de los materiales a analizar (Mauritzon, 1939; Devis, 1968 en Beardsell *et al.*, 1993).

El género *Psidium* L. reúne entre 70 y 100 especies (Landrum & Kawasaki, 1997; Govaerts *et al.*, 2008), tiene distribución neotropical, extendiéndose desde el sur de México hasta la provincia de Buenos Aires, en Argentina (Soares-Silva & Proença, 2008). Este género se encuentra actualmente ubicado en la tribu Myrteae una de las 15 tribus en la que se divide la subfamilia Myrtoideae (Thornhill *et al.*, 2015).

Tanto el género *Psidium* como otros que conforman el grupo Pimenta, se caracterizan por presentar ovarios con una media de 20 a 120 óvulos (excepto *Pimenta*), placentación que sobresale o a lo largo de la longitud del tabique carpelar, placas escalariformes ausentes, testa de la semilla ósea o blanda, embrión en forma

de “C” o a veces en espiral (Lucas, 2007), con el hipocótilo más largo que los cotiledones, siendo ésta una de las estrategias evolutivas para la incorporación de los nutrientes en el embrión a nivel del hipocótilo (Landrum & Kawasaki, 1997). Una de las especies del género que presenta interés económico por sus frutos comestibles, además *Psidium guajava* L., es *Psidium cattleianum* Sabine. La especie *Psidium cattleianum*, conocida vulgarmente como ‘arazá’ en Uruguay, ‘araça’, ‘araça-da-praia’, ‘araçazeiro’ en Brasil y ‘strawberry guava’ en Hawai, es poliploide con número cromosómico básico igual a 11 (Rye, 1979). No se conocen materiales diploides y los niveles de ploidía en poblaciones naturales van desde tetraploides hasta octoploides (Atchinson, 1947; Singhal *et al.*, 1985; Raseira & Raseira, 1996; Costa & Forni-Martins, 2006; Vázquez, 2014; Machado *et al.*, 2020; Machado & Forni-Martins, 2022). Además de estos niveles, en progenies obtenidas de semillas se detectaron plantas triploides, nonaploides, decaploides y dodecaploides (Machado & Forni-Martins, 2022). La especie cuenta con dos entidades infraespecíficas, la forma típica *P. cattleianum* f. *cattleianum*, descrita por Sabine en 1821, en base a materiales con frutos de coloración roja y *P. cattleianum* f. *lucidum*, descrita por Degener en 1939, en base a materiales con frutos de coloración amarilla.

En *Psidium cattleianum* la cubierta seminal es ósea (Legrand, 1968; Corner, 1976; Rotman, 1976) y se origina del tegumento externo (Corner, 1976). Las semillas abortadas mantienen su forma externa debido al desarrollo y persistencia de este tegumento (Souza-Pérez & Speroni, 2017). En el extremo micropilar de la semilla, la cubierta ósea se interrumpe por una estructura que podría identificarse como un opérculo (Rotman, 1976), ya que la emergencia del embrión durante la germinación se da por la abertura que deja el desprendimiento de esta estructura (Gomes *et al.*, 2015). El endospermo formado en *P. cattleianum* es de tipo nuclear (Souza-Pérez & Speroni, 2017), comienza con múltiples divisiones nucleares libres y eventualmente se vuelve celular o se mantiene en ese estado hasta ser consumido totalmente por el embrión en desarrollo (Vijayaraghvan & Prabhakar, 1984). La semilla madura es exalbuminada, el interior está ocupado por el embrión y sólo quedan relictos de endospermo en la periferia (Nic Lughadha & Proença, 1996).

Si bien se cuenta con información de la cantidad, forma y estructura de las semillas maduras de *Psidium cattleianum*, no está descrito hasta el momento el modo de desarrollo y la cronología de formación de los distintos tejidos desde el inicio de formación de la semilla hasta la semilla madura. Por tanto, se plantea en este trabajo describir los estadios del desarrollo ontogenético del embrión, endospermo, nucelo y cubierta seminal en semillas producidas por plantas heptaploides de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y plantas octoploides de *P. cattleianum* f. *lucidum*, para establecer el origen de las estructuras seminales descritas en la madurez para la especie y contribuir al conocimiento taxonómico y de la biología reproductiva de la especie.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal

Para la obtención de las semillas para el estudio ontogenético se realizaron polinizaciones manuales entre dos accesiones octoploides de *Psidium cattleianum* f. *lucidum* ($2n=8x=88$) de frutos amarillos (III5 y IV6) y dos accesiones heptaploides de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* ($2n=7x=77$) de frutos rojos (IV1 y IV7). Las cuatro plantas han sido seleccionados por sus buenas condiciones de sabor y fructificación en el Programa de Selección de Frutales Nativos (Facultad de Agronomía – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay) y se mantienen en cultivo bajo evaluación agronómica en Uruguay, Departamento de Salto, Estación Experimental de Facultad de Agronomía Salto (EEFAS) ($31^{\circ}19'S$, $57^{\circ}41'W$). Vouchers de las plantas IV7 (Speroni 1041) y IV1 (Speroni 1042) de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y de las plantas III5 (Speroni 1037) y IV6 (Speroni 1040) de *Psidium cattleianum* f. *lucidum* fueron ingresadas al Herbario Bernardo Rosengurtt, Facultad de Agronomía, Universidad de la República (Herbario MVFA). La viabilidad de polen de cada planta fue evaluada previamente mediante test colorimétrico con cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC) (Shivanna & Rangaswamy, 1992). La planta IV7 no se utilizó como dadora de polen porque no presentó polen viable en el año de estudio.

2.4.2. Polinizaciones manuales

En los tratamientos se realizaron polinizaciones manuales entre los individuos de las cuatro accesiones de *Psidium cattleianum*. Flores elegidas al azar en cada árbol fueron emasculadas una hora antes de la antesis, cuando las anteras están aún indehiscentes y el estigma fue aislado para prevenir la llegada de polen foráneo. Cuatro horas después se polinizaron manualmente con polen de otra planta de la misma o diferente ploidía (polinizaciones cruzadas) (Tabla 1). Para los tratamientos de autopolinización se utilizó polen de la propia flor sin emasculas y embolsadas previo a la antesis para prevenir la contaminación (Tabla 1). De todos los individuos se colectaron dos frutos en distintas etapas de desarrollo para extraer las semillas en formación, con el fin de registrar las distintas etapas ontogenéticas. Los frutos en desarrollo fueron colectados a los 22, 29, 36, 43, 50, 57 días post-polinización (ddp) y a los 67 ddp se colectaron frutos maduros. En cada fecha de muestreo se extrajeron las semillas de dos frutos por fecha y fueron fijadas en FAA (formol, ácido acético, alcohol 70 %, 5:5:90) durante 7 días (modificado de Johansen, 1940). Luego se almacenaron hasta su procesamiento en alcohol 70 %.

Tabla 1. Tratamientos de polinizaciones manuales en accesiones heptaploides (7x), IV1, IV7; y octoploides (8x), III5, IV6, de *Psidium cattleianum*.

Receptor de polen	Dador de polen		
	III 5 (8x)	IV 6 (8x)	IV 1 (7x)
III 5 (8x)	Autogamia 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 7x
IV 6 (8x)	Polinización cruzada 8x × 8x	Autogamia 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 7x
IV 1 (7x)	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 8x	Autogamia 7x × 7x
IV 7 (7x)	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 7x

2.4.3. Procesamiento de las semillas

Las semillas fueron procesadas de diferente manera para mejorar la infiltración. En algunas semillas jóvenes se procedió a hacer pequeñas perforaciones con agujas histológicas y, en semillas muestreadas a partir de los 50 dpp, se procedió a remover mecánicamente (con hoja de afeitar) parte de la cubierta seminal. Todas las semillas fueron deshidratadas en una serie de alcoholes de graduación ascendente y se incluyeron en parafina utilizando alcohol butílico terciario como intermediario (Li, 1978). Se realizaron cortes seriados de 7 - 10 μm con micrótopo rotatorio de precisión, Marca SLEE, Modelo CUT 4062. Los cortes se montaron con Bálsamo de Canadá y se tiñeron con la doble coloración Safranina-Fast Green (Johansen, 1940). Los preparados fueron observados con microscopio óptico Euromex BioBlue 4263. Los cortes seleccionados se analizaron, midieron y fotografiaron con las cámaras digitales Dino Eye 2.0 y Samsung Galaxy A71. Los esquemas de semillas se realizaron con el programa CorelDRAW® X8 en base a fotos de los preparados.

2.5. RESULTADOS

Las semillas analizadas provienen de óvulos anátropos, bitégmicos y crasinucelados (Fig. 1 A). Sin embargo, durante el desarrollo de la semilla, la condición anátropa se pierde en la mayoría de los casos, el mayor desarrollo del lado opuesto al rafe cambia la morfología de las semillas que adquieren una forma campilótropa (Fig. 1 B). Por tanto, el interior de la semilla se curva y adopta la forma de 'C' (Fig. 2 A). El sistema vascular, que ingresa desde la placenta, llega solamente hasta la zona de la chalaza, no se observa vascularización a nivel de los tegumentos (Fig. 2 A).

El muestreo realizado entre 22 y 67 días post-polinización (dpp) captó la ontogenia del embrión, el endospermo, el nucelo y la testa de la semilla. Desde la primera fecha de análisis, el embrión y el endospermo ya habían iniciado su formación. Si bien hay coincidencia entre los patrones ontogenéticos del embrión de las plantas madres con ploidías 8x y 7x, se observaron diferencias cronológicas durante el desarrollo, tanto dentro de las plantas con el mismo nivel de ploidías, como entre plantas con

diferentes ploidías. Endospermo, nucelo y cubierta seminal mostraron el mismo patrón ontogenético en plantas madres 8x y 7x.

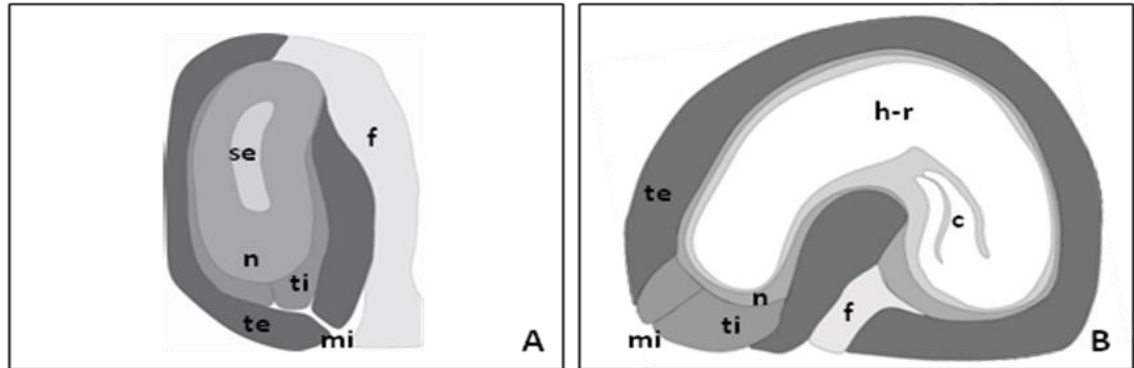


Fig. 1. Evolución de la morfología del óvulo en la formación de la semilla de *Psidium cattleianum*. A, óvulo anátropo; B, semilla madura con forma campilótropa. c, cotiledones; f, funículo; h-r, eje hipocótilo-radícula; mi, micrópilo; n, nucelo; se, saco embrionario; te, tegumento externo; ti, tegumento interno.

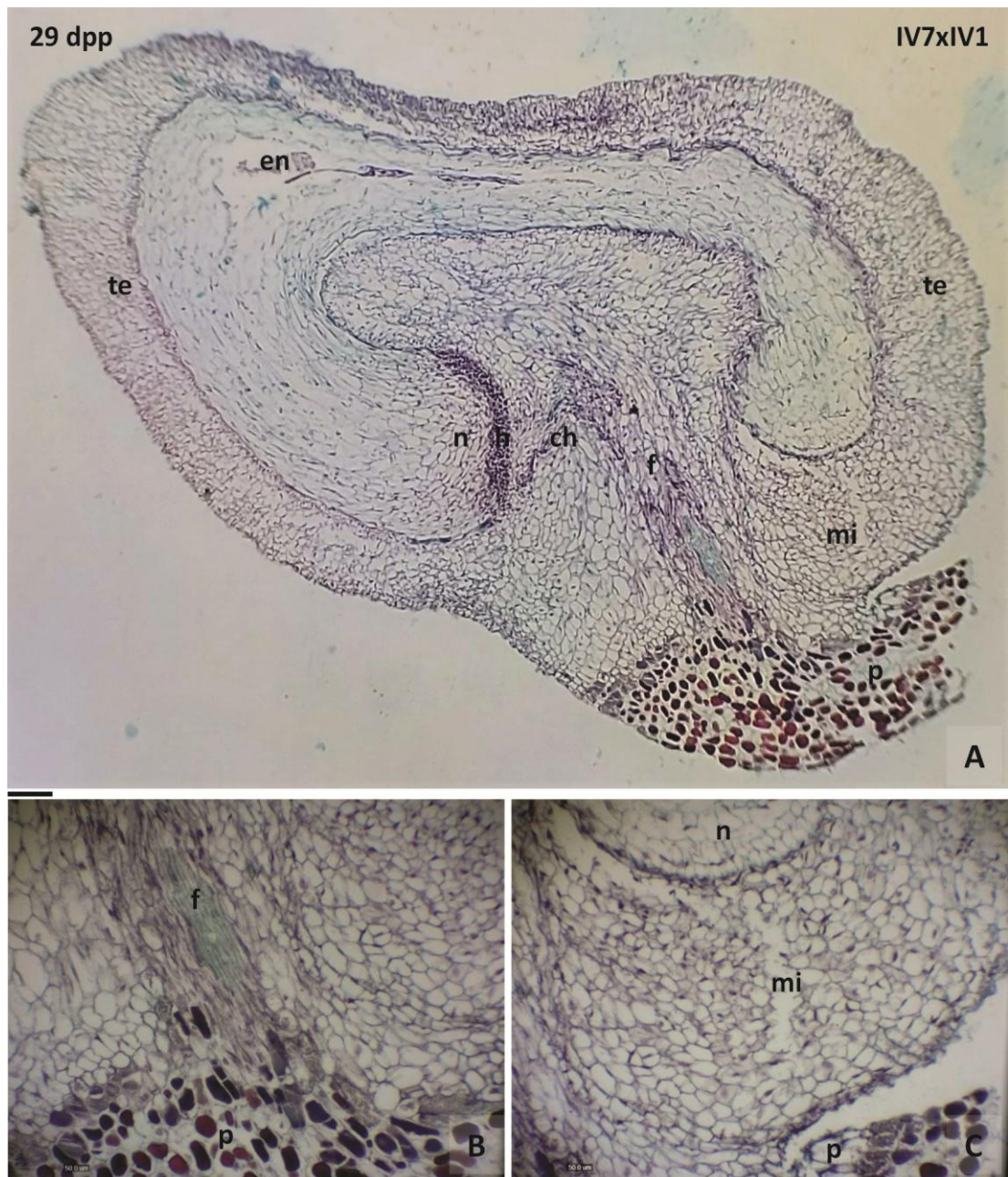


Fig. 2. Semilla en desarrollo (29 dpp) de *Psidium cattleianum*. A, corte longitudinal; B, conexión placenta-funículo; C, conexión placenta-micrópilo. ch, chalaza; dpp, días post-polinización; en, endospermo; f, funículo; h, hipostasa; mi, micrópilo; n, nucelo; p, placenta; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Escala= A: 100 μ m, B-C: 50 μ m.

2.5.1. Embrión originado por plantas octoploides

Hasta los 36 dpp, las dos plantas madres octoploides analizadas mostraron patrones ontogenéticos similares.

A los 22 dpp se observó un embrión globular formado por cuatro a ocho (12) células isodiamétricas redondeadas, de núcleos prominentes, que se mantiene hasta los 29 dpp. En la base micropilar del embrión se observó un suspensor, formado por dos células cuadrangulares de citoplasma denso que en algunos casos crecen en tamaño y en otros se dividen en dos cada una, que se mantiene hasta los 43 dpp (50 dpp) (Fig. 3 A-B).

A los 36 dpp el embrión aumentó su tamaño de dos a cuatro veces desde 29 dpp por división celular y se mantiene el suspensor. En la mayoría de los casos (73 %) se mantuvo la forma globular mientras que, los restantes embriones mostraron incipiente morfología cordiforme. En ambas morfologías se presentó la diferenciación superficial del protodermo. El mismo está compuesto por una capa continua de células cuadrangulares con núcleo prominente, que cubre y delimita al embrión en el interior de la semilla (Fig. 3 C-D).

A los 43 dpp se observó una marcada diferenciación entre el desarrollo de los embriones de las plantas octoploides III5 y IV6. En la planta III5 se produjo un pronunciado alargamiento del eje hipocótilo-radícula. La longitud total del embrión superó la mitad de la cavidad interna seminal y la relación en longitud del eje hipocótilo-radícula:cotiledones fue 3:1 (Fig. 3 E) . En la planta IV6 los embriones se mantuvieron en la condición cordiforme y no ocuparon más de un 10 % de la cavidad seminal. Sin embargo, en ambos casos se distinguen claramente los meristemas primarios (protodermis, procambium y meristema fundamental) (Fig. 3 F).

A los 50 dpp la mayoría (75 %) de los embriones de la planta octoploide IV6 mantuvieron la condición cordiforme (Fig. 4 A), mientras que el resto (25 %) y los embriones de la planta III5 agrandaron el tamaño de sus células y aumentaron considerablemente la cantidad de células para alargar el eje hipocótilo-radícula y ocupar casi todo el largo de la cavidad seminal. Los cotiledones en la planta III5 se doblan 180° y quedan recostados al eje hipocótilo-radícula, ocupando 1/5 de la longitud de este eje (Fig. 4 B). El meristema apical queda ubicado por lo tanto hacia

la zona chalazal. Así, el eje hipocótilo-radícula adopta la forma 'C' de la cavidad interna seminal y los cotiledones se recuestan sobre dicho eje. En estos últimos estadios se diferencian más aún las células de los meristemas primarios y de los meristemas apicales. La protodermis está formada por una capa de células pequeñas, de cuadradas a apenas rectangulares. El meristema fundamental tiene células grandes, que duplican el tamaño de las células de la protodermis, poliédricas, alargadas en sentido longitudinal al eje del embrión. En el procambium las células son angostamente cuadrangulares y alargadas también en sentido longitudinal, mientras que las de los meristemas apicales son isodiamétricas pequeñas y de núcleo grande (Fig. 4 E). Para ambas plantas octoploides, a partir de esta fecha las células embrionarias del meristema fundamental comienzan a rellenarse de corpúsculos que se tiñen de rojo, evidencia de contenidos grasos (Fig. 4 F).

A los 57 dpp los embriones observados de ambas plantas octoploides alcanzaron el mismo estadio de desarrollo. El eje hipocótilo-radícula continuó su alargamiento y se curvó fuertemente por la zona próxima al meristemo apical, ubicado en el extremo chalazal. En la zona de curvatura del hipocótilo se observa una escotadura (Fig. 5 A-B). El eje hipocótilo-radícula adopta en este momento la forma en 'C' ('C-shaped'). Los cotiledones duplicaron su grosor y se alargan siempre recostados sobre el eje hipocótilo-radícula. La relación en longitud del eje hipocótilo-radícula:cotiledones pasa a ser 2:1 (Fig. 4 C).

A los 67 dpp el embrión aumentó su tamaño, creció en grosor por aumento del tamaño celular y en largo por incremento del número de células y ahora rellena todo el interior de la semilla (Fig. 4D). La relación en longitud del eje hipocótilo-radícula:cotiledones es 2,5:1. Los cotiledones también crecieron en largo y sobrepasan la zona de la escotadura del hipocótilo, superando la mitad del largo de la cavidad seminal. Los corpúsculos que se tiñen de rojo aumentaron en densidad y ahora rellenan todas las células del meristema fundamental del embrión (Fig.4 G).

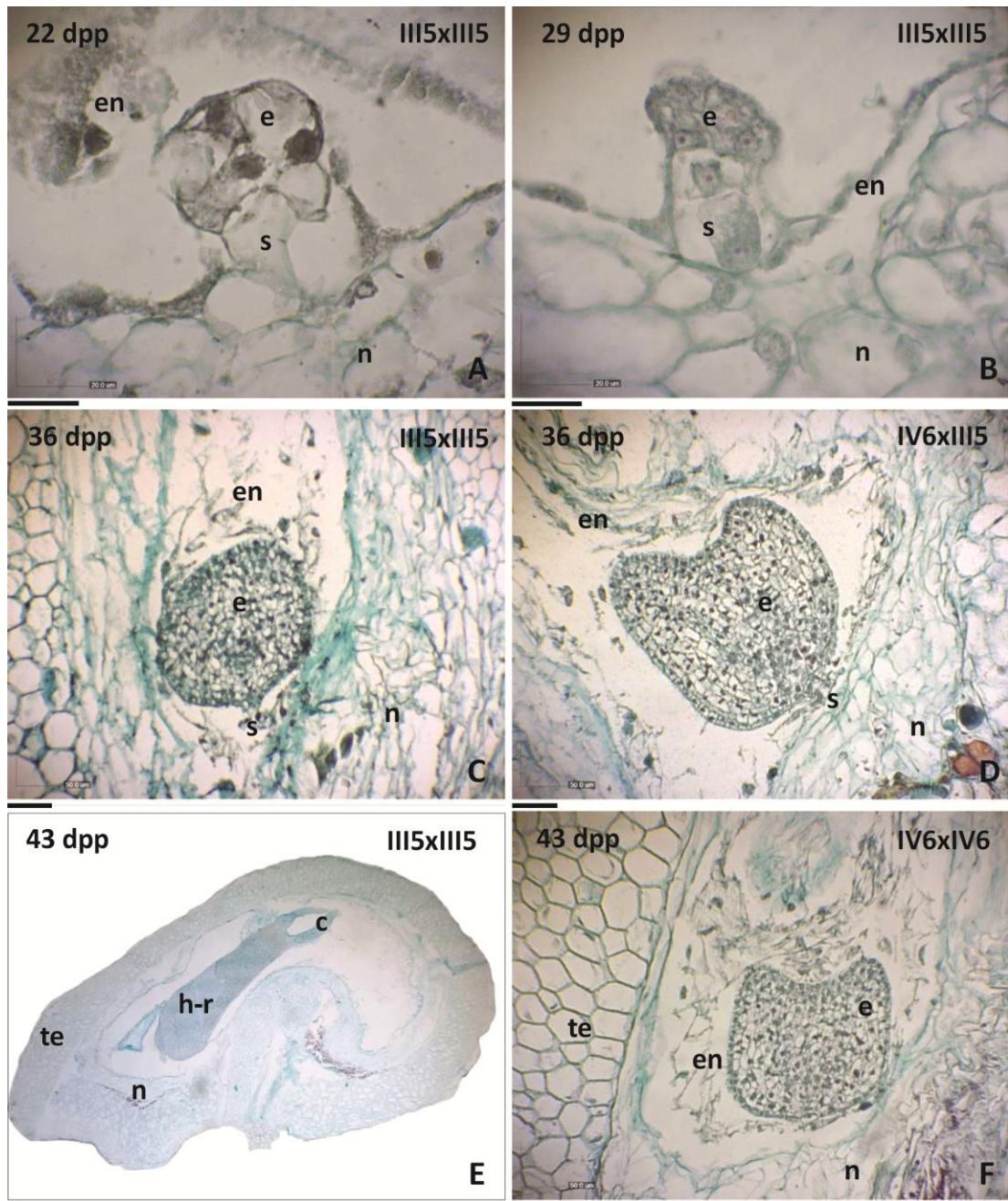


Fig. 3. Desarrollo de embriones en cruzamientos dirigidos en plantas octoploides de *Psidium cattleianum*. A-C, embriones globulares; D, embrión cordiforme con diferenciación de meristemas primarios; E, embrión con forma de torpedo alargado; F, embrión cordiforme con meristemas primarios diferenciados. c, cotiledones; dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; h-r, eje hipocótilo-radícula n, nucelo; s, suspensor; te, tegumento externo. Escala = A-B: 20 µm, C-D-F: 50 µm, E: 100 µm.

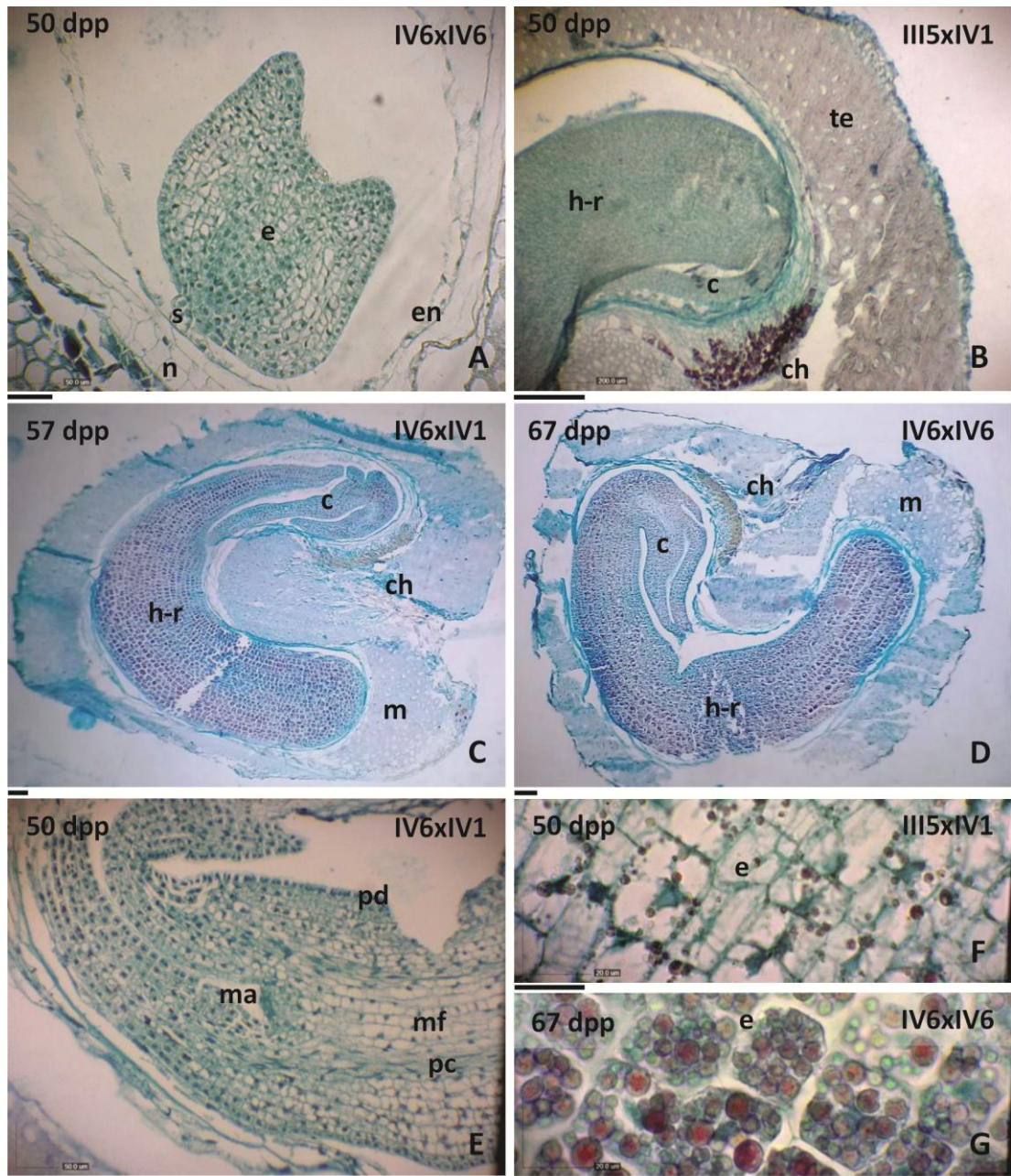


Fig. 4. Desarrollo de embriones en cruzamientos dirigidos en plantas octoploides de *Psidium cattleianum*. A, embrión cordiforme; B, embrión en forma de 'C' con cotiledones plegados sobre el hipocótilo; C-D, embriones con forma 'C'; E, meristemas primarios; F-G, contenidos corpusculares en células del meristema fundamental del embrión. c, cotiledones; ch, chalaza; dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; h-r, eje hipocótilo-radícula; ma, meristema apical; mf, meristema fundamental; n, nucelo; pc, procambium; pd, protodermis; s, suspensor; te, tegumento externo. Escala = A-E: 50 μ m, B: 200 μ m, C-D: 100 μ m, F-G: 20 μ m.

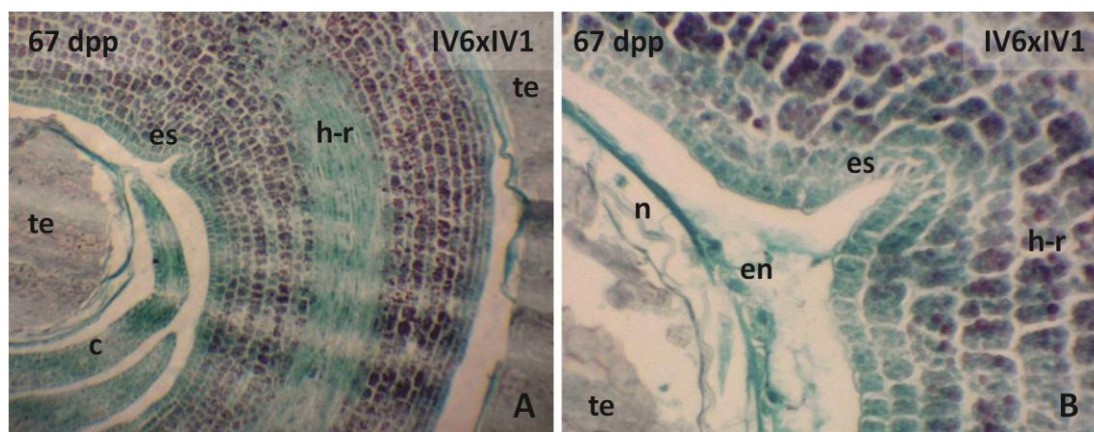


Fig. 5. Curvatura (repliegue o pliegue) del embrión de *Psidium cattleianum*. A, zona de curvatura; B, detalle de la escotadura en zona de curvatura. c, cotiledones; dpp, días post-polinización; en, endospermo; es, escotadura; h-r, eje hipocótilo-radícula n, nucelo; te, tegumento externo. Escala = A-B: 100 μ m.

2.5.2. Embrión originado por plantas heptaploides

A diferencia de las plantas octoploides, a los 22 dpp las plantas heptaploides presentan menor grado de desarrollo. El embrión está formado por una sola célula de núcleo prominente, unido al nucelo de la zona micropilar mediante un suspensor formado por una sola célula también (Fig. 6 A). Recién a los 29 dpp se observa un embrión globular compuesto por cuatro a seis células y un suspensor bicelular que se mantiene hasta casi los 43 dpp (Fig. 6 B). A los 36 dpp el embrión cuadruplicó el número de células que lo componen, se mantiene de forma globular, aunque en algunos casos comienza a marcarse la escotadura apical para la formación de los cotiledones. La protodermis ya se evidencia en esta etapa del desarrollo, al igual que en embriones de plantas octoploides para esta misma fecha (Fig. 6 C). En 43 dpp los embriones ocupan un 10 % de la cavidad seminal, son cordiformes con cotiledones que alcanzan 1/3 del largo total del embrión, similar a los embriones de las plantas IV6 para la misma fecha. En este estadio se diferencian las células de los meristemas primarios con las mismas características de los embriones de plantas octoploides (Fig. 6 D). A los 50 dpp el crecimiento del embrión supera la mitad del largo del interior de la semilla y es comparable al desarrollo de los embriones de la madre III5 en la fecha anterior (43 dpp) (Fig. 6 E).

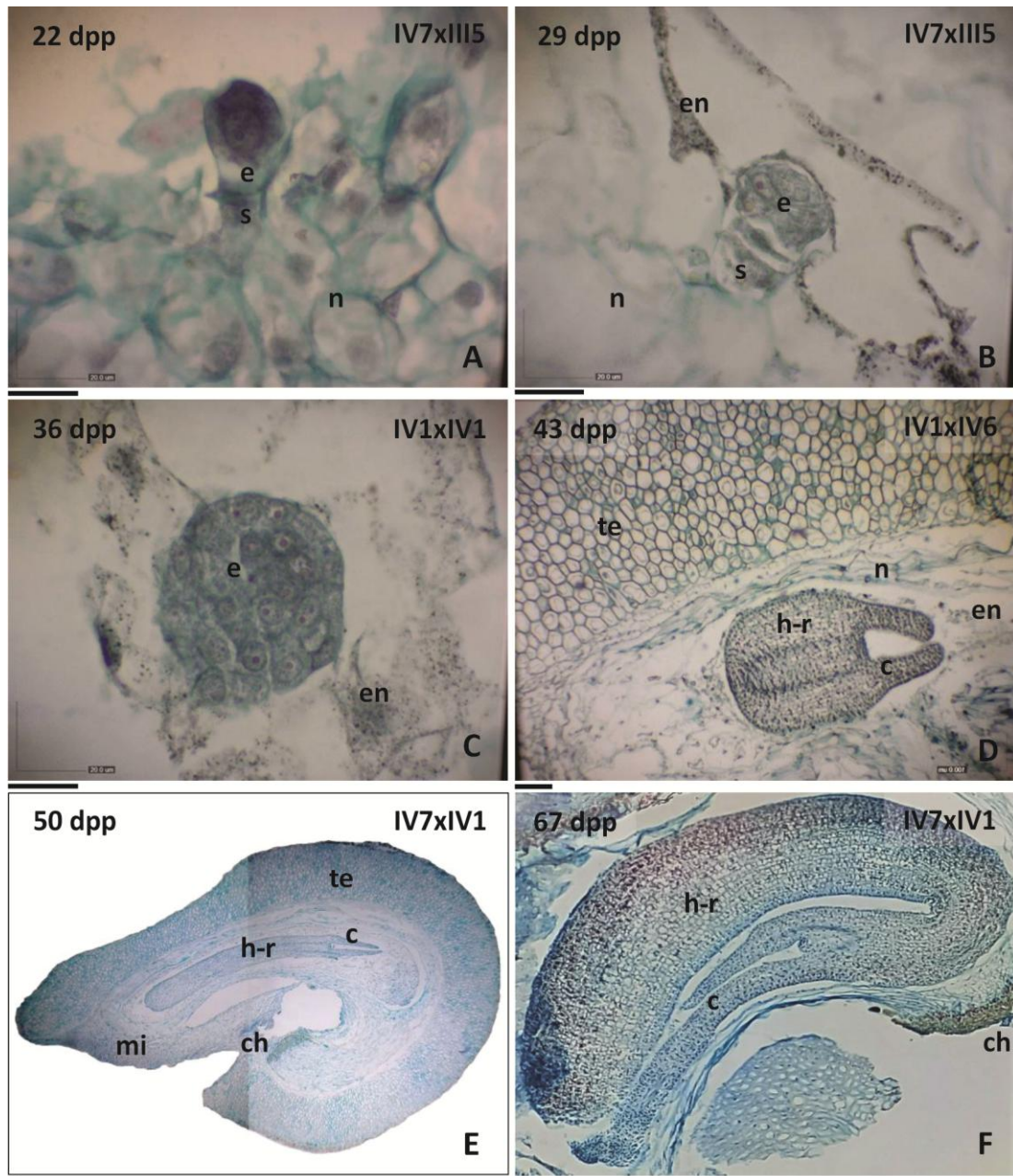


Fig. 6. Desarrollo de embriones en cruzamientos dirigidos en plantas heptaploides de *Psidium cattleianum*. A-C, embriones globulares; D, embrión cordiforme con diferenciación de meristemas primarios; E, embrión con forma de torpedo alargado; F, embrión con forma 'C'. c, cotiledones; ch, chalaza dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; h-r, eje hipocótilo-radícula; mi, micrópilo; n, nucelo; s, suspensor; te, tegumento externo. Escala = A-B-C: 20 µm, D-E-F: 100 µm.

Sin embargo, llega a los 67 dpp en igual desarrollo que el resto de los embriones de las madres octoploides amarillas, con un eje hipocótilo-radícula curvado en forma de ‘C’ y los cotiledones plegados 180°, recostados sobre dicho eje (Fig. 6 F).

2.5.3. *Endospermo*

En la ontogenia de la semilla se desarrolla un endospermo nuclear. En la primera etapa de 22 y 29 dpp se observan velos citoplasmáticos contraídos y dispersos en el interior de la semilla, próximos al nucelo. Los velos citoplasmáticos contienen núcleos con nucléolos notorios (Fig. 7 A-B). La celularización comienza mayoritariamente a los 36 dpp para plantas octoploides y algunas heptaploides (Fig. 7 C-D), donde se observa también multiplicación celular, mientras que en algunos tratamientos comienzan a los 43 dpp principalmente para madres heptaploides. El proceso de celularización del endospermo se inicia en la zona micropilar y desde la periferia hacia el centro. Las células, que muchas veces se presentan desordenadas y desprendidas en pequeños grupos, están generalmente adheridas al nucelo formando un estrato de dos a cuatro capas. La forma celular varía de isodiamétricas grandes a cuadrangulares aplanadas, poseen paredes delgadas, citoplasma denso y núcleos prominentes (Fig. 7 D). En las fechas 43, 50 y 57 dpp, donde el embrión todavía es pequeño o no abarca todo el interior seminal, se encuentra espacio vacío entre el endospermo y el embrión (Fig. 7 E). Sin embargo, hacia los 67 días el endospermo se encuentra aplastado por el embrión contra el nucelo (Fig. 7 F).

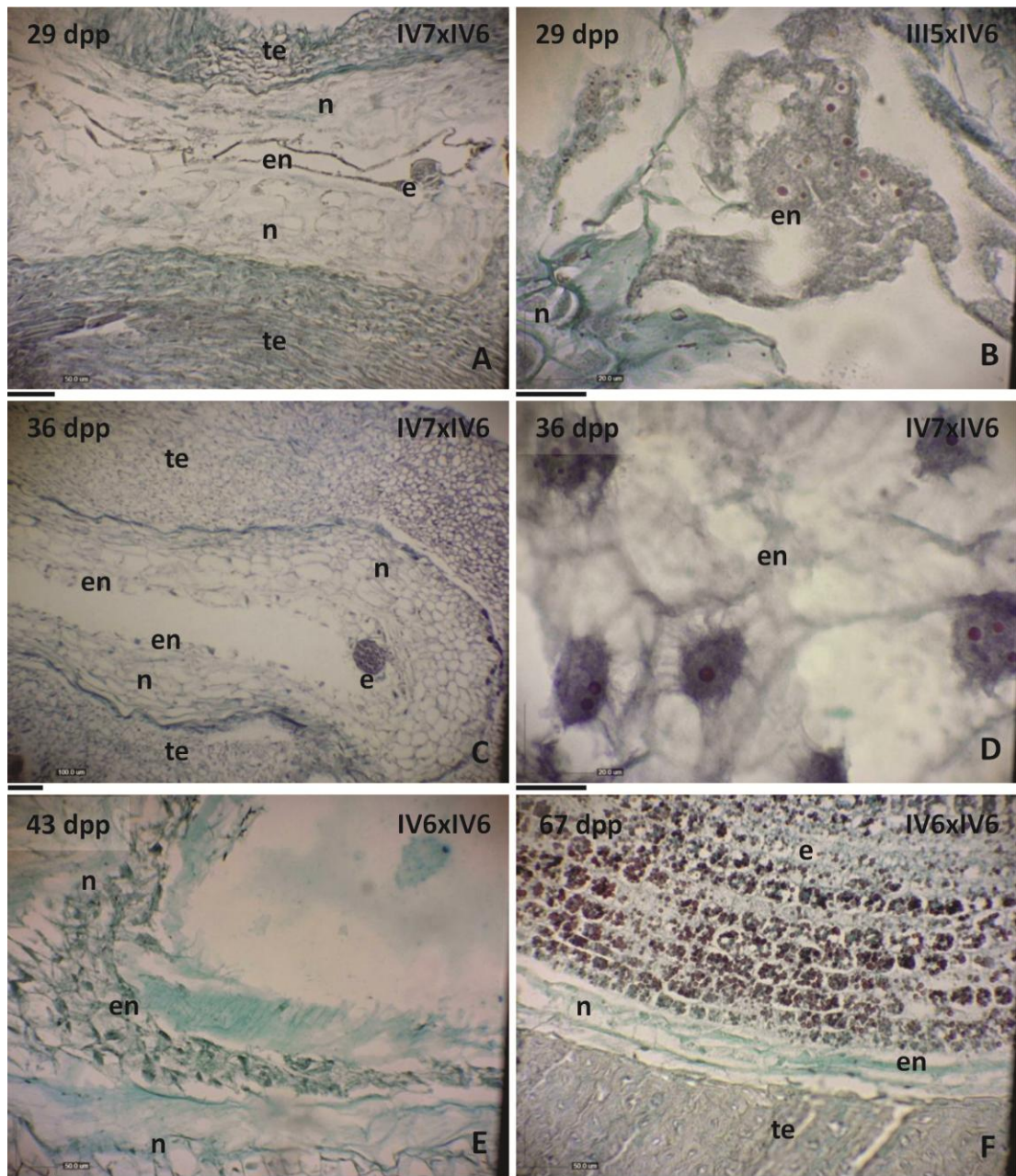


Fig. 7. Desarrollo del endospermo en semillas en desarrollo de *Psidium cattleianum*. A, distribución del endospermo nuclear; B, endospermo nuclear conectado al nucelo de la zona chalazal; C, distribución del endospermo celularizado; D, detalle de las células del endospermo; E, distribución del endosperma celularizado; F, restos de endospermo. dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; n, nucelo; te, tegumento externo. Escala = A-E-F: 50 µm, B-D: 20 µm, C: 100 µm.

2.5.4. Nucelo

El nucelo se mantiene casi constante durante todo el desarrollo seminal. Consta de cuatro a siete capas de células de pared delgada, que rodean completamente el interior de la semilla. En la zona chalazal encontramos dos tipos de células. En las capas más externas del nucelo las células son cuadrangulares, de pared gruesa, organizadas en una hipostasa. Estas células se organizan en el centro de la hipostasa para formar un pico que se introduce entre las células del nucelo más internas, para conectar con el endospermo. Todas estas células, entre los 22 y 29 dpp, contienen corpúsculos pequeños que tiñen de rojo (Fig. 8 A-B). Las capas más internas del nucelo están formadas por células redondeadas, iguales ó más grandes (hasta el triple) de tamaño que las anteriores y sólo contienen un núcleo pequeño, a excepción de las que rodean el pico de la hipostasa (Fig. 8 A-B). Las células del nucelo de la zona micropilar también se diferencian de manera similar a las de la chalaza; sin embargo, las células más externas no se rellenan de contenido y son del doble del tamaño que las otras (8 C-D). Las células nucelares laterales, que se ubican entre el polo chalazal y el polo micropilar, son alargadas en sentido paralelo a la superficie, tienen núcleo pequeño y algunas se encuentran aplastadas (8 E-F). A partir de los 36 dpp las células de la hipostasa se rellenan totalmente con contenido de color rojo o ámbar. La hipostasa entonces ocupa todo el ancho de la zona chalazal en forma de casquete y se mantiene hasta el final del desarrollo seminal (Fig. 9 D). Las células del nucelo que se ubican en posición más interna, mantienen su forma y tamaño hasta los 50 dpp y luego se aplastan (Fig. 9 D). Las células nucelares laterales terminan aplastadas por el embrión al final del desarrollo seminal (Fig. 9 B).

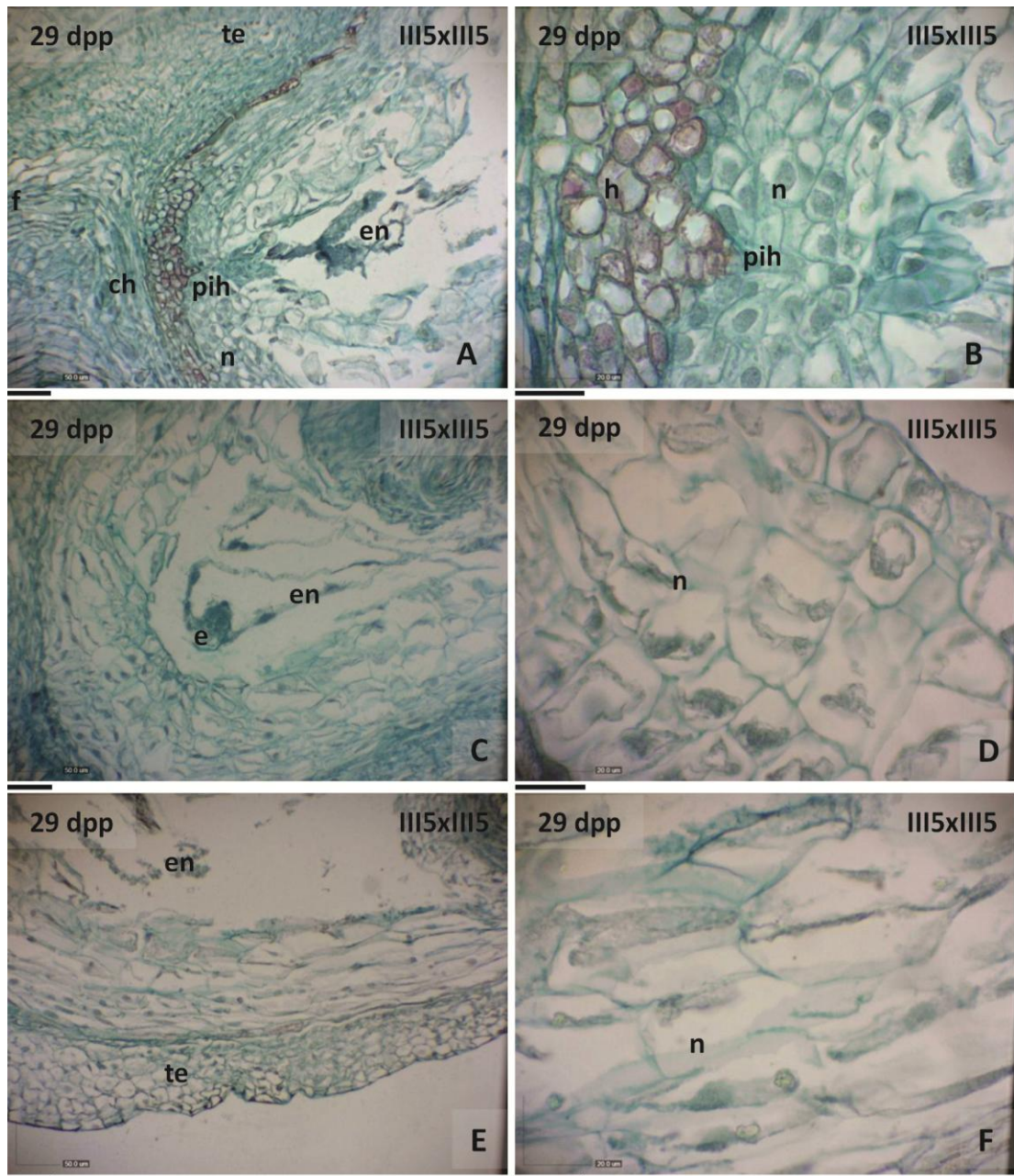


Fig. 8. Evolución del nucelo en la ontogenia de semillas de *Psidium cattleianum*. A-B, células del nucelo del extremo chalazal e hipostasa; C-D, células del nucelo del extremo micropilar; E-F, células del nucelo que recorren los lados laterales del interior de la semilla. ch, chalaza; dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; f, funículo; h, hipostasa; n, nucelo; pih, pico de la hipostasa; te, tegumento externo. Escala = A-C-E: 50 μ m, B-D-F: 20 μ m.

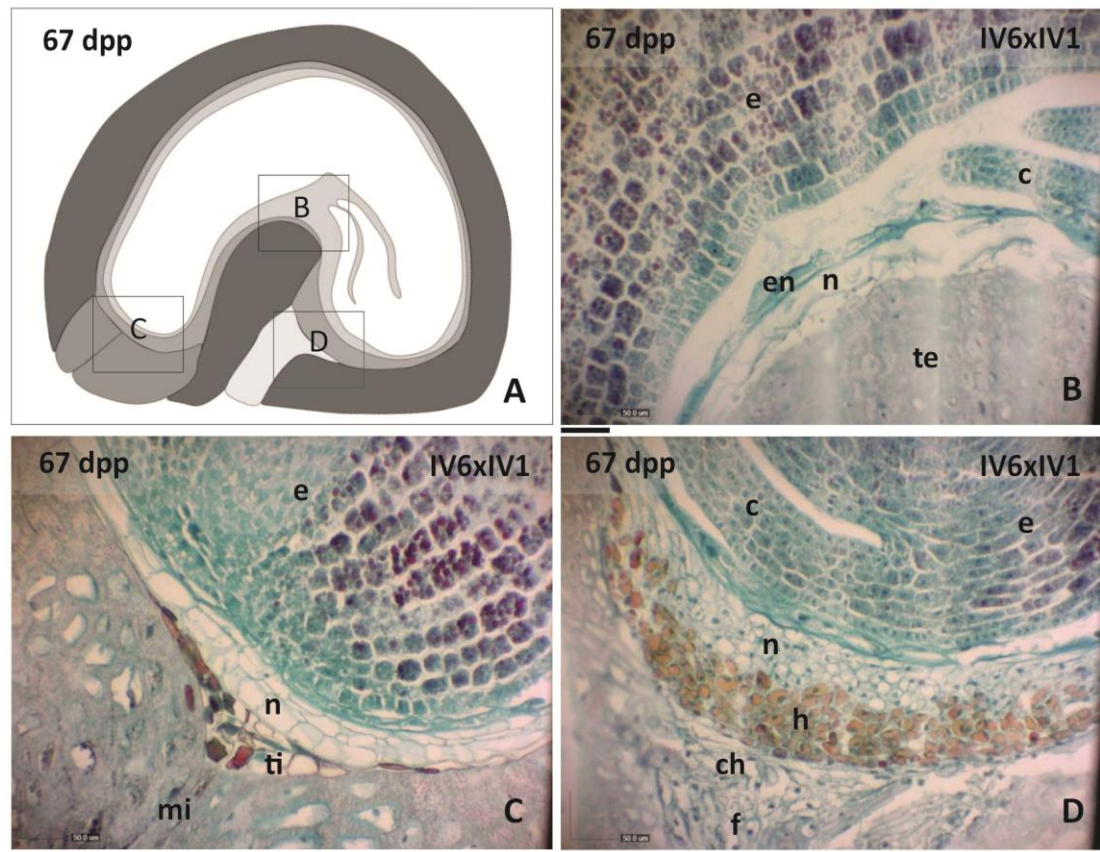


Fig. 9. Nucelo en semilla madura de *Psidium cattleianum*. A, esquema de la semilla a 67 dpp; B, nucelo aplastado; C, nucelo del polo micropilar; D, nucelo del polo chalazal. ch, chalaza; dpp, días post-polinización; e, embrión; en, endospermo; f, funículo; h, hipostasa; n, nucelo; pih, pico de la hipostasa; te, tegumento externo. Escala = B-C-D: 50 µm.

2.5.5. Cubierta seminal

Ambos tegumentos del óvulo participan en la formación de la cubierta seminal, aunque con un aporte y una regionalización bien diferenciada en la madurez.

El micrópilo está formado solamente por el tegumento interno, ya que el tegumento externo se ubica por debajo del orificio micropliar (Fig. 1 B). Si bien el tegumento externo no cubre toda la semilla, su epidermis es continua con la del tegumento interno. Esta continuidad se observa claramente a los 50 dpp (Fig. 10 J). Así toda la semilla está cubierta por una epidermis múltiple que, en general tiene cuatro capas (Fig. 10 A-C).

2.5.5.1. Tegumento externo: En el tegumento externo se reconocen una epidermis externa, un mesotegumento y una epidermis interna.

A los 22 dpp se observa que el tegumento externo cuenta con una epidermis externa múltiple, de cuatro capas de células rectangulares alargadas y paralelas a la superficie del órgano; un mesotegumento de seis capas de células parenquimáticas isodiamétricas (Fig. 10 A); y una epidermis interna de una ó dos capas de espesor. Las células de la epidermis interna son rectangulares y alargadas en sentido paralelo a la superficie del órgano, la pared es muy delgada, por lo que muchas veces aparece aplastada. Hay una capa de cutícula que la separa del tegumento interno.

A los 29 días se observan cambios solamente a nivel del mesotegumento, el cual incrementa el número de capas, entre 8 y 14 células de espesor. Además, hay crecimiento de las células (Fig. 10 B) y en los cortes tangenciales se observa que estas células se alargan en sentido perpendicular al largo de la semilla (Fig. 10 C).

Si bien a los 36 días post-polinización las células del mesotegumento siguen creciendo en forma diferenciada como se observó a los 29 dpp, en algunos casos comienza a evidenciarse la lignificación de las paredes celulares (Fig. 10 D-F).

A los 43 dpp las células de la epidermis comienzan a crecer en altura y las paredes de las células del mesotegumento están todas en proceso de lignificación (Fig. 10 G-H). El mesotegumento que se ubica en la zona adosada al funículo presenta diferencias con el resto. Las células son más pequeñas y recién comienzan a esclerosarse en semillas de plantas octoploides.

A los 50 dpp, las células de la epidermis siguen aumentando en altura respecto al ancho, así como las células del mesotegumento siguen aumentando el grosor de la pared secundaria (Fig. 10 I). En esta fecha se evidencia claramente la continuidad de la epidermis entre el tegumento externo y el tegumento interno (Fig. 10 J).

A los 57 dpp, las células de la epidermis externa del tegumento externo adoptan forma más cuadrangular; es decir, el ancho se duplicó en la mayoría de los casos. Las células del mesotegumento muestran mayor engrosamiento de la pared secundaria en plantas octoploides; mientras que en plantas heptaploides, recién empieza a evidenciarse la lignificación.

A los 67 dpp el crecimiento de las células de la epidermis externa es tal, que la altura de la célula es tres veces el ancho, generándose una sarcotesta que tiene contenido coloreado en las células de las semillas heptaploides y no en las octoploides (Fig. 11 D-E). En ninguno de los materiales analizados, el desarrollo de la epidermis evidenció presencia de estomas. El mesotegumento en plantas octoploides tiene células con lumen muy pequeño por el grado de engrosamiento de la pared secundaria y se observan claramente las puntuaciones. En plantas heptaploides también se observa mayor grado de espesamiento de las paredes; sin embargo, no es tan pronunciado como en plantas octoploides (Fig. 11 B). Tanto en plantas madres octoploides como heptaploides, el mesotegumento que se ubica en la zona adosada al funículo tiene menor espesamiento de pared que el ubicado en el tegumento externo expuesto (Fig. 11 C).

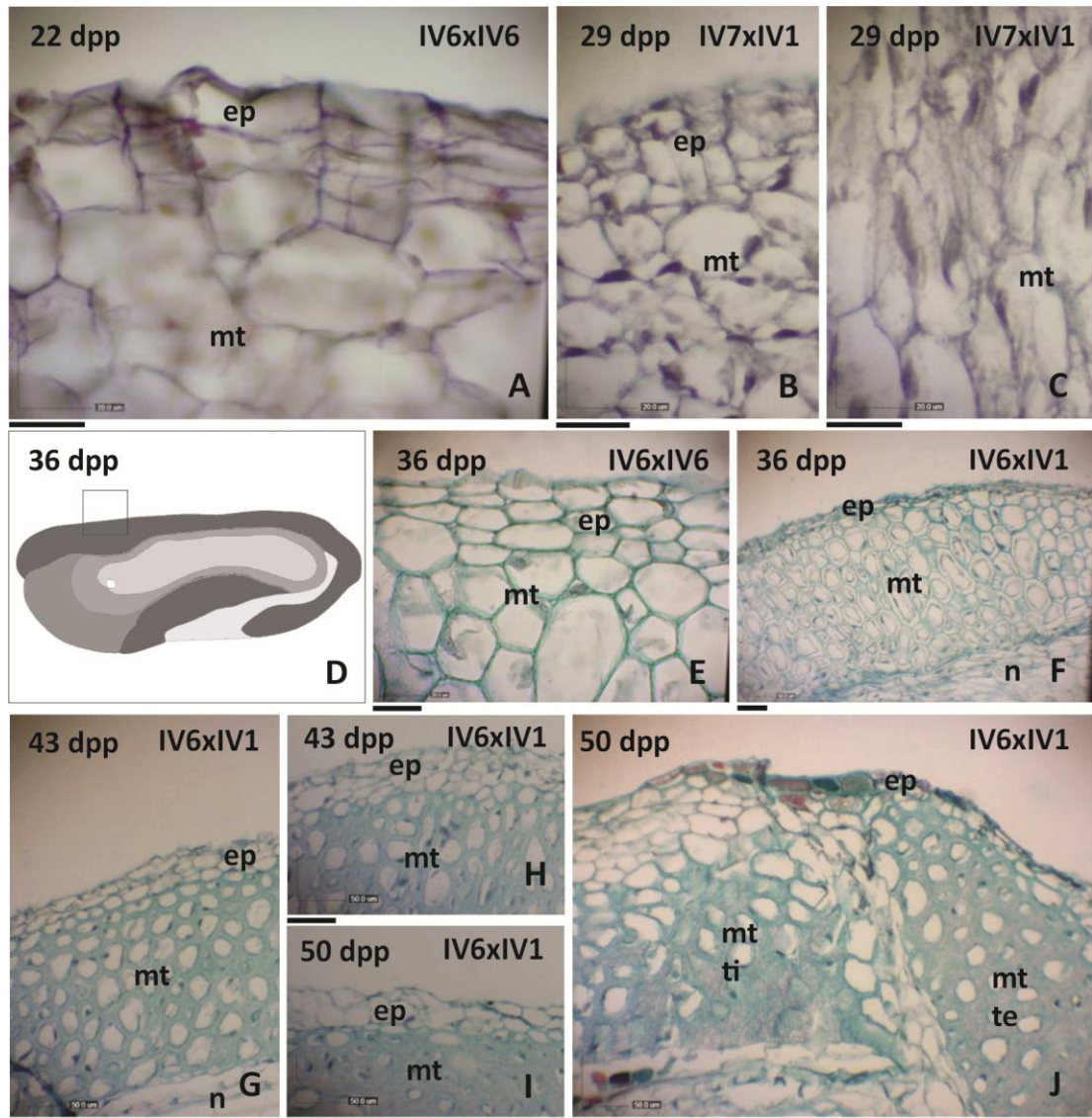


Fig. 10. Desarrollo de la epidermis y del mesotegumento del tegumento externo de semillas en formación de *Psidium cattleianum*. A-B, epidermis y mesotegumento parenquimático; C, mesotegumento en corte tangencial; D, esquema de la semilla entera donde se marca la zona donde se realizaron las fotos de la epidermis; E-F, epidermis y mesotegumento con principio de lignificación; G, epidermis y mesotegumento lignificado; H-I, sarcotesta en formación; J, epidermis continua entre tegumento externo y tegumento interno. dpp, días post-polinización; ep, epidermis; mt, mesotegumento; tegumento externo; ti, tegumento interno. Escala = A-B-C-E: 20 µm, F-G-H-I-J: 50 µm.

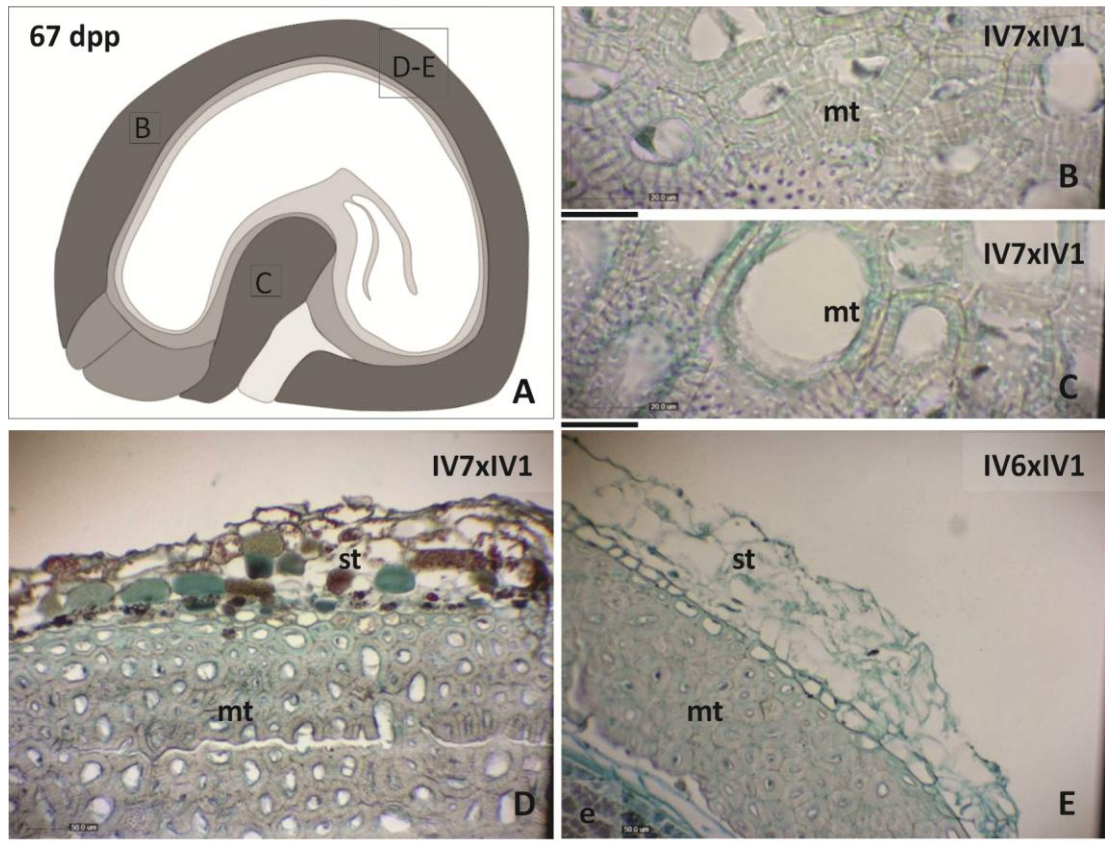


Fig. 11. Desarrollo de la epidermis y del mesotegumento del tegumento externo de semillas en formación de *Psidium cattleianum*. A, esquema de la semilla a 67 dpp; B-C, mesotegumento lignificado de la zona indicada en A; D-E, sarcotesta y mesotegumento lignificado de la zona indicada en A. e, embrión; dpp, días post-polinización; mi, micrópilo; mt, mesotegumento; n, nucelo; st, sarcotesta. Escala = A-B: 20 µm, D-E: 50 µm.

2.5.5.2. Tegumento interno: El tegumento interno posee tres zonas diferenciadas, la zona que recorre los lados laterales del interior seminal y los polos o puntas chalazal y micropilar. Cada una seguirá un proceso diferente durante la ontogenia de la cubierta seminal.

La parte del tegumento interno que recubre los lados laterales del interior seminal consta de una ó dos capas de células alargadas rellenas de contenido que tiñe de color azul o rojo, y paredes muy delgadas; por lo que, en la mayoría de los casos están aplastadas. Estas células en general, se mantienen incambiadas durante todo el desarrollo de la semilla (Fig. 12 A y C)

Las células del tegumento interno ubicadas en el extremo chalazal son más cuadrangulares y pequeñas que las que recorren los lados laterales del interior seminal. Estas células y las que recorren los lados del contorno seminal se caracterizan por contener sustancias y corpúsculos que tiñen principalmente de color rojo en las primeras y azul en las segundas. Este conjunto de células está en contacto con la hipostasa formada por el nucelo de la zona chalazal (Fig. 12 C).

El extremo micropilar del tegumento interno forma el micrópilo y consta de tres partes: la epidermis externa, el mesotegumento y la epidermis interna. La epidermis externa permanece incambiada durante el desarrollo de la semilla, es múltiple y comparte las mismas características descritas para la epidermis externa del tegumento externo (Fig. 13 A-B). La epidermis interna, que no se modifica durante el desarrollo seminal, está formada por células alargadas y de apariencia parenquimática. El mesotegumento está formado de varias capas de células (15-23). En las primeras fechas de muestreo estas células son parenquimáticas (Fig. 12 B, 13 A-B), tienen forma variable desde isodiamétricas a alargadas, paredes delgadas y están rellenas de corpúsculos que tiñen de color rojo (Fig. 13 A-D). A partir de los 43 dpp en semillas de plantas octoploides y a los 57 dpp en plantas heptaploides, las células centrales parenquimáticas del mesotegumento comienzan a esclerosarse. Es decir, que la lignificación del tegumento interno en la zona del micrópilo no se produce en todas sus capas celulares. Hacia la epidermis externa quedan aproximadamente 10 capas de células en estado parenquimático (Fig. 14 B-D y F). A los 67 dpp, se observa que el tegumento interno que forma el micrópilo se transformó en un casquete u opérculo formado en su interior por un conjunto de células de paredes gruesas lignificadas que están rodeadas de tejido blando parenquimático (Fig. 14 E-F).

2.5.6. Placenta

La placenta, que es protrusiva en el ovario de la flor, se introduce en el micrópilo durante el desarrollo de la semilla (Fig. 12 y 13). Las células placentarias son parenquimáticas y están rellenas de contenido denso y coloreado. La placenta se introduce en el micrópilo por el conducto micropilar y forma en la base del mismo,

contra el nucelo, una expansión en forma de cono. Estas células conectan con las del tegumento interno que recorren los lados del interior de la semilla hasta llegar a la hipostasa en la zona chalazal. Este recorrido se distingue claramente ya que todas las células tienen el mismo contenido coloreado (Fig. 12 A).

El conjunto de células placentarias en forma de cono mantiene sus células parenquimáticas (Fig. 14 C-F) durante todo el desarrollo seminal, con contenido denso que tiñe de color rojo o azul, y solo se lignifican las células que recorren el conducto micropilar (Fig. 14 D-F).

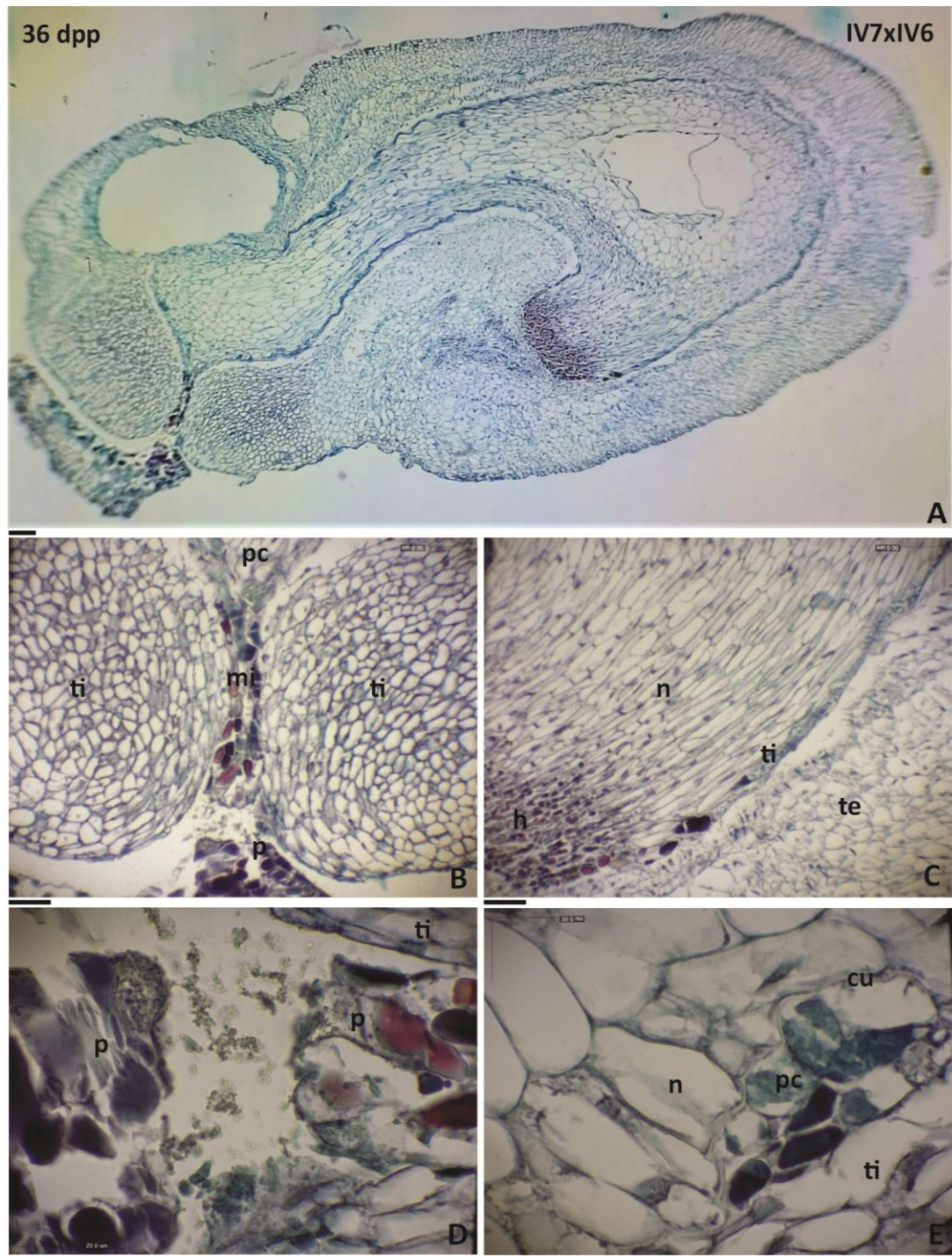


Fig. 12. Conexión placenta-tegumento interno vía micrópilo en semilla en desarrollo (36 dpp) de *Psidium cattleianum*. A, recorrido total de la conexión entre la placenta y el tegumento interno; B y D, conexión placenta-micrópilo; C, conexión tegumento interno-hipostasa; E, células placentarias formando cono en la base del micrópilo. ch, chalaza; cu, cutícula; en, endospermo; f, funículo; mi, micrópilo; n, nucelo; p, placenta; pc, placenta en forma de cono en la base del micrópilo; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Escala = A: 100 µm, B-C: 50 µm, D-E: 20 µm.

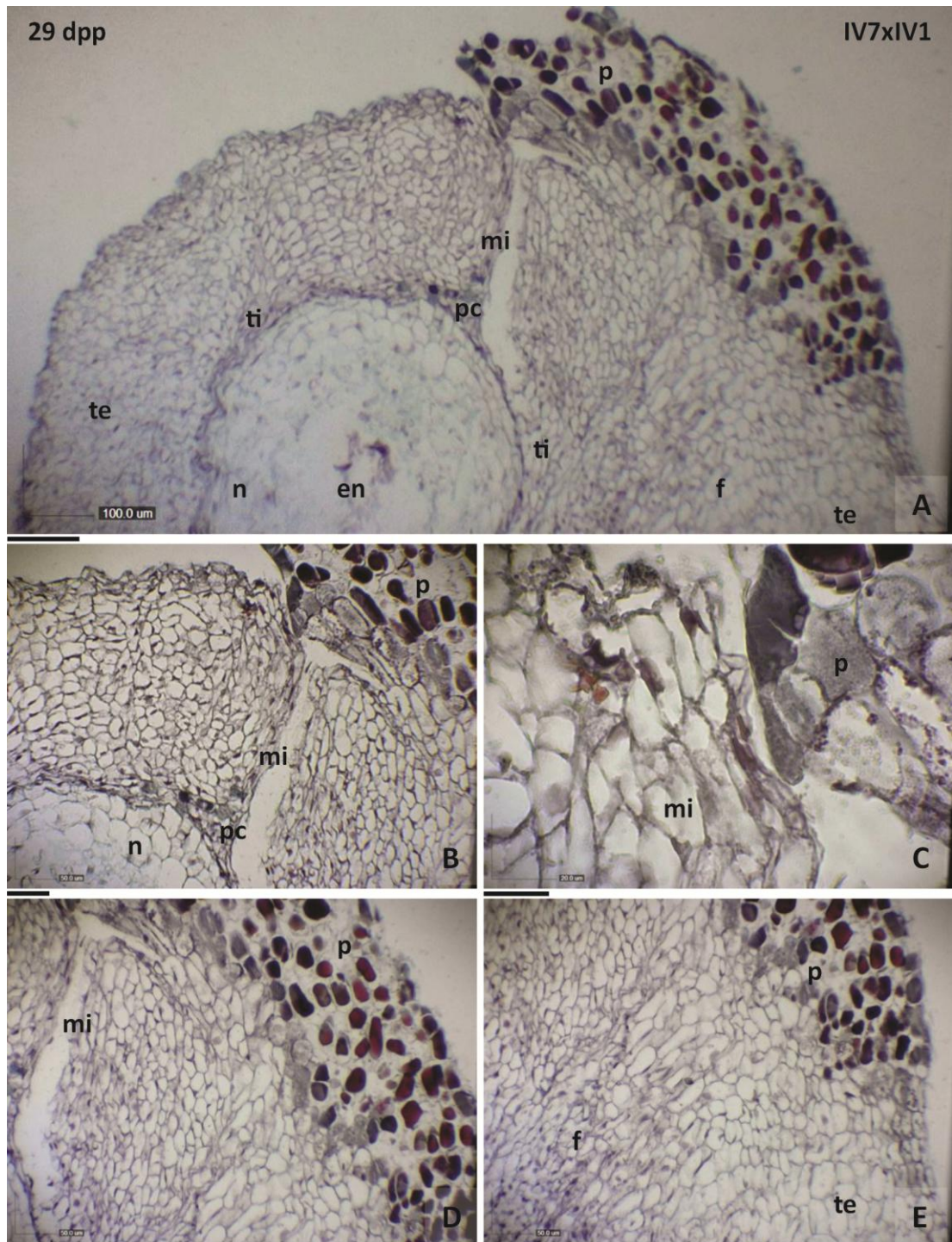


Fig. 13. Conexión placenta-semilla en desarrollo (29 dpp) de *Psidium cattleyanum*. A, ubicación de la placenta; B y C, conexión placenta-micrópilo; D-E, conexión placenta-funículo. en, endospermo; f, funículo; mi, micrópilo; n, nucelo; p, placenta; pc, placenta en forma de cono en la base del micrópilo; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Escala = A: 100 µm, B-D-E: 50 µm, C: 20 µm.

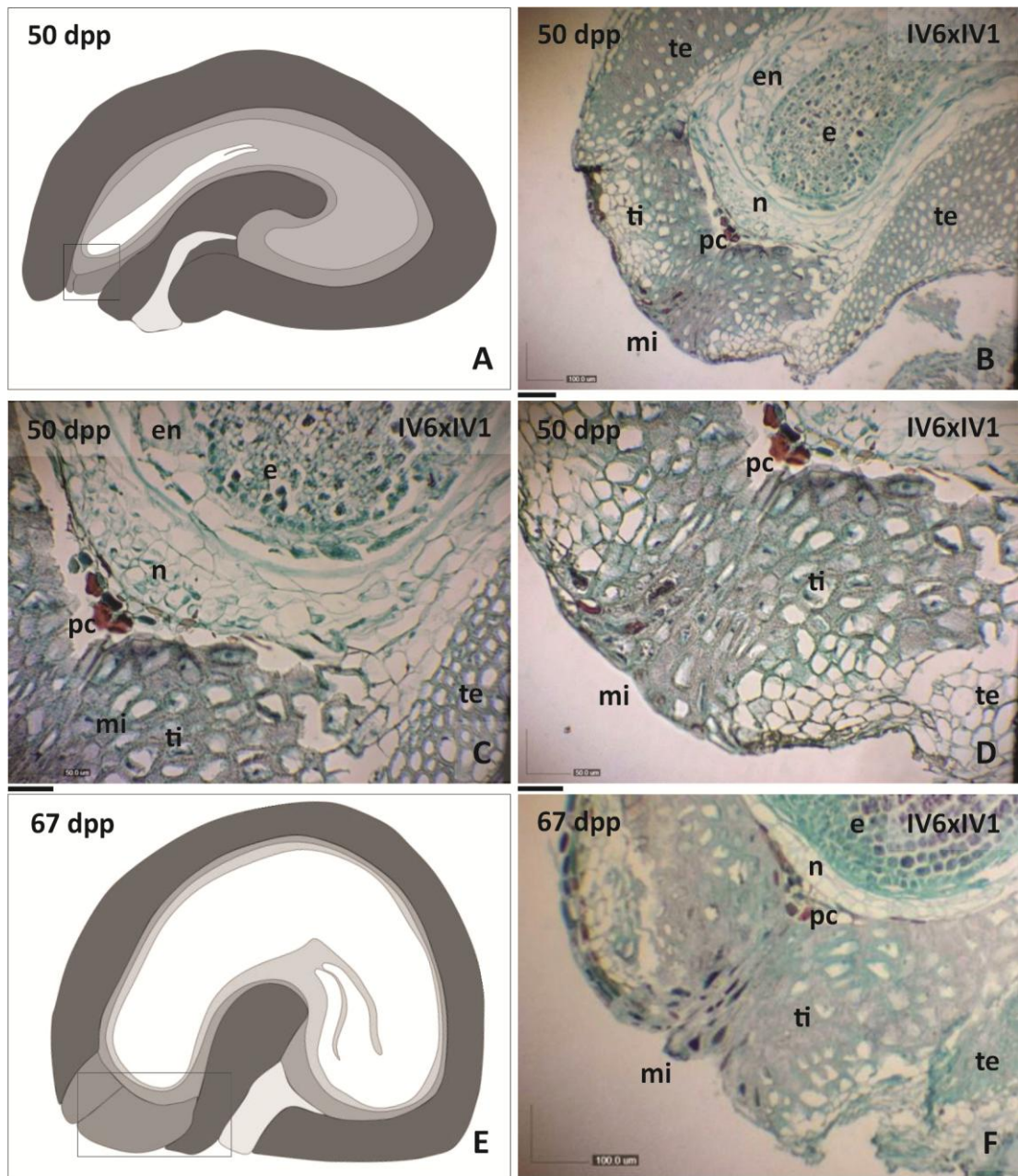


Fig. 14. Micrópilo en semillas en formación de *Psidium cattleianum*. A, esquema de la semilla a 50 dpp, en recuadro región asociada al micrópilo; B-C-D, micrópilo a 50 dpp; E, esquema de la semilla a 67 dpp, en recuadro región asociada al micrópilo; F, micrópilo a 67 dpp. e, embrión; en, endospermo; dpp, días post-polinización; mi, micrópilo; n, nucelo; pc, placenta en forma de cono en la base del micrópilo; te, tegumento externo; ti, tegumento interno. Escala = B-F: 100 μ m, C-D: 50 μ m.

2.6. DISCUSIÓN

Las semillas de las especies de la familia Myrtaceae presentan variabilidad, no solo de forma y tamaño, sino también en el desarrollo del embrión y de la cubierta seminal (Corner, 1976; Nic Lughadha & Proença, 1996; Landrum & Stevenson, 1986; Landrum & Kawasaki, 1997, Barroso *et al.*, 1984). Basados en esas diferencias, muchos trabajos de filogenia han realizado clasificaciones taxonómicas a partir de las formas del embrión (De Candolle, 1828; Berg, 1855-1856; Landrum & Kawasaki, 1997) o de la cubierta seminal (Berg, 1855-1856; McVough, 1968; Landrum & Kawasaki, 1997). Inclusive dentro de las subtribus estos caracteres permiten diferenciar a los géneros (Landrum & Sharp, 1989; Landrum & Kawasaki, 1997; Parra-O, 2014). Sin embargo, a pesar de la importancia de estos caracteres, no hay muchos trabajos que estudien la ontogenia de la semilla (Van Wyk & Botha, 1984). Las dificultades presentadas en los procesos de fijación para los estudios histológicos pueden ser una de las razones de la falta de estudios en esta área (Mauritzon, 1939; Devis, 1968 en Beardsell *et al.*, 1993). Las observaciones que se realizan en semillas maduras que son cortadas a la mitad para extraer el embrión (Landrum & Kawasaki, 1997; Sobral, 2003), permiten interpretaciones limitadas, ya que ciertas características embrionarias no son fáciles de distinguir en material maduro y deshidratado (Sánchez-Vindas, 1990). Además, cortar la testa ósea exige mucho esfuerzo y el embrión que es muy frágil, termina generalmente roto por lo que resulta difícil observar el embrión entero (Sobral, 2003). Todos estos obstáculos redundan en la falta de información y generan incógnitas sobre el origen de ciertas estructuras (Proença *et al.*, 2022). En particular en *Psidium*, no está claro cuál es el origen del tejido blando que recubre la semilla (Landrum & Sharp, 1989), así como de qué parte del óvulo se genera el opérculo, describiéndose sólo a nivel de la semilla madura (Landrum & Sharp, 1989; Landrum & Kawasaki, 1997). En el análisis ontogenético llevado a cabo en este trabajo se pudo determinar no solo como se desarrollan cada uno de los componentes de la semilla, sino también dilucidar cómo se forma el opérculo de la semilla y cuál es el origen de la sarcotesta. Los resultados obtenidos incrementan la información para las interpretaciones filogenéticas de la familia, sumando caracteres morfológicos y anatómicos que contribuyen a esclarecer

la dificultosa delimitación de géneros y especies dentro de esta familia (Proença *et al.*, 2022; Barroso *et al.*, 1984; Landrum & Kawasaki, 1997).

Las semillas analizadas provienen de óvulos anátropos, bitégmicos, con micrópila en zig-zag y crasinucelados, de acuerdo con estudios previos realizados a nivel del óvulo (Davis, 1966; Pimentel *et al.*, 2014; Souza-Pérez & Speroni, 2017). La pérdida de la forma anátropa del óvulo observada durante el desarrollo de la semilla se da en algunos casos por el crecimiento diferencial del antirafe, que produce un desplazamiento de algunas partes del óvulo y determina que la forma final llegue a ser campilótropa (Corner, 1976; Soares *et al.*, 2017) o reniforme (Corner, 1976; Rotman, 1976) como sucede en *Psidium* (Corner, 1976). En ese caso, el interior de la semilla adopta una forma curvada en forma de 'C' que es característico de muchos géneros de la circunscripción de Myrtinae de Landrum & Kawasaki (1997). Esta forma 'C' del interior seminal favorece la formación de un embrión más largo que la longitud de la semilla (Boesewinkel & Bouman, 1984).

Si bien hay coincidencia entre los patrones ontogenéticos del embrión de las plantas madres con ploidías 8x y 7x, se observaron diferencias cronológicas durante el desarrollo, tanto dentro de las plantas con el mismo nivel de ploidías, como entre plantas con diferentes ploidías.

Los patrones ontogenéticos son los mismos para plantas madres heptaploides y octoploides, sin embargo, son diferentes en la cronología de los eventos que ocurren durante el desarrollo. Si bien en ambos casos se llega a los 67 dpp con semillas maduras, las madres octoploides siempre empiezan antes el desarrollo de cada etapa del proceso ontogenético. Esto concuerda con lo observado en el desarrollo del óvulo, de estos mismos materiales, donde ambas formas comparten los mismos patrones ontogenéticos pero las plantas octoploides tienen un período de desarrollo más breve (Souza-Pérez & Speroni, 2017). Las diferencias cronológicas observadas en las distintas etapas del desarrollo del embrión, entre plantas de diferentes ploidías, pueden deberse al efecto de la poliploidía. La poliploidía, que se presenta tanto en plantas como en algunos animales (Otto & Whitton, 2000, Orr-Weaver, 2015), se caracteriza entre otras cosas por presentar células de mayor tamaño que sus relativas de menor ploidía (Cavalier-Smith, 1978; Otto & Whitton, 2000, Orr-Weaver, 2015).

Existen estudios que evalúan los tamaños relativos de las plantas de diferente ploidía (Comai, 2005; Lavania, 2013; Chevalier *et al.*, 2014; Orr-Weaver, 2015), no así estudios ontogenéticos que evalúen las diferencias de desarrollo en semillas. El patrón ontogenético observado en este estudio, así como las diferencias cronológicas encontradas, sirven como base para futuros estudios en plantas y son comparables a los resultados obtenidos en análisis de larvas y embriones de peces (*Cobitis*), donde se observó que los individuos poliploides siguen los mismos patrones ontogenéticos que los diploides, pero difieren en los tiempos de duración de cada etapa de desarrollo (Juchno *et al.*, 2016). Estas diferencias se adjudican, entre otras cosas, al tamaño del genoma (Gregory, 2002).

2.6.1. Embrión

El desarrollo del embrión en las primeras fechas de muestreo coincide con lo observado para *Psidium guajava* L. y *P. cujavillus* Burman (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) donde, si bien la secuencia de divisiones de las células en las etapas iniciales es extremadamente irregular, se forma un embrión globular (Narayanaswami & Roy, 1960). En *P. guajava* ($2n=2x=22$) el embrión globular no tiene una disposición definida de las células y no se distingue un suspensor bien organizado, mientras que en *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) ($2n=2x=22$) el embrión globular muestra una disposición más regular de sus células y un suspensor, de una a cuatro células, lo mantiene unido a la zona micropilar del saco embrionario (Narayanaswami & Roy, 1960). En nuestras observaciones los embriones globulares disponen sus células de ambas formas, es decir, algunas veces las células están bien ordenadas y en otras están desorganizadas. El suspensor, que se observa hasta los 43 dpp, tampoco presenta un gran desarrollo lo que concuerda con lo descrito para *P. guajava* y *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) (Narayanaswami & Roy, 1960) y para la familia Myrtaceae donde se describe a los suspensores como cortos, pequeños o ausentes (Tobe & Raven, 1983).

La forma del embrión al final del desarrollo coincide en parte con las descripciones realizadas históricamente para el género *Psidium*. Un embrión curvo (Legrand, 1968; McVaugh, 1968; Rotman, 1976; Sánchez-Vindas, 1990; Nic Lughada & Proença, 1996; Barroso *et al.*, 1984), en forma de ‘C’ (Rotman, 1976; Landrum & Kawasaki, 1997; Lucas, 2007) o uncinado (McVaugh, 1968), carnosos, formado por un eje hipocótilo-radícula (Barroso *et al.*, 1984) donde el hipocótilo está bien desarrollado (Nic Lughada & Proença, 1996), coincide con lo observado en nuestro trabajo. Sin embargo, no hay coincidencia con la descripción de la morfología de los cotiledones, los cuales en general se describen como delgados (Corner, 1976), foliáceos (Legrand, 1968), pequeños (Berg, 1855-1856 y 1857-1859; Corner, 1976; Rotman, 1976; Nic Lughada & Proença, 1996) a muy pequeños (Legrand, 1968; Sánchez-Vindas, 1990) o rudimentarios membranáceos (Barroso *et al.*, 1984); donde un hipocótilo más desarrollado que los cotiledones representa una estrategia evolutiva para la incorporación de nutrientes en el embrión a nivel del hipocótilo (Landrum & Kawasaki, 1997). En base a esta característica de cotiledones reducidos, sin funciones haustoriales o de reserva, la morfología del embrión de *Psidium* fue clasificado como paracotiledonar (Vogel, 1980) por Gomes (2015). Nuestras observaciones indican que los cotiledones son largos, llegan casi a la mitad de la distancia del eje hipocótilo-radícula, y acumulan contenidos globulares en sus células. Esto indica que, aunque en menor proporción que el eje hipocótilo-radícula, los cotiledones en *Psidium cattleianum* también cumplen una función de acumulación de reservas y deben interpretarse como verdaderos cotiledones.

2.6.2. Endospermo

El endospermo observado es de tipo nuclear (Souza-Pérez & Speroni, 2017). En las primeras fechas de nuestro muestreo los núcleos, grandes y con varios nucléolos, están sostenidos por velos citoplasmáticos como se observa en *Psidium guajava* y *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) (Narayanaswami & Roy, 1960). La celularización, que comienza entre los 36 y 43 dpp, avanza desde la zona micropilar como en *Psidium guajava* y *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman)

Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) (Narayanaswami & Roy, 1960) y desde la periferia hacia el centro. A los 67 dpp se observan restos de endospermo (Nic Lughada & Proença, 1996) aplastados contra el embrión que no son despreciables en cantidad, por lo que las semillas maduras no serían estrictamente exalbuminadas, lo mismo sucede en *Psidium rufum* DC donde se registró presencia en semillas maduras de tejido albuminoso que los autores adjudicaron a un posible endospermo (Soares *et al.*, 2017). En general en el género *Psidium* se clasifica a las semillas maduras como exalbuminadas (Rotman, 1976), al igual que en el resto de las Myrtaceae (Schmid, 1980; Tobe & Raven, 1983), ya que se considera que el endospermo es consumido durante el desarrollo del embrión (Roy, 1953; Vijayaraghvan & Prabhakar, 1984). En algún caso puede quedar un relicto (Nic Lughada & Proença, 1996; Landrum & Kawasaki, 1997), por no haber sido completamente consumido por el embrión (Wilson, 2010), como una capa en la zona del micrópilo (Corner, 1976).

2.6.3. Nucelo

El nucelo, que consta de 4-7 capas de células, se mantiene hasta los 50 dpp luego de lo cual las células son aplastadas por el embrión. Esto concuerda con lo reportado para *Psidium*, donde se menciona un nucelo persistente de 2-3 capas, que eventualmente se aplasta (Corner, 1976). Sin embargo, el nucelo de los polos micropilar y chalazal persiste hasta el final. En la zona chalazal, observamos que el nucelo forma una hipostasa. En *Psidium guajava* y *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) el nucelo tiene un gran desarrollo de hipostasa en la semilla madura (Narayanaswami & Roy, 1960). En muchos taxa, el nucelo de la zona chalazal se modifica durante el desarrollo del óvulo (Tilton, 1980) y la modificación más común es la formación de una hipostasa, definida por primera vez por Van Tieghen en 1869 como cualquier modificación que presente la chalaza (Tilton, 1980). Esta definición es amplia y ha sido modificada por varios autores a lo largo de los años. Dentro de los más relevantes está Tilton (1980) que describe a la hipostasa como un grupo de células modificadas, con paredes usualmente lignificadas, ubicadas generalmente dentro de

la zona chalazal del óvulo, pero que puede rodear una porción del megagametofito femenino y extenderse parcialmente hacia la zona micropilar y ocupar la mitad del óvulo. Von Teichman & Van Wyk en 1991, consideraron a la hipostasa como tejido nucelar de la zona chalazal, aunque distinguen dos categorías, hipostasa *sensu stricto* y *sensu latu*. Hipostasa s.s. comprende a un grupo de células con paredes ligeramente engrosadas que se ubican en la zona chalazal y que no se extienden en superficie, ni participan en la formación de la cubierta seminal, sino que tendrían un rol en la nutrición del saco embrionario. La hipostasa s.l. la definen como un conjunto de células nucleares de la región chalazal, que inicialmente forman una especie de disco, las células contienen taninos, y que luego proliferan junto con la chalaza en el desarrollo de la cubierta seminal, formando parte de ella. En este último caso, la hipostasa tendría una función de protección del embrión (Von Teichman & Van Wyk, 1991). La hipostasa s.l. fue reportada en *Eugenia* (Van Wyk & Botha, 1984). Es interesante la asociación que existe entre la presencia de hipostasa y ciertos estados de caracteres ancestrales como en óvulos bitégmicos (73 %), óvulos crasinucelados (72 %), endospermo nuclear (74 %), semilla pequeña (68 %), hábito leñoso (64 %) y hábitat tropical (58 %) (Von Teichman & Van Wyk, 1991). *Psidium cattleyanum* cumple con todos los estados de los caracteres mencionados, por lo que no es extraño que presente hipostasa. Para el género *Psidium* está reportada la presencia de una hipostasa parduzca de paredes finas (Corner, 1976). En *Psidium cattleyanum* observamos que la hipostasa tiene forma de casquete y se ubica por debajo de otras células nucleares comunes. Esto está de acuerdo con lo observado para óvulos crassinucelados, donde un conjunto de células nucleares se encuentra entre la hipostasa y el saco embrionario (Batygina, 2002). Estas células nucleares se consumen durante el desarrollo de la semilla, por lo que la hipostasa queda finalmente en contacto directo con el embrión (Batygina, 2002). Sin embargo, en nuestras observaciones esto no sucede, ya que quedan relictos de estas células en las semillas maduras. La hipostasa evoluciona durante el desarrollo seminal y, desde las primeras fechas de muestreo en nuestro trabajo, presentaba células modificadas con pared gruesa y contenidos corpusculares. En etapas posteriores del desarrollo, las células se rellenaron completamente con contenidos de color rojo o ámbar. La

hipostasa, que es un tejido especializado, suele modificarse durante el desarrollo de la semilla engrosando sus paredes, en algunos casos lignificándose, y rellenando sus células con taninos (Boesewinkel & Bouman, 1984). En *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. se determinó que los contenidos celulares de la hipostasa correspondían a compuestos taníferos (Marzinek & Mourão, 2003). La hipostasa puede actuar como barrera al pasaje de agua desde la chalaza al saco embrionario, ya que los taninos impiden el transporte simplástico, mientras que las paredes engrosadas limitan el transporte apoplástico (Von Teichman & Van Wyk, 1991). Las células centrales de la hipostasa observadas en nuestro trabajo, que se organizan para formar un pico que se introduce entre las células del nucelo más internas para conectar con el endospermo, pueden ser una evidencia anatómica de que la hipostasa suministra nutrientes al endospermo y/o facilita la traslocación de nutrientes al saco embrionario y luego al embrión (Von Teichman & Van Wyk, 1991). Así la hipostasa actuaría inicialmente como conector entre la chalaza y el saco embrionario, y posteriormente con endospermo y embrión, facilitando el pasaje de nutrientes y regulando el pasaje de agua (Boesewinkel & Bouman, 1984).

2.6.4. Cubierta seminal

La forma como se desarrolla la cubierta seminal no solo proporciona información sobre un conjunto importante de caracteres para la especie, sino que también ayuda a interpretar de manera correcta como está conformada la cubierta seminal en la semilla madura, ya que muchas estructuras aparentemente idénticas, pueden tener diferentes orígenes (Boesewinkel & Bouman, 1984).

La cubierta seminal de muchas de las especies de la familia Myrtaceae está conformada por tegumento interno y externo (Beardesell *et al.*, 1983), sin embargo, en la subfamilia Myrtoideae está formada solo a partir del tegumento externo (Van Wyk & Botha, 1984) como está reportado para *Psidium guajava* y *P. cujavillus* (ahora *P. guajava* var. *cujavillus* (Burman) Krug & Urb. según <https://tropicos.org/name/22105086>) (Narayanaswami & Roy, 1960).

En *Psidium cattleyanum*, a pesar de que los óvulos son bitégmicos (Corner, 1976; Souza-Pérez & Speroni, 2017), está registrado que generalmente el tegumento

interno, no es multiplicativo ni se lignifica en el desarrollo de la semilla, colapsa (Corner, 1976) en etapas tempranas del desarrollo seminal (Souza-Pérez & Speroni, 2017) y la cubierta seminal está formada solo por el tegumento externo que lentamente se esclerosa (Corner, 1976). El micrópilo, que originalmente en el óvulo está formado por ambos tegumentos y tiene forma de zig-zag (Souza-Pérez & Speroni, 2017), termina siendo, según la interpretación de Corner (1976), un exostoma con apariencia de endostoma. Si bien existe ambigüedad en esta descripción, establece que el origen del micrópilo es a partir del tegumento externo. Nuestras observaciones, sin embargo, indican que ambos tegumentos participan en la formación de la cubierta seminal; que el micrópilo está formado solo por el tegumento interno, alrededor del cual se forma un opérculo; y que el tegumento externo además de esclerosarse forma una sarcotesta.

2.6.4.1. Tegumento externo: La epidermis externa del tegumento externo presenta a los 22 dpp cuatro capas de espesor, cuatro veces más de lo que se observa en el óvulo (Souza-Pérez & Speroni, 2017). En cambio, en *Psidium guineense* Sw. y *P. australe* var. *argenteum* (Berg.) Landrum, la epidermis se mantiene de una sola capa de espesor (Moreira-Coneglian, 2011). La sarcotesta, que según nuestras observaciones comienza a formarse a partir de los 43 dpp por crecimiento en altura de las células epidérmicas, se desarrolla en *P. guineense* y *P. australe* var *argenteum* por alargamiento de las células de la zona externa del mesotegumento del tegumento externo, quedando la capa de epidermis por fuera de ella (Moreira-Coneglian, 2011). El término sarcotesta se aplica a la parte externa carnosa de la cubierta seminal (Boesewinkel & Bouman, 1984), por lo que puede formarse de distinto origen (Corner, 1976). Landrum & Sharp (1989) mencionan para *Psidium* la presencia de un tejido carnoso (o blando) en la cubierta de la semilla, pero dudan si el mismo proviene del endocarpo del fruto. El registro de la sarcotesta de las semillas de *P. cattleyanum* que se realiza en este trabajo, es el segundo en la literatura para la familia Myrtaceae (Moreira-Coneglian, 2011) y el primero que identifica su origen a partir de la epidermis. Las semillas de *Psidium cattleyanum* pueden clasificarse entonces como `sarcotestal seeds` (Schmid, 1986). La presencia de sarcotesta en las

semillas se asocia a mayor contenido de agua frente a las semillas que no tienen tal condición (Monteiro *et al.*, 2021), y esta característica puede indicar que las semillas que presentan sarcotesta son sensibles a la desecación (Scalon *et al.*, 2012). La sarcotesta siempre tiene asociada una capa esclerenquimatosa por debajo (Boesewinkel & Bouman, 1984; Schmid, 1986), lo que concuerda con nuestros resultados, ya que por debajo se ubica el mesotegumento, que coincide con la parte de la cubierta seminal que se esclerifica.

Existen alrededor de 30 familias de angiospermas para las que se describe la presencia de estomas en la cubierta seminal (Boesewinkel & Bouman, 1984) y las Myrtaceae no están incluidas en la lista. La ausencia de estomas en la cubierta seminal fue confirmada en nuestro trabajo.

Las capas que forman la mesotesta del tegumento externo se multiplican en las primeras fechas de muestreo como está reportado para *Psidium* (Corner, 1976). Además, las células crecen alargándose en sentido perpendicular al largo de la semilla característica que permite diferenciar a *Psidium* de otros géneros (Landrum & Sharp, 1989). A partir de los 36-43 dpp comienza la lignificación de todas las células del mesotegumento, a diferencia de lo que sucede en *Psidium guineense* Sw. y *P. australe* var. *argenteum* (O. Berg) Landrum, donde se esclerosan solo las capas internas del mesotegumento, ya que la parte externa forma la sarcotesta (Moreira-Coneglian, 2011). Al final del desarrollo, las células poseen paredes gruesas, con puntuaciones visibles y con lumen pequeño, como está registrado para *Psidium* (Landrum & Sharp, 1989), aunque Corner (1976) describe células con lumen amplio para esta zona del mesotegumento. Definir la ubicación de la capa mecánica de la cubierta seminal es importante ya que es uno de los aspectos más característicos de la mismas (Corner, 1976) y se ha desarrollado un sistema de clasificación al respecto (Corner, 1976; Boesewinkel & Bouman, 1984). Sin embargo, no siempre es posible aplicar la clasificación. En algunos casos es difícil interpretar en la semilla madura la procedencia de la capa esclerótica y, en otros, se produce una combinación de distintos orígenes de la misma, que lleva a confusiones sobre la interpretación durante la ontogenia. Por ello, muchas veces se describe simplemente como exotesta, si hay una capa exterior ligeramente engrosada de la testa indiferenciada

(Boesewinkel & Bouman, 1984). Para el género *Psidium* la descripción de la cubierta seminal se ha basado en caracteres generales presentes en la semilla madura. Se ha separado de otros géneros por la consistencia ósea de su testa (McVaugh, 1968; Legrand, 1968; Rotman, 1976; Sobral, 2003), usualmente lisa y brillante para algunos autores (Rotman, 1976) y áspera y opaca para otros (Landrum & Sharp, 1989; Landrum & Kawasaki, 1997). El tegmen fue definido como membranáceo y la cubierta ósea se interrumpe en el extremo micropilar donde se encuentra una estructura formada de células de pared delgada, que fue interpretada como un opérculo por Rotman (1976). En nuestro análisis sobre la ontogenia de estas estructuras observamos que solo las células del mesotegumento se esclerosan para formar la cubierta seminal. El carácter distintivo de la cubierta seminal es la capa mecánica, la cual no necesariamente debe estar lignificada (Corner, 1976; Boesewinkel & Bouman, 1984). La posición y naturaleza de la/s capa/s de tejido mecánico es/son de gran importancia, por lo que Corner (1976) creó una clasificación en base a esos dos estados del carácter (Boesewinkel & Bouman, 1984). Si la capa mecánica se encuentra en la testa, las semillas se clasifican como `testal seeds`, mientras que, si se ubica en el tegmen se clasifican como `tegmic seeds` (Corner, 1976). Además, se puede especificar, en particular en qué parte de la testa o el tegmen se ubica. Así, se distingue entre exo-, meso- y endotestal y exo-, meso- y endotegmic seed, además estos tipos pueden a su vez dividirse de acuerdo a la forma de las células mecánicas (Corner, 1976; Boesewinkel & Bouman, 1984). En nuestro caso la capa mecánica se ubica en el mesotegumento y las células son elongadas y escleróticas, por lo que las semillas de *Psidium cattleianum* se ubican dentro de la categoría de semillas con cubierta seminal de tipo mesotesta o `mesotestal seed-coats` (Corner, 1976; Boesewinkel & Bouman, 1984). En esta categoría se ubican muchas de las semillas de especies de la familia Myrtaceae (Corner, 1976).

2.6.4.2. Tegumento interno: En nuestras observaciones el tegumento interno tiene zonas que siguen distintas vías de desarrollo. La zona que recorre los márgenes del interior seminal cumple con las características descritas para el género, ya que no es multiplicativo y se mantiene de una a dos capas de células de espesor, aunque a

veces se observa aplastado (Corner, 1976). El hecho de que muchas veces se observe aplastado, puede deberse a que las células que tienen paredes delgadas, se rompan o compriman durante el procesamiento histológico, ya que esta falta de consistencia celular también fue observada en los óvulos (Souza-Pérez & Speroni, 2017). Estas células, que pueden ser persistentes en *Psidium* (Corner, 1976), y las de la zona de la chalaza se caracterizan por contener sustancias y corpúsculos que pueden ser acúmulos de taninos (Corner, 1976).

En contraste, la zona micropilar del tegumento interno es multiplicativa y forma alrededor del micrópilo un opérculo. Esto está de acuerdo con la idea de Bhojwani y Bhatnagar (1974) que postulan que los opérculos, en general, se forman por la proliferación del tegumento interno en su zona apical (Carrillo-Ocampo & Engleman, 2002). En los óvulos de Myrtaceae, el micrópilo está formado por los dos tegumentos excepto en *Thryptomene* y *Wehlia* donde solo el tegumento interno está involucrado (Davis, 1966). El opérculo, conocido en inglés como operculum, embryostega, stopped o plug (Boesewinkel & Bouman, 1984), es una especie de tapa o tapón que se desprende de la cubierta seminal durante la germinación para facilitar que emerja la radícula en esa zona. Esta estructura se ha registrado en 25 familias de eudicotiledóneas y 25 de monocotiledóneas (Bregman & Bouman, 1983; Boesewinkel & Bouman, 1984) y es posiblemente de origen polifilético, por lo que su función puede ser diversa (Boesewinkel & Bouman, 1984). En algunos casos facilita la germinación de las semillas, al desarrollar capas protectoras mecánicamente fuertes en la cubierta de la semilla, que no ocasionan una presión o resistencia extrema durante la germinación (Boesewinkel & Bouman, 1984). En otros casos, los opérculos solo proporcionan protección a la zona micropilar, que es generalmente una parte de mayor debilidad de la cubierta seminal (Boesewinkel & Bouman, 1984). En las especies de Myrtoideae que poseen semillas de cubierta dura, un opérculo ubicado por debajo de la parte basal del eje hipocótilo-radícula, facilita la emergencia del embrión durante la germinación (Nic Lughadha & Proença, 1996). En *Psidium cattleianum* la germinación se da por la abertura del opérculo y posterior protrusión de la radícula (Gomes *et al.*, 2015). Del mismo modo en *Psidium rufum* DC, la plántula inicia su desarrollo abriendo el opérculo a modo de tapa, por la

expansión del eje hipocótilo-radícula en esa zona (Soares *et al.*, 2017). En *P. sobralianum* Landrum & Proença en cambio, el opérculo abre dos días antes que emerja la radícula (Freitas *et al.*, 2018). En las semillas maduras de *Psidium cattleyanum* observamos que el micrópilo sobresale de los márgenes de la cubierta seminal originada del tegumento externo, ya que el opérculo tiene una forma cónica y la cubierta seminal apenas cubre parte de sus lados. Por lo tanto, el opérculo es una protuberancia visible a simple vista en las semillas de *P. cattleyanum*. Algo similar, aunque menos evidente, podemos observar si analizamos las imágenes de semillas maduras de *Psidium sobralianum* Landrum & Proença que se presentan en el trabajo de Freitas *et al.* (2018). Sin embargo, basándonos en imágenes del trabajo de Guevara *et al.* (2020) sobre semillas maduras de *Psidium guajava* observamos que el opérculo posee una forma de cono aplanado en el ápice, no sobresale y permanece por debajo del contorno de la testa seminal formada por el tegumento externo.

2.6.5. Placenta

La placenta es una zona de la flor de activa interacción nutricional entre el carpelo y los óvulos, que también ha proporcionado valiosos caracteres informativos para resolver las relaciones filogenéticas de los siete géneros que componen la tribu australiana Eucalypteae (Bohte & Drinnan, 2005). Estos autores observaron que la dinámica de desarrollo de la placenta está relacionada con el número y disposición final de los óvulos en el ovario. Una placenta inicial de forma elíptica se observa en todos los géneros de Eucalypteae y luego se divide en diferentes patrones de expansión que determina un arreglo final de los óvulos que los diferencia.

Al igual que la placenta expandida de Eucalypteae, en *Psidium cattleyanum* la placenta está bien desarrollada, es protrusiva en el ovario de la flor y se introduce rellenando los lóculos del ovario (Narayanaswami & Roy, 1960; Castro *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2019). Esta placenta, tradicionalmente llamada ‘peltada’, corresponde a los márgenes de los carpelos según el análisis ontogenético realizado por Pimentel *et al.* (2014) en *Psidium cattleyanum* y *P. guineense*, y es considerada una condición plesiomórfica dentro de Myrteae. Souza-Pérez y Speroni (2017) confirmaron el origen carpelar de la placenta a través de estudios ontogenéticos del

gineceo de las mismas plantas seleccionadas de *P. cattleyanum* que fueron utilizadas en nuestro trabajo.

En las flores con óvulos anátropos, donde el micrópilo está dirigido hacia la placenta, los tubos polínicos crecen sobre la superficie de la placenta hacia el micrópilo (Endress, 1994; Johri *et al.*, 2001). En algunos casos la placenta se extiende, penetra a través del micrópilo y se ajusta a modo de capucha o dosel alrededor del nucelo, sirviendo de puente para el tubo polínico (Maheshwari, 1950). Las características celulares indican una alta actividad metabólica, proveyendo de sustancias que guían y nutren al tubo polínico (Shivanna & Johri, 1985). Coincidentemente, en nuestro trabajo pudimos observar que las células placentarias persisten durante el desarrollo de la semilla con las mismas características celulares que presentan en los óvulos jóvenes. Durante la formación de las semillas, las células placentarias se introducen por el micrópilo convirtiéndose en una vía de conexión nutricional para el embrión en formación. En la formación de la testa seminal y más precisamente del endostoma, las células placentarias ubicadas en el micrópilo quedan aplastadas y se mantienen algunos restos en la base del micrópilo, junto a los restos de nucelo.

2.7. CONCLUSIONES

Las semillas a pesar de derivar de óvulos anátropos adoptan una forma campilótropa con el interior seminal en forma de C.

Los embriones durante su desarrollo siguen un patrón secuencial morfológico globular, cordiforme, torpedo y finalmente forma 'C', ya que el eje hipocótilo-radícula, que excede el largo del interior seminal, se pliega en la zona de la chalaza adoptando una forma curva. Los cotiledones, en la madurez seminal, están bien desarrollados y se ubican en el ápice del hipocótilo recostados sobre el eje hipocótilo-radícula. El embrión al final del desarrollo está plegado en forma de C y las células del meristema fundamental están rellenas de corpúsculos que tiñen de rojo.

El patrón morfológico que sigue el embrión durante su desarrollo es el mismo en todas las semillas analizadas para todas las plantas madres. Sin embargo, hay diferencias cronológicas en la duración de cada etapa morfológica del embrión según

la madre que le dio origen a la semilla, y a veces en semillas obtenidas del mismo cruzamiento, lo que podría atribuirse a las diferencias en la ploidía de los embriones. Embriones de menor ploidía enlentecen algunas etapas del desarrollo, aunque al final todas las que fueron exitosas llegan al mismo estadio.

El nucelo persiste durante el proceso y forma una hipostasa en el extremo chalazal. La hipostasa conecta el haz vascular que llega desde el funículo con el endospermo. El endospermo que es de tipo nuclear se celulariza a partir de los 36 dpp y se mantiene en la semilla madura.

La cubierta seminal está formada por el tegumento externo, la capa mecánica está formada por el mesotegumento lignificado, por lo que se clasifica a la semilla como mesotestal-seed. Se forma una sarcotesta a partir de la epidermis del tegumento externo.

Las células del tegumento interno se multiplican para formar el micrópilo, alrededor del cual las células se lignifican para obtener al final del desarrollo un opérculo a modo de tapa.

La placenta se introduce por el micrópilo y forma una estructura cónica en la base del nucelo.

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo amplían los conocimientos de la familia Myrtaceae y pueden contribuir aportando caracteres para las delimitaciones taxonómicas.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- ATCHINSON, E. 1947. Chromosome Numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany*. 34 (3), 159–64. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1947.tb12970.x>
- BARROSO, G. M., A. L. PEIXOTO, C. G. COSTA, C. L. F. ICHASO, E. F. GUIMARÃES & H. C. DE LIMA. 1984. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. vol. 2. Imp. Univ. Federal de Viçosa, Viçosa.
- BATYGINA, T. B. 2002. *Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts*. Vol. 1. <https://doi.org/10.1201/b10186>

- BEARDSSELL, D. V., S. P. O'BRIEN, E. G. WILLIAMS, R. B. KNOX & D. M. CALDER. 1993. Reproductive Biology of Australian Myrtaceae. *Australian Journal of Botany*. 41, 511–26. <https://doi.org/10.1071/BT9930511>
- BERG, O. 1855-1856. Revisio Myrtacearum Americae. *Linnaea*. 27, 1-472.
- BERG, O. 1857-1859. Myrtaceae. In: C. F. P. von Martius, *Flora Brasiliensis*. 14, 1-655.
- BHOJWANI, S. S. & S. P. BHATNAGAR. 1974. *The embryology of angiosperms*. Vikas Publishing House, Dehli.
- BOESEWINKEL, F. D. & F. BOUMAN. 1984. The seed: structure. In: JOHRI, B.M. (eds), *Embryology of Angiosperms*, pp 567-610. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_12
- BOHTE, A. & A. DRINNAN. 2005. Ontogeny, anatomy and systematic significance of ovular structures in the 'eucalypt group' (Eucalypteae, Myrtaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 255, 17-39. <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0291-3>
- BREGMAN, R. & F. BOUMAN. 1983. Seed germination in Cactaceae. *Botanical journal of the Linnean Society*. 86, 357-374. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1983.tb00977.x>
- CARRILLO-OCAMPO, A. & E. M. ENGLEMAN. 2002. Anatomía de la semilla de *Tigridia pavonia* (Iridaceae). *Boletín de La Sociedad Botánica de México*. 70, 66–77. <https://doi.org/10.17129/botsci.1655>
- CASTRO, C. M., M. C. B. RASEIRA & R. C. FRANZON. 2004. Descrição da planta. En: BASSOLS RASEIRA M. C. et al. (eds.), *Espécies frutíferas nativas do Sul do Brasil*, pp. 13-28. Embrapa Clima Temperado, Pelotas.
- CAVALIER-SMITH, T. 1978. Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of cell science*. 34, 247-278. <https://doi.org/10.1242/jcs.34.1.247>
- CHEVALIER, C., M. BOURDON, J. PIRRELLO, C. CHENICLET, F. GÉVAUDANT & N. FRANGNE. 2014. Endoreduplication and fruit growth in tomato: evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. *Journal of Experimental Botany*. 65, 2731-2746. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert366>

- COMAI, L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics*. 6, 836-846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- CORNER, E. J. H. 1976. *The Seeds of Dicotyledons*: Volume 1 y 2. Cambridge University Press, Cambridge.
- COSTA, I. R. & E. R. FORNI-MARTINS. 2006. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from south-eastern Brazil. *Australian Journal of Botany* 54, 409–15. <https://doi.org/10.1071/BT04199>
- DAVIS, G. L. 1966. *Systematic embryology of the angiosperms*. John Wiley and Sons. Inc., New York.
- DE CANDOLLE, A. P. 1828. *Myrtaceae. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Vol. 3. Treuttel and Würtz, Paris.
- DEGENER, O. 1939. *Psidium cattleianum* Sabine. In: Publication private, *Flora Hawaiiensis: The new illustrated Flora of the Hawaiian Islands fam. 273*, vol. 4: 2. Honolulu.
- ENDRESS, P. K. 1994. Floral structure and evolution of primitive angiosperms: recent advances. *Plant Systematics and Evolution*. 192, 79–97. <https://doi.org/10.1007/BF00985910>
- FREITAS, M. A., E. M. P. DE LUCENA, O. H. BONILLA, A. L. DA SILVA & V. DA SILVA SAMPAIO. 2018. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e germinação das sementes de *Psidium sobralianum* do vale do São Francisco, Brasil. *Revista Caatinga*. 31, 926-934. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018v31n415rc>
- GOMES, J. P., L. M. DE OLIVEIRA, C. S. S. FRANÇA, H. M. DACOREGIO & R. L. C. BORTOLUZZI. 2015. Morphological characterization of sSeedlings during the germination seeds of *Psidium cattleianum* and *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Ciencia Florestal*. 25, 1035-42. <https://doi.org/10.5902/1980509820665>
- GOVAERTS, R., M. SOBRAL, P. ASHTON, F. BARRIE, B. K. HOLST, L. LANDRUM, K. MATSUMOTO, F. F. MAZINE, E. N. LUGHADHA, C. PROENÇA, L. H. S. SILVA, P. WILAON & E. LUCAS. 2008. *World checklist of Myrtaceae*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond.

- GREGORY, T. R. 2002. Genome size and developmental complexity. *Genetica*. 115, 131-146. <https://doi.org/10.1023/A:1016032400147>
- GUEVARA, J. E., C. I. CARDOZO & L. G. SANTOS. 2020. Caracterización morfo-anatómica y protocolo para estimar la viabilidad de semillas de *Psidium guajava*. *Acta Agronómica*. 69, 155-161. <https://doi.org/10.15446/acag.v69n2.65257>
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York.
- JOHRI, B. M., P. S. SRIVASTAVA & N. SINGH. 2001. Reproductive biology of angiosperms. In: JOHRI, B. M. & P. S. SRIVASTAVA. (eds), *Reproductive biology of plants*, pp. 237-272 Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-50133-3_11
- JUCHNO, D., A. BORÓN, J. SZLACHCIAK & R. KUJAWA. 2016. Early development and post embryonic skeletal morphology of the progeny of spined loach *Cobitis taenia* L. (Teleostei, Cobitidae) and its naturally occurring allotriploids. *Folia Biologica (Kraków)*. 64, 153-162. https://doi.org/10.3409/fb64_3.153
- LANDRUM, L. R. & D. STEVENSON. 1986. Variability of embryos in subtribe Myrtinae (Myrtaceae). *Systematic Botany*. 11, 155–62. <https://doi.org/10.2307/2418954>
- LANDRUM, L. R. & M. L. KAWASAKI. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*. 49, 508–36. <https://doi.org/10.2307/2807742>
- LANDRUM, L. R. & W. P. SHARP. 1989. Seed coat characters of some american Myrtinae (Myrtaceae): *Psidium* and related genera. *Systematic Botany*. 14, 370–76. <https://doi.org/10.2307/2418927>
- LAVANIA, U. C. 2013. Polyploidy, body size, and opportunities for genetic enhancement and fixation of heterozygosity in plants. *The Nucleus*. 56, 1-6. <https://doi.org/10.1007/s13237-013-0075-7>
- LEGRAND, D. 1968. *Las mirtáceas del Uruguay, III* (No.7). Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo.

- LUCAS, E. J. 2007. *Systematic studies in neotropical Myrtaceae with an emphasis on Myrcia s.l.: the evolution and biogeography of a large south american clade*. PhD. Thesis. The Open University, United Kingdom.
- MACHADO, R. M. & E. R. FORNI-MARTINS. 2022. *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), a neotropical polyploid complex with wide geographic distribution: insights from cytogenetic and DNA content analysis. *Brazilian Journal of Botany*. 45: 943-955. <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00829-w>
- MACHADO, R. M., F. A. DE OLIVEIRA, F. DE MATOS ALVES, A. P. DE SOUZA & E. R. FORNI-MARTINS. 2020. Population genetics of polyploid complex *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae): preliminary analyses based on new species-specific microsatellite loci and extension to other species of the genus. *Biochemical Genetics*. no. March. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-10002-1>
- MAHESHWARI, P. 1950. *An introduction to the Embryology of Angiosperms*. Mc. Graw-Hill, New York. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5681>
- MARZINEK, J. & K. S. M. MOURÃO. 2003. Morphology and anatomy of the fruit and seed in development of *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. - Bombacaceae. *Revista Brasileira de Botânica*. 26, 23–34. <https://doi.org/10.1590/s0100-84042003000100004>
- MAURITZON, J. 1939. Contributions to the orders Rosales and Myrtales. *Acta Universitatis Lundensis*. 35, 1-121.
- MCVAUGH, R. 1968. The genera of American Myrtaceae: an interim report. *Taxon*. 17, 354-418. <https://doi.org/10.2307/1217393>
- MONTEIRO, L. N. H., A. F. A. FERREIRA, M. G. F. RODRIGUES, G. A. FARIA & A. C. BOLIANI. 2021. Water content of pomegranate seeds subjected to storage and packaging periods. *Comunicata Scientiae*. 12, e3284. <https://doi.org/10.14295/CS.v12.3284>
- MOREIRA-CONEGLIAN, I. R. 2011. Morfoanatomia de ovário, pericarpo e semente de sete espécies de Myrteae DC (Myrtaceae). PhD Thesis. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- NARAYANASWAMI, S. & S. K. ROY. 1960. Embryology of the Genus *Psidium*. *Journal of the Indian Botanical Society*. 39, 35–45. <https://doi.org/10.1080/13594866009441683>
- NIC LUGHADHA, E. & C. PROENÇA. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*. 83, 480–503. <https://doi.org/10.2307/2399990>
- NOGLER, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. In: B. M. JOHRI, B. M. (ed.), *Embryology of Angiosperms*, pp. 475-518. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_10
- ORR-WEAVER, T. L. 2015. When bigger is better: the role of polyploidy in organogenesis. *Trends in Genetics*. 31, 307-315. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.011>
- OTTO, S. P. & J. WHITTON. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*. 34, 401-437. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>
- PARRA-O, C. 2014. Sinopsis de la familia Myrtaceae y clave para la identificación de los géneros nativos e introducidos en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 38, 261-277. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.128>
- PIMENTEL, R. R., N. P. BARREIRA, D. P. SPALA, N. B. CARDIM, M. C. SOUZA, B. SÁ-HAIAD, S. R. MACHADO, J. F. ROCHA & L. D. R. SANTIAGO-FERNANDES. 2014. Development and evolution of the gynoecium in Myrteae (Myrtaceae). *Australian Journal of Botany*. 62, 335–46. <https://doi.org/10.1071/BT14058>
- PROENÇA, C. E. B., A. C. TULER, E. J. LUCAS, T. N. D. C. VASCONCELOS, J. E. Q. DE FARIA, V. G. STAGGEMEIER, P. S. DE-CARVALHO, E. R. FORNI-MARTINS, P. W. INGLIS, L. R. DA MATA & I. R. DA COSTA. 2022. Diversity, phylogeny and evolution of the rapidly evolving genus *Psidium* L. (Myrtaceae, Myrteae). *Annals of Botany*. 129, 367-388. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac005>
- RASEIRA, M. & A. RASEIRA. 1996. *Contribuição Ao Estudo Do Aracazeiro, Psidium cattleianum*. Embrapa-CPACT, Pelotas.

- RICHARDS, A. J. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 358, 1085-1093. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1294>
- ROTMAN, A. D. 1976. Revisión del género *Psidium* en la Argentina (Myrtaceae). *Darwiniana*. 20, 418–444.
- ROY, S. K. 1953. Embryology of *Eugenia jambos* L. *Current Science*. 22, 249-250.
- RYE, B. L. 1979. Chromosome number variation in the Myrtaceae and its taxonomic implications. *Australian Journal of Botany*. 27, 547–73. <https://doi.org/10.1071/BT9790547>
- SABINE, J. 1821. *Psidium cattleianum*. *Trans. Hort. Soc. London*. 4, 315–317.
- SÁNCHEZ-VINDAS, P. E. 1990. *Myrtaceae*. Instituto de Ecología, AC, Xalapa.
- SCALON, S. P. Q., E. M. S. NEVES, T. E. MASETO & Z. V. PEREIRA. 2012. Sensibilidade à dessecação e ao armazenamento em sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. (uvaia). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 34, 269-276. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100036>
- SCHMID, R. 1980. Comparative anatomy and morphology of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*, and the subfamilial and tribal classification of Myrtaceae. *Taxon*. 29, 559-595. <https://doi.org/10.2307/1220329>
- SCHMID, R. 1986. On Cornerian and other terminology of angiospermous and gymnospermous seed coats: historical perspective and terminological recommendations. *Taxon*. 35, 476-491. <https://doi.org/10.2307/1221901>
- SHIVANNA, K. R. & B. M. JOHRI. 1985. *The angiosperm pollen: structure and function*. Wiley Eastern Limited, New Delhi.
- SHIVANNA, K. R. & N. S. RANGASWAMY. 1992. Tests for pollen viability. In: SHIVANNA, K. R. & N. S. RANGASWAMY (eds.). *Pollen biology*, pp. 33-37. Springer-Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77306-8>
- SINGHAL, V. K., B. S. GILL & S. S. BIR. 1985. Cytology of woody species. *Proc. Indian Acad. Sci., Plant Sci.* 94, 607–618. <https://doi.org/10.1007/BF03053228>
- SOARES, I., A. C. NOGUEIRA, J. GRABIAS & Y. S. KUNIYOSHI. 2017. Caracterização Morfológica de Fruto, Semente e Plântula de *Psidium rufum* DC.

- (Myrtaceae). *Iheringia - Serie Botanica*. 72, 221–27. <https://doi.org/10.21826/2446-8231201772208>
- SOARES-SILVA, L. H. & C. E. B. PROENÇA. 2008. A new species of *Psidium* L.(Myrtaceae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158, 51-54. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00727.x>
- SOBRAL, M. 2003. *A família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul*. Ed. UNISINOS, São Leopoldo.
- SOUZA-PÉREZ, M. & G. SPERONI. 2017. New apomictic pathway in Myrtaceae inferred from *Psidium cattleyanum* female gametophyte ontogeny. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 234, 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.06.010>
- THORNHILL, A. H., S. Y. HO, C. KÜLHEIM & M. D. CRISP. 2015. Interpreting the modern distribution of Myrtaceae using a dated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 93, 29-43. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.07.007>
- TILTON, V. R. 1980. Hypostase development in *Ornithogalum caudatum* (Liliaceae) and notes on other types of modifications in the chalaza of angiosperm ovules. *Canadian Journal of Botany*. 58, 2059-2066. <https://doi.org/10.1139/b80-238>
- TOBE, H. & P. H. RAVEN. 1983. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 70, 71–94. <https://doi.org/10.2307/2399008>
- VAN WYK, A.E. & R. BOTHA. 1984. The genus *Eugenia* (Myrtaceae) in Southern Africa: ontogeny and taxonomic value of the seed. *South African Journal of Botany*. 3, 63–80. [https://doi.org/10.1016/s0022-4618\(16\)30083-3](https://doi.org/10.1016/s0022-4618(16)30083-3)
- VASCONCELOS, T. N. C., G. PRENNER & E. J. LUCAS. 2019. A Systematic overview of the floral diversity in Myrteae (Myrtaceae). *Systematic Botany*. 44, 570–91. <https://doi.org/10.1600/036364419x15620113920617>
- VÁZQUEZ, S. 2014. *Psidium cattleyanum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromosómica y cariotípica en poblaciones silvestres y genotipos seleccionados en programas nacionales de mejoramiento. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía Universidad de la República, Uruguay.

- VIJAYARAGHVAN, M. R. & K. PRABHAKAR. 1984. The endosperm. In: JOHRI, B. M. (ed.), *Embryology of angiosperms*, pp. 319-376. Springer-Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_7
- VOGEL, E. D. 1980. *Seedlings of dicotyledons: structure, development, types. Descriptions of 150 woody Malesian taxa*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen
- VON TAICHMAN, I. & A. VAN WYK. 1991. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 105, 211-37. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1991.tb00205.x>
- WILSON, P. G. 2010. Myrtaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.). *Flowering plants. Eudicots, the families and genera of vascular plants*, vol. 10: 212-271. Springer-Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14397-7_14

3. APOMIXIS FACULTATIVA PSEUDÓGAMA EN *PSIDIUM CATTLEYANUM* SABINE (MYRTACEAE): DIVERSIDAD DE ORÍGENES DEL EMBRIÓN Y EL ENDOSPERMO DETERMINADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN SEMILLAS

Claudia Da Luz-Graña^{1,2,3*}, Alejandra Borges², Magdalena Vaio³, Joerg Fuchs⁴ y Gabriela Speroni⁵

¹Laboratorio de Botánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Isidoro de María 1614, Montevideo, Uruguay.

<https://orcid.org/0000-0002-5233-8252>.

²Departamento de Biometría, Estadística y Computación, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay.

³Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 809, Montevideo, Uruguay.

⁴Department of Breeding Research, The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research. Corrensstraße 3, Gatersleben, Alemania.

⁵Laboratorio de Botánica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Av. Garzón 780, Montevideo, Uruguay.

*cdaluz@fagro.edu.uy

3.1. RESUMEN

Introducción y objetivos: La apomixis es una forma de reproducción asexual a través de la formación de semillas y en general, casi todas las especies apomícticas gametofíticas son poliploides. *Psidium cattleianum*, especie poliploide con variación en los niveles de ploidía, registra apomixis y requiere de polen para la fructificación. Se plantea: determinar si *Psidium cattleianum* es apomíctica facultativa, en qué porcentajes se presenta la apomixis y la sexualidad, comparar si hay diferencias entre plantas de distintas ploidías y analizar la contribución materna-paterna a la formación del endospermo.

M&M: Se utilizó la citometría de flujo en semillas maduras (FCSS), obtenidas de cruzamientos dirigidos entre dos accesiones de *Psidium cattleianum* octoploides y

dos heptaploides, para determinar los contenidos relativos de ADN de embrión: endospermo.

Resultados: Las 492 semillas analizadas se distribuyeron en relaciones: 2:5 (64,2%; apomixis), 2:3 (4,7%; sexualidad entre gametofitos reducidos), 1:3 (0,4%; partenogénesis haploide), 2:6 (2,5%; apomixis) y 2:7 (0,2%; apomixis), y 3:5 (8,7%; sexualidad). Además, 95 semillas (19,3%) presentaron las relaciones 2:3:5 y 2:4:6, relacionado con sacos embrionarios apomícticos no reducidos con tres núcleos polares en la célula media y la formación y coexistencia en el endospermo de núcleos con dos niveles de ploidía.

Conclusiones: *Psidium cattleianum* es apomíctica facultativa pseudógama, presenta diplosoria pseudógama (85,9%), sexualidad (13,7%) y partenogénesis polihaploide (0,4%). Se observaron diferencias entre madres de diferentes ploidías, donde plantas madre 8x formaron semillas sexuales en un 24 % y madres 7x solo en un 3 %. La contribución materna:paterna al endospermo fue variable.

Palabras clave

diplosoria, pseudogamia, sexualidad, partenogénesis haploide, polihaploide, poliploidía

3.2. SUMMARY

Background and aims: Apomixis is a form of asexual reproduction, and almost all gametophytic apomict species are also polyploids. *Psidium cattleianum*, a polyploid species with variation in ploidy levels, registers apomixis and the need for pollen for producing fruits. The aims of the article were to determine the presence of facultative apomixis in *Psidium cattleianum* and the percentages in which apomixis and sexuality occur, to compare the differences between plants of different ploidy levels and to analyze the maternal-paternal contribution to the formation of the endosperm.

M&M: Flow cytometry on mature seeds (FCSS), obtained from directed crosses between two octoploid and two heptaploid *Psidium cattleianum* accessions, was used to determine the relative embryo:endosperm DNA contents.

Results: The 492 seeds analyzed were distributed in different embryo:endosperm ratios: 2:5 (64%; apomixis), 2:3 (5%; sexuality with reduced gametophytes), 1:3

(0.4%; haploid parthenogenesis), 2:6 (2.4%; apomixis) and 2:7 (0.2%; apomixis), and 3:5 (8.7%; sexuality). In addition, 95 seeds (19.3%) presented the ratios 2:3:5 and 2:4:6, related to non-reduced apomictic embryo sacs with three polar nuclei in the middle cell and the formation and coexistence in the endosperm of nuclei with two ploidy levels.

Conclusions: *Psidium cattleianum* is a pseudogamous facultative apomictic, presents pseudogamous diplosporia (85.9%), sexuality (13.7%) and polyhaploid parthenogenesis (0.4%). Differences were observed between mothers with different ploidy levels, where 8x mother plants formed sexual seeds in 24 % and 7x mothers only in 3 %. The maternal:paternal contribution to the endosperm was variable.

Key words

diplospory, pseudogamy, sexuality, haploid parthenogenesis, polihaploid, polyploidy

3.3. INTRODUCCIÓN

La poliploidía se define como la presencia de más de dos juegos de cromosomas en un núcleo y es reconocido como uno de los procesos evolutivos más importantes en angiospermas (Ramsey & Schemske, 1998) con más del 70% de las especies reconocidas como de origen poliploide (Jiao *et al.*, 2011). La formación de poliploides puede ocurrir de diferentes maneras, en general se da por errores en la meiosis que genera gametofitos no reducidos, que producen gametos masculinos y/o oóferas con el número cromosómico de la especie (Bretagnolle & Thompson, 1995). La unión de estos gametos no reducidos genera progenie poliploide y es considerada por esto una de las formas principales de obtener poliploides (Bretagnolle & Thompson, 1995; Ramsey & Schemske, 1998). Varios autores han señalado la estrecha relación entre la poliploidía y el sistema reproductivo de tipo apomíctico gametofítico (revisado en Hojsgaard & Hörandl, 2019). La apomixis es una forma de reproducción asexual a través de la formación de semillas (Asker & Jerling, 1992). En general, casi todas las especies apomícticas son poliploides (Nogler, 1984). Está reportado que, en poblaciones mixtas de especies que presentan diversos niveles de ploidía, los citotipos impares tienen problemas para la reproducción sexual y están más relacionados a la reproducción asexual (Kolář *et al.*, 2017).

La apomixis puede ser gametofítica o esporofítica de acuerdo a si hay o no formación de saco embrionario respectivamente y, en la primera vía mencionada, se reconocen los tipos apospórico o diplospórico dependiendo del origen de las células involucradas en la formación del gametofito femenino (Nogler, 1984; Asker & Jerling, 1992). La meiosis falla o es eliminada en las plantas apomícticas lo que representa una ventaja en el caso de las especies poliploides, muchas de las cuales presentan apareamiento irregular de los cromosomas durante la meiosis y disminución de la fertilidad (Barke *et al.*, 2020). Además de esto, en la apomixis gametofítica se generan de manera regular gametofitos femeninos con oósfemas no reducidas, donde el desarrollo partenogénico compite con la fecundación (Dickinson *et al.*, 2007), generando ploidías mayores que sus parentales.

Sin embargo, la fecundación de la célula media en la mayoría de las plantas apomícticas es todavía necesaria para el desarrollo del endospermo (revisado en Hojsgaard & Hörandl, 2019). La pseudogamia no sólo implica la fecundación de la célula media para la formación del endospermo, sino que actúa como un disparador para que se desarrolle el embrión por partenogénesis (Asker & Jerling, 1992). En la apomixis gametofítica la partenogénesis excluye uno de los procesos de la doble fecundación, la fusión de un gameto masculino con la oósfera; sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de la célula media (Nogler, 1984). En especies sexuales existe un balance en la contribución materna: paterna 2:1 para la formación del endospermo y, en los casos donde esta contribución se vea alterada, el embrión no se desarrolla (Johnston *et al.*, 1980; Nogler, 1984). Sin embargo, en especies apomícticas los balances en la contribución materna: paterna en el endospermo pueden ser diferentes (Quarin, 1999).

El género *Psidium* pertenece a la familia Myrtaceae, tribu Myrteae, subtribu Pimentinae, cuyas especies se distribuyen en las regiones neotropicales del planeta. El género cuenta con cerca de 100 especies entre las cuales se destaca *Psidium guajava* L. por su alto valor económico como frutal, pero también incluye otras tantas especies con un alto potencial para el uso de madera, ornamentales y también frutales como *Psidium cattleianum* Sabine (Franzon *et al.*, 2009). *P. cattleianum* se distribuye desde el noreste de Brasil hasta el este de Uruguay (Legrand, 1968;

Legrand & Klein, 1977; Brussa & Grela, 2007; Speroni *et al.*, 2012; Sobral *et al.*, 2015). La especie además ha sido introducida en diversas regiones del mundo (Huenneke & Vitousek, 1990; Ellshoff *et al.*, 1995; Koske & Gemma, 2006) donde se ha transformado en una especie invasora (Huenneke & Vitousek, 1990; Koske & Gemma, 2006). Es conocida por su valor ornamental y por el agradable sabor de sus frutos; sin embargo, no se ha desarrollado aún todo su potencial como cultivo frutal (Vignale & Bisio, 2005). Taxonómicamente se reconocen dos formas principalmente diferenciadas por el color de sus frutos: *P. cattleyanum* f. *cattleyanum* que produce frutos rojos y *P. cattleyanum* f. *lucidum* que produce frutos amarillos (Degener, 1939). La especie es poliploide con un número cromosómico básico igual a 11, no se conocen materiales diploides y los niveles de ploidía en poblaciones naturales van desde tetraploides hasta octoploides (Atchinson, 1947; Singhal *et al.*, 1985; Raseira & Raseira, 1996; Costa & Forni-Martins, 2006; Vázquez, 2014; Machado *et al.*, 2020; Machado & Forni-Martins, 2022). El estudio en tres poblaciones silvestres de Brasil determinó que la especie cuenta en dos de ellas con un solo nivel de ploidía y en un caso con una proporción baja (7 %) de un segundo nivel de ploidía (Machado *et al.*, 2020); además, la mayoría de estas poblaciones están formadas solamente con individuos de la forma *lucidum* y solo en algunas coexisten ambas formas (Costa & Forni-Martins, 2006; Machado & Forni-Martins, 2022). El origen de los distintos citotipos en la especie no se conoce y se han sugerido tanto un origen alopoliploide como autopoliploide basado fundamentalmente en características y estudios citogenéticos (Costa, 2009; Vázquez, 2014; Machado & Forni-Martins, 2022). *Psidium cattleyanum* se propaga fácilmente por semilla y presenta una elevada tasa de germinación (Franzon *et al.*, 2009). Estudios realizados en progenies tanto de Brasil como Uruguay mostraron una alta uniformidad morfológica entre ellos y con respecto a la planta madre (Raseira & Raseira, 1996; Vignale & Bisio 2005). La misma uniformidad también fue observada en análisis isoenzimáticos (Ellshoff *et al.*, 1995). Estas evidencias, unidas a los altos niveles de ploidía y baja viabilidad de polen (Raseira & Raseira, 1996), sugerían un sistema de reproducción apomíctico (Franzon *et al.*, 2009). La apomixis ya fue observada en otras especies de la familia, en los casos estudiados se encontraron evidencias de apomixis de tipo apospórico,

embrionía adventicia y poliembrionía (Johnson, 1936; Gurgel & Soubihe Sobrinho, 1951; Nic Lughadha & Proença, 1996). Sin embargo, estudios recientes de la ontogenia del óvulo en algunos materiales de *P. cattleyanum* no mostraron sacos embrionarios apospóricos ni embriones adventicios en individuos heptaploides y octoploides (Souza-Pérez & Speroni, 2017). Basados en esas observaciones y en la falta de evidencia de la ocurrencia de división meiótica en la megáspora se infirió un origen diplospórico del saco embrionario. En ese mismo trabajo también se observó que la fructificación ocurre sólo con la llegada de polen viable al estigma, sin importar su origen, sugiriendo, como en la mayoría de las especies apomícticas, la presencia de pseudogamia. Una particularidad observada por las autoras de este trabajo es la presencia de tres núcleos polares en las células medias de varios sacos embrionarios (Souza-Pérez & Speroni, 2017) lo que podría tener consecuencias en el nivel de ploidía del mismo y el balance embrión:endospermo.

Además del sistema apomíctico también se han encontrado ciertas evidencias de sexualidad en *Psidium cattleyanum*. Recientemente, el estudio con marcadores SSR de tres poblaciones silvestres de Brasil determinó diferentes grados de variabilidad genética en las poblaciones relacionado con los diferentes niveles de ploidía presentes en las mismas y explicando estos hallazgos como presencia de apomixis y sexualidad (Machado *et al.*, 2022). Es conocido que en la apomixis facultativa se da cierto grado de sexualidad (Bicknell & Koltunow, 2004) y ambas vías pueden convivir inclusive en la misma planta (Nogler, 1984).

La citometría de flujo aplicada a semillas (*flow cytometric seed screen*, FCSS) permite determinar los distintos contenidos de ADN o niveles de ploidía presentes en la semilla y, la relación o balance que existe entre los mismos indica el origen reproductivo de la misma (Matzk *et al.*, 2000). Una semilla cuyo embrión se originó por vía sexual presenta una relación de contenido de ADN entre embrión y endospermo de 2:3, debido a la condición 2C (1C+1C) del embrión y 3C (1C+1C+1C) del endospermo. En el caso de semillas apomícticas el embrión continúa siendo 2C (2C+0) pero, la célula media que formará el endospermo es 4C (2C+2C+0) por la falta de reducción meiótica y por lo tanto, la relación embrión:endospermo es 2:4. Si es necesaria la fecundación de la célula media para la

formación del endospermo (pseudogamia) éste será 5C (2C+2C+1C) y la relación embrión:endospermo será 2:5 (Matzk *et al.*, 2000). Esta técnica ha sido utilizada con éxito en varias especies como *Hipericum perforatum* (Matzk *et al.*, 2001) y *Cotoneaster integerrimus* (Macková *et al.*, 2020); y géneros como *Crataegus*, *Mespilus* (Talent & Dickinson, 2007) y *Boechera* (Aliyu *et al.*, 2010) permitiendo determinar los modos reproductivos de cada uno.

Los objetivos de este trabajo fueron 1) Determinar si *Psidium cattleyanum* es una especie apomíctica facultativa 2) Establecer en qué porcentajes se presenta la apomixis y la sexualidad 3) Comparar si hay diferencias en los modos reproductivos de plantas con ploidía par (8x) y plantas de ploidía impar (7x) y 4) Analizar la contribución materna-paterna a la formación del endospermo.

Para ello se utilizó la técnica de citometría de flujo en semillas maduras obtenidas en polinizaciones manuales. Para realizar los tratamientos de polinización se utilizaron accesiones seleccionadas, dos octoploides ($2n=8x=88$) de la forma *lucidum* (frutos amarillos) y dos heptaploides ($2n=7x=77$) de la forma *cattleyanum* (frutos rojos). A partir de los balances del contenido de ADN embrión:endospermo obtenidos, se interpretó el origen reproductivo de ambas estructuras.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Material vegetal

Para la obtención de las semillas de *Psidium cattleyanum* se realizaron polinizaciones manuales entre dos accesiones octoploides ($2n=8x=88$) de frutos amarillos (III5 y IV6) y dos accesiones heptaploides ($2n=7x=77$) de frutos rojos (IV1 y IV7). Los niveles de ploidía y el número de cromosomas de estas accesiones fueron previamente determinados (Vázquez, 2014). Las cuatro plantas han sido seleccionados por sus buenas condiciones de sabor y fructificación en el Programa de Selección de Frutales Nativos (Facultad de Agronomía – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Uruguay) y se mantienen en cultivo bajo evaluación agronómica en Uruguay, Dpto. Salto, Estación Experimental de Facultad de Agronomía Salto (EEFAS) (31°19'S, 57°41'W). Los vouchers de las plantas IV7

(Speroni 1041) y IV1 (Speroni 1042) de *Psidium cattleianum* f. *cattleianum* y de las plantas III5 (Speroni 1037) y IV6 (Speroni 1040) de *Psidium cattleianum* f. *lucidum* fueron ingresadas al Herbario Bernardo Rosengurtt (MVFA), Facultad de Agronomía, Universidad de la República de Uruguay. La viabilidad de polen de cada planta fue evaluada previamente mediante test colorimétrico con cloruro 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC) (Shivanna & Rangaswamy, 1992). La planta IV7 no se utilizó como dadora de polen porque no presentó polen viable en el año de estudio.

3.4.2. Polinizaciones manuales

En los tratamientos se realizaron polinizaciones manuales entre los individuos de las cuatro accesiones de *Psidium cattleianum*. Flores elegidas al azar en cada árbol fueron emasculadas una hora antes de la antesis, cuando las anteras están aún indehiscentes y el estigma fue aislado para prevenir la llegada de polen foráneo. Cuatro horas después se polinizaron manualmente con polen de otra planta de la misma o diferente ploidía (polinizaciones cruzadas) (Tabla 1). Para los tratamientos de autopolinización se utilizó polen de la propia flor sin emascular y embolsadas previo a la antesis para prevenir la contaminación (Tabla 1). Los frutos fueron seguidos hasta la madurez para la extracción de las semillas.

Tabla 1. Tratamientos de polinizaciones manuales en accesiones IV1, IV7 heptaploides (7x) y III5, IV6 octoploides (8x) de *Psidium cattleianum*.

Receptor de polen	Dador de polen		
	III 5 (8x)	IV 6 (8x)	IV 1 (7x)
III 5 (8x)	Autogamia 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 7x
IV 6 (8x)	Polinización cruzada 8x × 8x	Autogamia 8x × 8x	Polinización cruzada 8x × 7x
IV 1 (7x)	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 8x	Autogamia 7x × 7x
IV 7 (7x)	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 8x	Polinización cruzada 7x × 7x

3.4.3. Citometría de Flujo

Para determinar el modo de reproducción de *Psidium cattleianum* se utilizó el método de análisis de citometría de flujo en semillas (FCSS) propuesto por Matzk *et al.* (2000) con modificaciones que se detallan a continuación. La variación del procedimiento incluyó el análisis individual de cada semilla y el retiro mecánico de la testa. El aislamiento de los núcleos se realizó mediante el procedimiento y el buffer descrito en Galbraith *et al.* (1983), luego fueron filtrados en malla de 30 µm y teñidos con 50µL del fluorocromo ioduro de propidio (1mg/mL). Se utilizó un citómetro de flujo Partec CyFlow[®] Space (Partec GmbH, Münster, Alemania) y las diferentes poblaciones celulares se analizaron mediante el programa FloMax[®] (Versión 2.4d; Partec GmbH, Münster, Alemania). De esta forma, por cada semilla analizada se midió el contenido de ADN relativo de los núcleos de los diferentes tejidos de las semillas, que aparecen como diferentes picos en un histograma. La relación entre los picos correspondientes al embrión y el endospermo permiten interpretar la vía reproductiva de formación de la semilla. Para determinar con mayor precisión la relación entre los diferentes picos y variaciones en la ploidía del embrión, en todas las mediciones se estableció la posición del embrión (valor 2C) modificando la ganancia del parámetro FL1 del equipo de forma que esta población

se ubicara en el canal 50 de fluorescencia. Se verificó la población correspondiente a núcleos del embrión mediante determinación del contenido de ADN en hojas, utilizando como patrón interno a *Solanum lycopersicum* L. Para aquellas semillas en las cuales el pico correspondiente a los núcleos del endospermo se ubicó en el canal de fluorescencia 75 se consideró una relación 2:3, correspondiente a la fecundación de la oósfera por un núcleo espermático (1C+1C) y un endospermo correspondiente a la fecundación de dos núcleos polares por un núcleo espermático (1C+1C+1C). Para las semillas donde el pico del endospermo se ubicó en el canal de fluorescencia 125 se consideró una relación 2:5 (2C+0:2C+2C+1C). Para ambas relaciones, 2:3 y 2:5, la ploidía del embrión y el endospermo estará determinada por la presencia de gametos femeninos y masculinos reducidos y no reducidos. Por lo tanto, se pueden observar otras relaciones que indiquen distintos niveles de ploidía en embrión y endospermo, dependiendo de la condición reducida o no del saco embrionario y de los gametos masculinos que participan en la fecundación, (Matzk *et al.*, 2000).

3.4.4. Análisis Estadístico

La proporción de semillas apomícticas y sexuales obtenidas en cada tratamiento de polinización se analizó con un modelo lineal generalizado, asumiendo distribución binomial. Además, se realizaron contrastes ortogonales para comparar medias por grupo de plantas con diferentes niveles de ploidía (según la ploidía par vs impar) y de plantas dadoras de polen.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Balances embrión:endospermo

La técnica de citometría de flujo en semillas reveló una mayor diversidad de la esperada en las vías de formación del embrión y endospermo en *Psidium cattleyanum*. Se analizaron 492 semillas de las cuales 316 (64.2 %) presentaron una relación 2:5 correspondiente a una vía de formación apomíctica con fecundación de la célula media de un saco embrionario no reducido (pseudogamia) con un gameto masculino reducido. Solamente 23 semillas (4.7 %) mostraron una relación 2:3

correspondiente a eventos de sexualidad entre gametofitos reducidos. El resto de las semillas se distribuyeron en otras relaciones de contenidos de ADN de tipo 1:3, 2:6, 2:7 y 3:5 (Tabla 2) que representan eventos de partenogénesis haploide (1:3), apomixis (2:6 y 2:7) y sexualidad (3:5), con combinaciones diferentes entre un saco embrionario (reducido o no reducido), fecundado por uno o dos gametos masculinos (reducidos o no reducidos) para formar el embrión y el endospermo de cada semilla (Fig. 1). Además de esto, en 95 semillas se observó la presencia de un tercer pico en el histograma mostrando las relaciones 2:3:5 y 2:4:6, lo que está relacionado con sacos embrionarios apomícticos no reducidos con tres núcleos polares en la célula media y la formación y coexistencia en el endospermo de núcleos con dos niveles de ploidía. En la Figura 2 se observan histogramas representativos de las principales relaciones observadas.

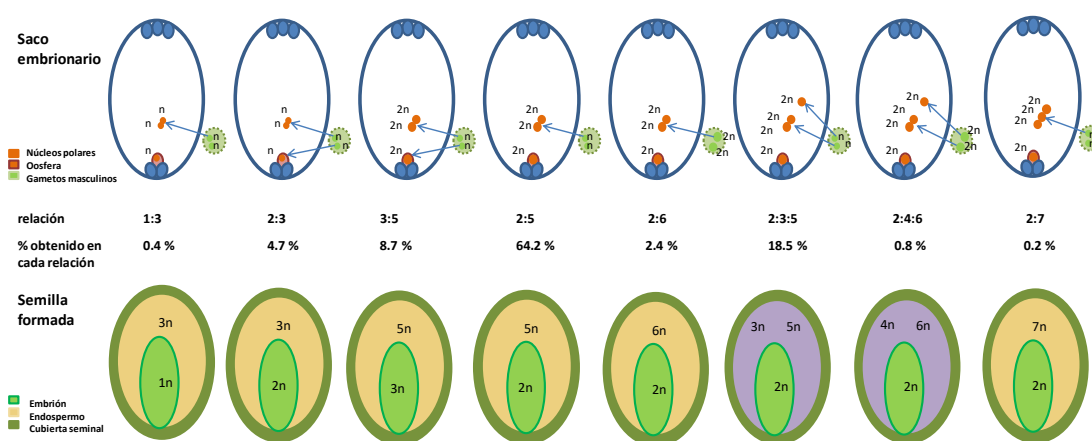


Fig. 1. Esquema representativo de las diferentes combinaciones de saco embrionario y gametos masculinos para formar la semilla.

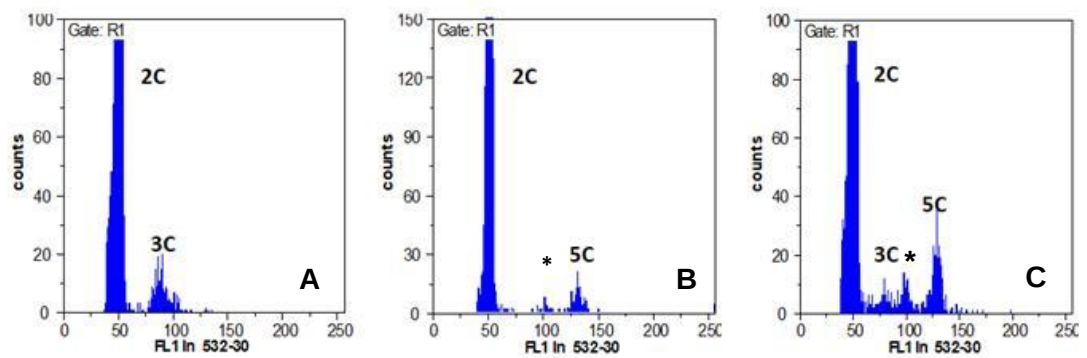


Fig. 2. Histogramas representativos de las relaciones entre los contenidos de ADN entre embrión y endospermo encontrados en la mayoría de las semillas de *Psidium cattleianum* y observados mediante la técnica de citometría de flujo en semillas (FCSS). Los picos corresponden a las relaciones: A 2:3, B 2:5 y C 2:3:5. En B y C se observa además un pico 4C (*) que pertenece a núcleos del embrión en fase G2.

Tabla 2. Porcentaje de semillas de *Psidium cattleianum* registradas en los diferentes balances de contenido de ADN embrión:endospermo para cada tratamiento de polinización manual. Se indica la relación entre embrión:endospermo (ó embrión:endospermo:endospermo para los casos donde en el endospermo coexisten núcleos con dos niveles de ploidía diferentes), el nivel de ploidía (7x u 8x) de las plantas utilizadas (III5: 8x, IV6: 8x, IV1: 7x, IV7: 7x) y el total de semillas por tratamiento.

		Relación de contenido de ADN embrión:endospermo							
Tratamiento	Nº semillas por tratamiento	1:3	2:3	2:3:5	2:4:6	2:5	2:6	2:7	3:5
Madres 8x									
III5×III5	40		5.0	17.5		57.5			20.0
III5×IV6	40		2.5	20.0		62.5		2.5	12.5
III5×IV1	41		9.8	22.0	2.4	51.2	4.8		9.8
IV6×IV6	42		2.4	16.7		50.0	2.4		28.5
IV6×III5	43	2.3	7.0	27.9		39.5	7.0		16.3
IV6×IV1	42		16.7	21.4	2.4	47.6			11.9
Madres 7x									
IV1×IV1	44		9.1	27.3		63.6			
IV1×III5	40			7.5	2.5	85.0	5.0		
IV1×IV6	40	2.5		20.0		75.0			2.5
IV7×III5	40			7.5	2.5	87.5			2.5
IV7×IV6	40		2.5	12.5		80.0	5.0		
IV7×IV1	40			20.0		75.0	5.0		
Total semillas analizadas	492								
	% por relación	0.4	4.7	18.5	0.8	64.2	2.4	0.2	8.8

3.5.2. Niveles de ploidía de gametofitos, embrión y endospermo

El nivel de ploidía del embrión en la mayoría de los casos (91 %), fue igual al de la madre (7x y 8x). Sin embargo, se identificaron también contenidos de ADN para el embrión correspondientes a 4x, 11x y 12x (Tabla 3). La contribución materna:paterna (m:p) a la formación del endospermo fue variada, además del 2m:1p esperado también se registraron 4m:2p y 4m:1p. La contribución 2m:1p se presentó solamente en un 5,1 % de los casos, 4m:2p fue de apenas 2,4 % y la mayor fue la relación 4m:1p en un 73 % de los casos. Además, el balance entre las ploidías de embrión y endospermo presentó una gran variabilidad debido a la intervención de diferentes combinaciones de ploidías de las plantas involucradas y gametos reducidos y no reducidos (Tabla 3). Los resultados obtenidos de contenido de ADN de embrión y endospermo muestran que la mayoría de las plantas madres (94.9 %) producen sacos embrionarios no reducidos, mientras que la mayoría de los granos de polen involucrados (97 %) son reducidos, inclusive aquellos generados por la planta 7x los cuales poseen un contenido de ADN relativo equivalente a 4x (Tabla 3).

Tabla 3. Detalle de los balances de ploidía embrión:endospermo (ó embrión:endospermo:endospermo para los casos donde en el endospermo coexisten núcleos con dos niveles de ploidía distintos), en semillas de *Psidium cattleyanum* obtenidas de tratamientos de polinización manual entre plantas heptaploides y octoploides. Entre paréntesis se desglosa la ploidía de cada estructura, considerando la ploidía de los gametos ($g^{\varnothing}$ y g^{σ}) y núcleos polares (np) involucrados en darles origen, según la fórmula: $g^{\varnothing}+(g^{\sigma}):(\text{np}+g^{\sigma}):\text{np}+\text{np}+g^{\sigma}$ donde (g^{σ}) y ($\text{np}+g^{\sigma}$) pueden faltar.

Balance de ploidía embrión:endospermo (origen de cada uno)									
Ploidía cruzamiento		1:3	2:3	2:3:5	2:4:6	2:5	2:6	2:7	3:5
	8x x 8x	4:12 (4:4+4+4)	8:12 (4+4:4+4+4)	8:12:20 (8:8+4:8+8+4)		8:20 (8:8+8+4)	8:24 (8:8+8+8)	8:28 (8:8+8+8+4)	12:20 (8+4:8+8+4)
	8x x 7x		8:12 (4+4:4+4+4)	8:12:20 (8:8+4:8+8+4)	8:15:23 (8:8+7:8+8+7)	8:20 (8:8+8+4)	8:23 (8:8+8+7)		12:20 (8+4:8+8+4)
	7x x 7x		8:12 (4+4:4+4+4)	7:11:18 (7:7+4:7+7+4)		7:18 (7:7+7+4)	7:21 (7:7+7+7)		
	7x x 8x	4:12 (4:4+4+4)	8:12 (4+4:4+4+4)	7:11:18 (7:7+4:7+7+4)	7:15:22 (7:7+8:7+7+8)	7:18 (7:7+7+4)	7:22 (7:7+7+8)		11:18 (7+4:7+7+4)

3.5.3. Apomixis vs sexualidad

Para analizar si hay variaciones estadísticamente significativas entre eventos de apomixis y sexualidad en los tratamientos realizados, los balances de contenido de ADN encontrados se agruparon según el origen sexual o apomítico pseudógamo. En la distribución de frecuencias (Figura 2 A) se observó un rango que va desde ausencia de eventos de sexualidad en los tratamientos IV1×III5 (7x×8x) y IV7×IV1 (7x×7x) hasta un máximo de 31 % de sexualidad en el tratamiento IV6×IV6 (8x×8x). Sin embargo, el análisis estadístico realizado mostró que no hay diferencias

significativas entre las proporciones de origen apomítico o sexual de las semillas analizadas de cada tratamiento ($p=0.05$).

Para analizar si las proporciones de semillas de origen sexual o apomítico pseudógamo están condicionadas por la ploidía de la planta madre se agruparon considerando la ploidía impar ($7x$) o ploidía par ($8x$) de la planta madre. Se observó que de 248 semillas analizadas para plantas madres $8x$ un 24 % se formaron por vía sexual, mientras que para 244 semillas analizadas para plantas madres impares $7x$ solo un 3 % se originó por vía sexual (Figura 2b). El análisis estadístico mostró que la distribución de frecuencias por tipo de semilla de cada grupo de plantas madre ($7x$ vs $8x$ o impar vs par) presentó diferencias significativas ($p=0.0158$).

En la comparación de grupos según la planta dadora de polen (III5, IV6 y IV1) se observó que la distribución de frecuencias de semillas de origen sexual en cada uno es un poco mayor de 10 % (Figura 2c), sin diferencias significativas entre ellos ($p=0.05$).

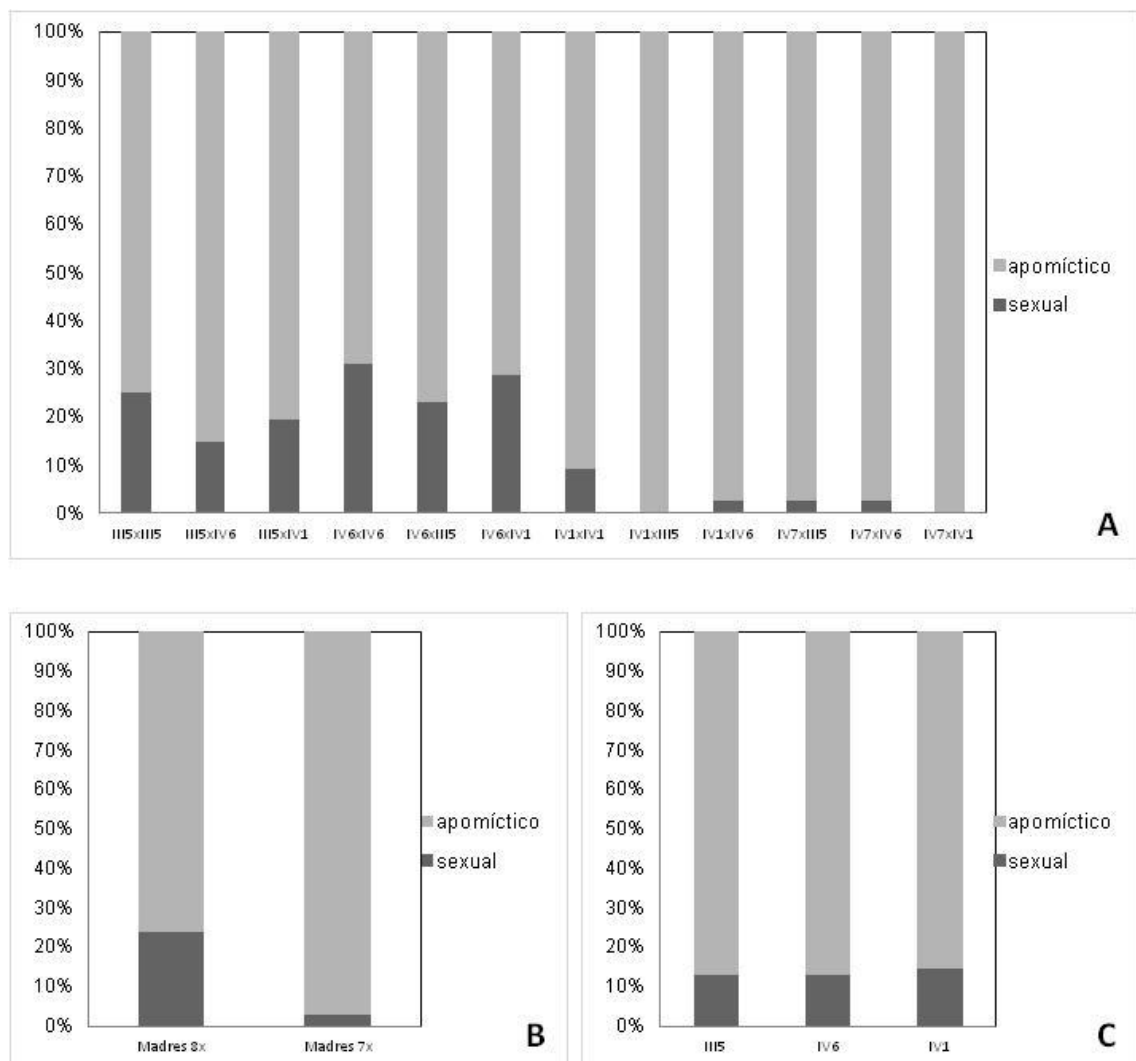


Figura 2. Distribución de frecuencias de semillas de origen sexual o apomítico en polinizaciones manuales en *Psidium cattleianum* teniendo en cuenta: A. tipo de cruzamiento, B. nivel de ploidía de la planta madre (8x/7x), C. planta dadora de polen. III5 y IV6 plantas octoploides (frutos amarillos); IV1 y IV7 plantas heptaploides (frutos rojos).

3.6. DISCUSIÓN

El análisis individual de las semillas de *Psidium cattleianum*, obtenidas de cruzamientos dirigidos por la técnica de citometría de flujo, permitió determinar el balance embrión-endospermo, interpretar el origen de cada una de estas estructuras e inferir la vía reproductiva por la que se formó cada semilla. Los resultados obtenidos

en este estudio nos permitieron determinar que el modo reproductivo de *Psidium cattleyanum* es principalmente pseudógamo facultativo con un balance embrión: endospermo 2:5, pero que presenta además una variedad de otras posibilidades de combinación de las células reproductivas del saco embrionario y los gametos masculinos. La apomixis se presentó en un 86,2 % de las semillas analizadas, mientras que la sexualidad se encontró en un 13,4 % y la partenogénesis haploide en un 0,4 %. Si tomamos en cuenta a las plantas madres podemos decir que, se encontraron diferencias significativas ($p=0.0158$), las madres de ploidía par (8x) presentaron eventos sexuales en un 23,8 % de sus semillas; o sea, ocho veces más que en las plantas madres de ploidía impar (heptaploides rojas).

3.6.1. *Psidium cattleyanum* presenta apomixis facultativa

El balance en el nivel de ploidía entre embrión y endospermo de 2:5 se presentó en un 64 % de las semillas analizadas, esta relación se corresponde a semillas de origen apomíctico pseudógamo (Matzk *et al.*, 2000). El origen apomíctico de las semillas implica que los embriones son clones de la planta madre; por tanto, estos resultados explican la uniformidad morfológica y molecular encontrada previamente en estudios de descendencia obtenida por semillas (Ellshoff *et al.*, 1995; Vignale & Bisio, 2005). En particular el tipo de apomixis gametofítica puede deberse a diplosporia ó aposporia; sin embargo, estudios anatómicos a nivel del óvulo en estos mismos materiales determinaron la ausencia de sacos embrionarios apospóricos y la casi nula frecuencia de división meiótica de la célula madre de la megáspora, por lo que se descartó la apomixis gametofítica apospórica y se postuló la vía diplospórica en estos materiales (Souza-Pérez & Speroni, 2017). Para la familia Myrtaceae ya han sido descritos sistemas reproductivos apomícticos pero de tipo poliembrionía adventicia (Johnson, 1936; Gurgel & Soubihe Sobrinho, 1951; Nic Lughadha & Proença, 1996). Los reportes de poliembrionía se refieren a varias especies de los géneros *Syzygium* (4x) y *Plinia* (2x) (Gurgel & Soubihe Sobrinho, 1951), y en *Eugenia hookeri* (actualmente *Luma apiculata*) (Johnson, 1936). Con los resultados obtenidos en este trabajo se confirma la vía diplospórica postulada por Souza-Pérez y Speroni (2017)

en la familia y la necesidad de polen para el desarrollo del endospermo (pseudogamia) en la especie estudiada.

A pesar de que la gran mayoría de las semillas son de origen apomítico, los eventos de sexualidad se detectaron tanto en madres de ploidía par (24 %) como de ploidía impar (3 %). Esto está de acuerdo con que en la mayoría de los mecanismos de apomixis estudiados se reporta un cierto grado de sexualidad (Bicknell & Koltunow, 2004). Las diferentes vías de formación de la semilla encontradas indican por lo tanto que *Psidium cattleianum* es una apomítica facultativa, ya que conviven la apomixis y la sexualidad en el mismo individuo (Asker & Jerling, 1992).

Además de producir semillas de origen apomítico (2C+0) y sexual (1C+1C), las especies apomíticas facultativas pueden producir semillas por otras vías intermedias a éstas (Bicknell *et al.*, 2003) como el origen híbrido (2C+C) y la partenogénesis haploide (1C+0) (Matzk *et al.*, 2001; Krahulcová *et al.*, 2004; Sharma & Bhat en Tandon *et al.*, 2020), vías que se encontraron en las semillas de *P. cattleianum*. En total se registraron siete y ocho balances diferentes entre embrión y endospermo, en *Psidium cattleianum*, para heptaploides y octoploides, respectivamente, lo que demuestra una gran plasticidad de la especie. Aunque ésta es inusual, existen registros en otras especies como *Hypericum perforatum* (Matzk *et al.*, 2001) e *Hieracium rubrum* (Krahulcová *et al.*, 2004) donde los distintos niveles de ploidía presentan alta plasticidad. La presencia de distintos orígenes de la semilla y niveles de ploidía, puede contribuir a explicar la diversidad observada dentro o entre las poblaciones o complejos agámicos (Ozias-Akins, 2006). Un estudio de diversidad genética con marcadores SSR en tres poblaciones silvestres de *P. cattleianum* en Brasil concluyó que la población en la que se encontraban mayoritariamente individuos de ploidía impar (7x) la diversidad genética era menor; mientras que, en la que la ploidía de los individuos era par (6x) la proporción de diversidad era mayor (Machado *et al.*, 2022). Estos autores explican los resultados obtenidos por la presencia de apomixis y sexualidad, lo que está de acuerdo con los porcentajes de semillas de origen apomítico y sexual para las madres de ploidía impar y par estudiadas por nosotros.

Si bien en especies apomícticas facultativas el modo reproductivo está regulado genéticamente, el porcentaje en el que se expresa cada uno está influenciado por el ambiente (Asker & Jerling, 1992). Tanto las fluctuaciones de temperatura como la disponibilidad de horas de luz pueden afectar el comportamiento reproductivo (Hjelmqvist & Grazi, 1964; y Brix, 1977 en Asker & Jerling, 1992) y se cree son los disparadores naturales de la expresión meiótica (Hojsgaard & Hörandl, 2019). En citotipos poliploides, apomícticos apospóricos, el óvulo es menos sensible al fotoperiodo prolongado y responde en menor medida a la formación de óvulos sexuales de manera que la poliploidía permitiría amortiguar mejor el estrés ambiental y desarrollarse apomícticamente (Ulum *et al.*, 2020). El sistema reproductivo del tipo apomíctico se ha relacionado en varias especies con la presencia de híbridos o la poliploidía (Sartor *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2014; Asker & Jerling, 1992). La relación de la poliploidía con la apomixis se basa en la observación que las poblaciones naturales de especies apomícticas son casi en su mayoría poliploides (Hojsgaard & Hörandl, 2019). La duplicación de los genes omitiría la megasporogénesis, resultando en supresión de la sexualidad y favoreciendo la expresión de la apomixis (Hojsgaard & Hörandl, 2019). El género *Psidium* cuenta con el 90 % de las especies y citotipos poliploides y los niveles de ploidía impar, si bien son más raros, se asociaron frecuentemente a individuos con alteraciones en la reproducción sexuada, resultado de irregularidades meióticas (Costa, 2009). En el caso de *P. cattleianum* los niveles de ploidía van desde tetraploides hasta octoploides (Atchinson, 1947; Costa & Forni-Martins, 2006). Los embriones de las semillas analizadas, formados por eventos apomícticos o por sexualidad, presentaron niveles de ploidía tetraploides, heptaploides, octoploides, undecaploides y dodecaploides. Siendo el undecaploide ($2n=11x=121$) un nuevo registro de este nivel de ploidía para la especie. En las especies apomícticas facultativas tanto la apomixis como la sexualidad pueden ocurrir en una misma planta (Nogler, 1984) y, por lo observado en nuestros resultados, inclusive pueden encontrarse semillas de ambos orígenes en un mismo fruto. Resultados similares fueron observados en las progenies de semillas provenientes de poblaciones naturales de Brasil en las cuales de un mismo fruto se

obtuvieron plantas con distintos niveles de ploidía, desde triploide hasta decaploide y dodecaploide (Machado & Forni-Martins, 2022).

En todos los casos, los embriones de *Psidium cattleianum* con carga cromosómica mayor que sus parentales se formaron por fecundación de la oósfera no reducida, esto está de acuerdo con lo registrado para poblaciones naturales de otras especies (Schinkel *et al.*, 2017; Macková *et al.*, 2020) donde es más común que se fecunde un gameto femenino no reducido con un gameto masculino reducido que al revés (Harlan & De Wet, 1975; Krahulcová *et al.*, 2004). La relación 3:5, que corresponde a este tipo de evento sexual (Matzk *et al.*, 2000), se presentó en casi un 9 % de las semillas analizadas. Esta proporción es alta comparada por ejemplo con cruzamientos realizados entre especies de *Hieracium* hexaploides (3.98 %) (Krahulcová *et al.*, 2004). Las variaciones en porcentajes pueden deberse a la aptitud de las madres para poder generar gametos no reducidos, así como ser pasibles de aceptar la fecundación. Además, es importante considerar la compatibilidad entre los progenitores (Krahulcová *et al.*, 2004). La generación de gametos no reducidos y la hibridación sexual ($2n+n$) representan la mayor ruta para la inducción de poliploides (Harlan & De Wet, 1975; Schinkel *et al.*, 2017). Estas hibridaciones explican la presencia de distintos citotipos (ploidías) en una misma población (Hajrudinovic' *et al.*, 2015). En *Psidium cattleianum* el análisis de los niveles de ploidía en los individuos de varias poblaciones silvestres de Brasil determinó que la mayoría de las poblaciones presentaban un único nivel de ploidía, y en otras predominaba uno y otro u otros se encontraban en menor proporción (Machado *et al.*, 2022), lo que estaría probablemente relacionado con un origen apomítico y sexual respectivamente. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los análisis realizados por esta autora, al igual que los nuestros, fueron realizados sobre semillas de frutos por lo que la proporción de los distintos niveles de ploidía presentes en poblaciones silvestres debería ser confirmada con el estudio de hojas de las plantas madres, tanto en poblaciones de Brasil como Uruguay. Un porcentaje de sexualidad en especies apomíticas, aunque sea residual, permite la formación de híbridos así como la génesis de nuevos biotipos (Lepší *et al.*, 2019), cobrando gran importancia en el mejoramiento ya que la presencia de plantas de origen sexual puede ser usada como fuente de variabilidad en

el mejoramiento genético de la especie además de permitir la creación de nuevos genotipos recombinantes en poblaciones naturales (Sartor *et al.*, 2011).

3.6.2. La meiosis ocurre en *Psidium cattleyanum*, aunque en baja proporción

En las semillas analizadas encontramos (0,4 %) tetrahaploides (4x) que se corresponden con una partenogénesis haploide y por lo tanto una relación de contenido de ADN embrión-endospermo 1:3 (Matzk *et al.*, 2000). En el proceso de formación de un polihaploide ocurre meiosis (hay recombinación) pero se elude la fecundación, el embrión se forma por partenogénesis y cuenta con la mitad de la carga cromosómica de la planta madre (Asker & Jerling, 1992), por lo que muchos autores lo consideran un proceso apomíctico (Maheshwari, 1950; Johri *et al.*, 2001). Tanto en poblaciones naturales como en cruzamientos dirigidos la partenogénesis para formar haploides ha sido observada en baja proporción y en general es poco exitosa (Asker & Jerling, 1992). Estas plantas son en general de lento crecimiento, más pequeñas de lo normal y estériles (Marks, 1955). Sin embargo, las plantas polihaploides se parecen morfológicamente a otras de origen híbrido y son difíciles de distinguir a campo (Krahulec *et al.*, 2011). De cruzamientos recíprocos entre *Pilosella rubra* (apomíctica 6x) y *Pilosella officinarum* (sexual 4x) se obtuvo alta frecuencia de progenie polihaploide, de las cuales las plantas que eran fértiles producían descendencia por partenogénesis (Rosenbaumová *et al.*, 2012). La frecuencia de polihaploides producidos en *Pilosella* aumenta al aumentar la ploidía de la madre, inclusive se da en madres de ploidías impares (5x y 7x) (Krahulec *et al.*, 2011). La formación de polihaploides podría explicar el origen de algunas de las ploidías impares en *P. cattleyanum*, como ser para los casos donde coexiste descendencia triploide con hexaploide y tetraploide con octoploide germinadas de semillas de un mismo fruto que fueron colectados de poblaciones silvestres en Brasil (Machado & Forni-Martins, 2022). El registro de polihaploides también significa que a pesar de que no se observó meiosis en la megáspora (Souza-Pérez & Speroni, 2017) ésta ocurre aunque en baja proporción. La mayoría de los gametos femeninos involucrados en los cruzamientos son no reducidos (94,9 %), lo que apoya las observaciones de falta de meiosis, así como que *P. cattleyanum* es una especie

apomítica. Sin embargo, existen excepciones como las encontradas y la posibilidad de disponer de plantas haploides para la mejora genética. En árboles frutales esto es deseable, particularmente en casos donde el mejoramiento es difícil debido a la alta heterocigosis, largos intervalos entre las generaciones, así como la partenocarpia y la autoincompatibilidad (Rajasekaran & Mullins, 1979).

3.6.3. Gameto masculino reducido y no reducido

Los gametos masculinos involucrados en las fecundaciones tanto de la oósfera como de los núcleos polares fueron mayoritariamente reducidos (96,8 %). La reducción en los casos de plantas dadoras de polen de ploidía par $8x$ fue a gametos con un contenido de ADN de $4x$, mientras que en plantas dadoras de polen de ploidía impar $7x$ el valor $2C$ presente en esos gametos sorpresivamente fue también similar a $4x$. Los estudios de meiosis en *Psidium* son escasos, posiblemente por el pequeño tamaño de sus cromosomas ($1,41$ a $2,7 \mu m$) y su elevado número (Vázquez, 2014). Asimismo, también difieren en los resultados observados en los distintos materiales y niveles de ploidía analizados. En un material heptaploide de *Psidium coriaceum* (syn. *Psidium cattleianum*) se observó una alta frecuencia de meiosis anormal, con formación de bivalentes ($17-23$) y univalentes (31 a 43) con una frecuencia media de $20.6_{II} + 35.7_I$; además, se determinó un 80 % de esterilidad en los granos de polen (Singhal *et al.*, 1985). En el caso de un citotipo octoploide ($8x$) en metafase I, si bien la mayoría de las asociaciones fueron en forma de bivalentes, también se observaron univalentes y distintos grupos de multivalentes ($VI_1+IV_7+III_3+II_{17}+I_{11}$) (Singh, 2005). Nuestros resultados constantes de gametos masculinos (que llegaron a fecundar) con contenido de ADN siempre próximo a $4x$ puede interpretarse como cierta regularidad en la meiosis de los individuos estudiados o una selección de los granos de polen más euploides y balanceados. El nivel de ploidía de todos los gametos sugiere la formación de $33_{II} + 11_I$ en el caso de las plantas madres $7x$ y un control genético de la meiosis ya que estos últimos deberían segregar todos juntos hacia uno de los polos. En poliploides impares puede darse cierta regularidad en la meiosis como es el caso de *Rosa canina* (Kovarík *et al.*, 2008). En ella el citotipo más común es pentaploide ($5x$, con $x=7$) y tiene descrita un tipo de meiosis particular

llamada “meiosis canina”. Durante la meiosis de la micróspora y megáspora se forman $7_{II} + 21_I$. Para la formación del grano de polen sólo se toman en cuenta siete cromosomas provenientes de los bivalentes y el resto de los cromosomas se descartan y así las células son $1x$; mientras que, para la formación de la megáspora es al revés, sólo se toman en cuenta siete cromosomas derivados de los bivalentes más los 21 cromosomas de los monovalentes, el resto se descarta así las células formadas son $4x$. Con la fecundación se repone la carga cromosómica $5x$ ($1x+4x$) (Täckholm, 1920 en Kovarik *et al.*, 2008).

El origen poliploide de *Psidium cattleyanum* no se conoce, algunos autores basados en estudios citogenéticos clásicos han sugerido que la especie tendría un origen autopoliploide (Vázquez, 2014; Machado, 2016). Mientras que basado en datos de citogenética molecular y la localización *in situ* de sondas de ADN ribosomal para un citotipo $6x$ (rojo), también se ha sugerido un origen alopoliploide (Costa, 2009). La presencia de genomas diferentes o un origen alosegmental podría explicar la presencia de bivalentes, univalentes en distintas frecuencias y ausencia de multivalentes llevando a gametos con un contenido similar al esperado para cuatro genomas para ambos tipos de padres. También debemos considerar la posibilidad de que estos son los tipos de gametos viables que estamos observando.

Los gametos masculinos no reducidos se presentaron en baja proporción (3,2 %) comparado con otros estudios en los que basados en análisis citológicos se encontró un promedio de 8,5 % para tres citotipos triploides y un 31,3 % para un citotipo tetraploide (Barbosa, 2016). Además, en dos variedades cultivadas de *Psidium cattleyanum* el índice meiótico estuvo entre 46-65 (amarillo $5x$) y 24-42 (rojo $6x$) (Raseira & Raseira, 1996). Si bien la formación de gametos no reducidos está registrada para varios géneros (Harlan & De Wet, 1975; Bretagnolle & Thomson, 1995; Kreiner *et al.*, 2017), los porcentajes en los que aparece no están detallados en todos. En general se habla de ausencia o presencia y están dadas, más que nada, para plantas cultivadas (McCoy, 1982; Veilleux *et al.*, 1982). Se sabe que es variable entre especies o cultivares (Kreiner *et al.*, 2017), inclusive en *Solanum phureja* varía entre flores e inclusive dentro de los lóculos de una misma antera (Veilleux *et al.*, 1982). Si bien a nivel de poblaciones la frecuencia en la que aparece es muy baja y

son muy pocos los individuos que presentan alta frecuencia (Kreiner *et al.*, 2017), los gametos no reducidos están vinculados en los procesos de formación de poliploides (Harlan & De Wet, 1975; Kreiner *et al.*, 2017). Sin embargo, en nuestro estudio los gametos masculinos no reducidos estuvieron asociados a las relaciones 2:6 y 2:4:6 por lo que no incidieron en aumentos de niveles de ploidía del embrión. Los niveles de ploidía altos (11x y 12x) encontrados en los embriones se deben a sacos embrionarios no reducidos (2C+C) fecundados por gametos masculinos reducidos que es el tipo de evento más común de formación de poliploides encontrados en la naturaleza (Harlan & De Wet, 1975). La baja proporción de gametos masculinos no reducidos respecto a los femeninos está de acuerdo con resultados obtenidos para otros géneros como en *Sorbus* (Lepší *et al.*, 2019) y cumplen con la premisa general que la apomixis involucra principalmente gametos femeninos no reducidos, mientras que la meiosis de la microsporogénesis no se vería afectada predominando la producción posterior de gametofitos masculinos reducidos (Asker & Jerling, 1992).

3.6.4. Contribución materna-paterna en la formación del endospermo

La formación del endospermo fue en todos los casos producto de la fecundación de los núcleos polares (pseudogamia). Hubo casos en los que intervinieron gametos reducidos, otros no reducidos y la combinación de ambos. Esto llevó por lo tanto a la formación de endospermos con distintos grados de ploidía y lo que es más importante aún, es que se encontraron diversidad de balances embrión-endospermo. El éxito en el desarrollo del embrión se debe, en la mayoría de las especies, al desarrollo normal del endospermo (Brink & Cooper, 1947). En las semillas de origen sexual hay un efecto dosis en la formación del endospermo que está determinada por una contribución materna:paterna 2:1 y donde esta relación, o balance del endospermo, actúa como barrera abortando el desarrollo de la semilla cuando esta relación no se cumple (Johnston *et al.*, 1980; Nogler, 1984). Sin embargo, la evolución de la apomixis conlleva a cambios en la contribución del ADN por lo que también habrá cambios en las dosis aceptadas (Nogler, 1984). En apomícticas donde la contribución materna al endospermo es 2x o 4x la dosis 2m:1p parece ser estrictamente necesaria, pero cuando la contribución materna excede 4x (6x) hay una

desensibilización y ya no hay requerimientos para la formación del endospermo (Quarin, 1999). En *Psidium cattleianum* la citometría mostró que existirían diferentes dosis 2m:1p (5,1 %), 4m:1p (73,0 %) y 4m:2p (2,4 %). Cada una de estas relaciones está asociada a distintos eventos: la primera es la dosis esperada para los casos de sexualidad (con saco embrionario reducido) y polihaploidía; la segunda se da en casos de diplosporia y de sexualidad (con saco embrionario no reducido); mientras que la más rara sería la última (diplosporia con gameto masculino no reducido); no obstante, hay reportes de este tipo de dosis en *Arabis holboelli* (Nogler, 1984) donde se mantiene la proporción 2m:1p (Johnston *et al.*, 1980). En *Tripsacum dactyloides* y *T. maizar* también se forman endospermos funcionales con diversas relaciones de contribuciones de madre y padre, encontrándose en plantas sexuales 2m:1p, 4m:1p o 4m:2p y en apomícticas 8m:1p o 8m:2p (Grimanelli *et al.*, 1997). Estas especies de *Tripsacum*, apomícticas diplospóricas pseudógamas como *P. cattleianum*, no tienen requerimientos específicos en la dosis para la formación del endospermo, por lo que se propone que la evolución de la apomixis diplospórica estaría restringida a especies con pocos o nulos requerimientos de dosis (Grimanelli *et al.*, 1997).

El análisis individual de las semillas permitió determinar, además, casos (19,3 %) donde el endospermo estaba formado por células con distintos niveles de ploidía (relaciones 2:3:5 y 2:4:6). Esto podría ser explicado por la presencia de un tercer núcleo polar no fusionado con los otros dos núcleos polares y que sería fecundado por el segundo gameto masculino no utilizado para fecundar a la oófera. En algunas especies tanto el número de núcleos polares como el de núcleos espermáticos podría sufrir variaciones; y por eso, el número de cromosomas del endospermo en especies pseudógamas es mucho más variable que en las especies sexuadas (Rutishauser, 1982). En *Psidium cattleianum*, en particular en las mismas plantas en las que realizamos los análisis, estudios anatómicos previos registraron la presencia en algunos casos de tres núcleos polares en el saco embrionario (Souza-Pérez & Speroni, 2017). La presencia de tres núcleos polares en el saco embrionario se ha observado en varias especies de plantas (Rutishauser, 1982; Talent & Dickinson, 2007; Lepší *et al.*, 2019); inclusive en *Sorbus* se ha detectado que esta característica

varía según la ploidía de los individuos analizados en una proporción del 1 % de las semillas diploides, 2 % en triploides, 3 % en tetraploides y 5 % en pentaploides (Lepší *et al.*, 2019). En *P. cattleyanum* nuestros estudios de citometría de flujo mostraron un porcentaje mucho más elevado, se dio en un 16,8 % de las semillas de madres heptaploides y en un 22,2 % de las semillas de madres octoploides. En la pseudogamia no hay doble fecundación, hay fecundación simple, sólo el endospermo debe ser estimulado mediante la fecundación para que se inicie el desarrollo (Rutishauser, 1982). Por tanto, si el segundo gameto masculino no es utilizado para fecundar a la oósfera puede perderse ó contribuir a la formación del endospermo (Talent & Dickinson, 2007). Esto es una solución para el balance del endospermo y común en plantas que presentan apomixis gametofítica pseudógama, en el que ambos núcleos contribuyen a formar el endospermo (Nogler, 1984; Savidan, 2000). En *P. cattleyanum* ninguno de los casos donde se produjeron dos fecundaciones de los núcleos polares para la formación de dos niveles de ploidía en el endospermo se encontró fecundación de la oósfera. En *Amelanchier* la fusión de los núcleos polares reducidos se da antes de la polinización en especies sexuales donde se espera sólo una fecundación de la célula media; sin embargo, en apomícticas no se fusionan de manera de facilitar la fecundación con los dos gametos masculinos (Campbell *et al.*, 1987; Burguess *et al.*, 2014). En la especie *Ranunculus auricomus* (Rutishauser, 1982), en la que se encontraron hasta tres núcleos, se observó que los mismos podían estar fusionados o no, y a su vez ser fecundados por uno o dos gametos masculinos, generando endospermos con más de un nivel de ploidía en algunos casos al igual que lo que sugieren los análisis citométricos para *P. cattleyanum*. Sin embargo, no se sabe si todas las variaciones citológicas halladas en las semillas de *R. auricomus* germinan exitosamente o no (Rutishauser, 1982).

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- ALIYU, O. M., M. E. SCHRANZ & T. F. SHARBEL. 2010. Quantitative variation for apomictic reproduction in the genus *Boechera* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 97: 1719-1731. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000188>
- ASKER, S. & L. JERLING. 1992. *Apomixis in plants*. CRC press, Boca Raton.

- ATCHINSON, E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. *American Journal of Botany*. 34: 159–164. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1947.tb12970.x>
- BARBOSA, R. 2016. *Avaliação citológica de acessos de Psidium*. Tesis de Maestría. Universidad Estadual do Norte Fluminense, Brasil.
- BARKE, B. H., K. KARBSTEIN, M. DAUBERT & E. HÖRANDL. 2020. The relation of meiotic behaviour to hybridity, polyploidy and apomixis in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae). *BMC plant biology*. 20: 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02654-3>
- BICKNELL, R. A. & A. M. KOLTUNOW. 2004. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. *The Plant Cell*. 16: S228-S245. <https://doi.org/10.1105/tpc.017921>
- BICKNELL, R. A., S. C. LAMBIE, & R. C. BUTLER. 2003. Quantification of progeny classes in two facultatively apomictic accessions of *Hieracium*. *Hereditas*. 138: 11-20. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2003.01624.x>
- BRETAGNOLLE, F. A. & J. D. THOMSON. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 129: 1-22. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03005.x>
- BRINK, R. A. & D. C. COOPER. 1947. The endosperm in seed development. *The Botanical Review*. 13: 423-477. <https://doi.org/10.1007/BF02861548>
- BRUSSA, C. & I. GRELA. 2007. *Flora arbórea del Uruguay, con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó*. COFUSA, Uruguay.
- BURGESS, M. B., K. R. CUSHMAN, E. T. DOUCETTE, N. TALENT, C. T. FRYE & C. S. CAMPBELL. 2014. Effects of apomixis and polyploidy on diversification and geographic distribution in *Amelanchier* (Rosaceae). *American Journal of Botany*. 101: 1375-1387. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400113>
- CAMPBELL, C. S., C. W. GREENE & S. E. BERGQUIST. 1987. Apomixis and sexuality in three species of *Amelanchier*, shadbush (Rosaceae, Maloideae). *American Journal of Botany*. 74: 321-328. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1987.tb08614.x>

- COSTA, I. R. 2009. *Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrteae, enfatizando Psidium e gêneros relacionados*. Tesis Doctoral. Universidad de Campinas, Brasil.
- COSTA, I.R. & E.R. FORNI-MARTINS. 2006. Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia* Ruiz & Pavon and *Psidium* L. (Myrtaceae Juss.). *Caryologia*. 59: 7–13. <https://doi.org/10.1080/00087114.2006.10797891>
- DEGENER, O. 1939. *Psidium cattleianum* Sabine. In: Publication private, *Flora Hawaiiensis: The new illustrated Flora of the Hawaiian Islands fam. 273*, vol. 4: 2. Honolulu.
- DELGADO, L., F. GALDEANO, M. E. SARTOR, C. L. QUARIN, F. ESPINOZA & J. P. A. ORTIZ. 2014. Analysis of variation for apomictic reproduction in diploid *Paspalum rufum*. *Annals of botany*. 113: 1211-1218. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu056>
- DICKINSON, T. A., E. LO & N. TALENT. 2007. Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant systematics and evolution*. 266: 59-78. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0541-2>
- ELLSHOFF, Z. E., D. E. GARDNER, C. WIKLER & C. W. SMITH. 1995. Annotated bibliography of the genus *Psidium*, with emphasis on *P. cattleianum* (strawberry guava) and *P. guajava* (common guava), forest weeds in Hawai'i. *Technical Report 95*. Cooperative National Park Resources Study Unit, University of Hawaii at Manoa.
- FRANZON, R. C., L. D. O. CAMPOS, C. E. B. PROENÇA & J. C. SOUSA-SILVA. 2009. *Araças do gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos*. Embrapa Cerrados, Planaltina.
- GALBRAITH, D. W., K. R. HARKINS, J. M. MADDOX, N. M. AYRES, D. P. SHARMA & E. FIROOZABADY. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*. 220: 1049-1051. <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>
- GRIMANELLI, D., M. HERNÁNDEZ, E. PEROTTI & Y. SAVIDAN. 1997. Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic *Tripsacum*

- (Poaceae). *Sexual Plant Reproduction*. 10: 279-282.
<https://doi.org/10.1007/s004970050098>
- GURGEL, J. T. A. & J. SOUBIHE SOBRINHO. 1951. Poliembrionia em mirtáceas frutíferas. *Bragantia*. 11: 141-163. <https://doi.org/10.1590/S0006-87051951000200006>
- HAJRUDINOVIC, A., S. SILJAK-YAKOVLEV, S. C. BROWN, F. PUSTAHIIJA, M. BOURGE, D. BALLIAN & F. BOGUNIC. 2015. When sexual meets apomict: genome size, ploidy level and reproductive mode variation of *Sorbus aria* sl and *S. austriaca* (Rosaceae) in Bosnia and Herzegovina. *Annals of Botany*. 116: 301-312.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcv093>
- HARLAN, J. & J. DE WET. 1975. On Ö. Winge and a Prayer: The Origins of Polyploidy. *Botanical Review*. 41, 361-390. <https://doi.org/10.1007/BF02860830>
- HOJSGAARD, D. & E. HÖRANDL. 2019. The rise of apomixis in natural plant populations. *Frontiers in plant science*. 10: 1-13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00358>
- HUENNEKE, L. F. & P. M. VITOUSEK. 1990. Seedling and clonal recruitment of the invasive tree *Psidium cattleianum*: implications for management of native Hawaiian forest. *Biological Conservation*. 53: 199-211.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(90\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0006-3207(90)90086-5)
- JIAO, Y., N. WICKETT, S. AYYAMPALAYAM, A. CHANDERBALI, L. LANDHERR, P. RALPH, Y. TOMSHO, H. LIANG, P. SOLTIS, D. SOLTIS, S. CLIFTON, S. SCHLARBAUM, S. SCHUSTER, H. MA, J. LEEBENS-MACK & C. DEPAMPHILIS. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*. 473: 97-100. <https://doi.org/10.1038/nature09916>
- JOHNSON, A. M. 1936. Polyembryony in *Eugenia hookeri*. *American Journal of Botany*. 23: 83-88. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1936.tb08957.x>
- JOHNSTON, S. A., T. P. M. DEN NIJS, S. J. PELOQUIN & R. E. HANNEMAN. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and applied genetics*. 57: 5-9.
<https://doi.org/10.1007/BF00276002>

- JOHRI, B. M., P. S. SRIVASTAVA & N. SINGH. 2001. Reproductive biology of angiosperms. In: JOHRI, B. M. & P. S. SRIVASTAVA. (eds), *Reproductive biology of plants*, pp. 237-272 Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-50133-3_11
- KOLÁŘ, F., M. ČERTNER, J. SUDA, P. SCHÖNSWETTER & B. C. HUSBAND. 2017. Mixed-ploidy species: progress and opportunities in polyploid research. *Trends in Plant Science*. 22: 1041-1055. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.011>
- KOSKE, R. E. & J. N. GEMMA. 2006. Arbuscular mycorrhizae effects on growth of two Hawaiian species: Indigenous *Osteomeles anthyllidifolia* (Rosaceae) and invasive *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). *Pacific Science*. 60: 471-482. <https://doi.org/10.1353/psc.2006.0033>
- KOVARIK, A., G. WERLEMARK, A. R. LEITCH, K. SOUCKOVA-SKALICKA, Y. K. LIM, L. KHAITOVÁ & H. NYBOM. 2008. The asymmetric meiosis in pentaploid dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*) is associated with a skewed distribution of rRNA gene families in the gametes. *Heredity*. 101: 359-367. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.63>
- KRAHULCOVÁ, A., S. PAPOUŠKOVÁ & F. KRAHULEC. 2004. Reproduction mode in the allopolyploid facultatively apomictic hawkweed *Hieracium rubrum* (Asteraceae, H. subgen. *Pilosella*). *Hereditas*. 141: 19-30. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01845.x>
- KRAHULEC, F., A. KRAHULCOVA, R. ROSENBAUMOVÁ & I. PLAČKOVÁ. 2011. Production of polyhaploids by facultatively apomictic *Pilosella* can result in the formation of new genotypes via genome doubling. *Preslia*. 83: 471-490.
- KREINER, J. M., P. KRON & B. C. HUSBAND. 2017. Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytologist*. 214: 879-889. <https://doi.org/10.1111/nph.14423>
- LEGRAND, D. & R. M. KLEIN. 1977. Mirtáceas. En: REITZ, P. R. (ed.), *Flora Ilustrada Catarinense*, Parte 1: 706-712. Herbario Barbosa Rodrigues, Itajaí.
- LEGRAND, D. 1968. Las Mirtáceas del Uruguay vol III. *Boletín de la Facultad de Agronomía* N° 101. Uruguay.

- LEPŠÍ, M., P. KOUTECKÝ, J. NOSKOVÁ, P. LEPŠÍ, T. URFUS & T. C. RICH. 2019. Versatility of reproductive modes and ploidy level interactions in *Sorbus* s.l. (Malinae, Rosaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 191: 502-522. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boz054>
- MACHADO, R. M. & E. R. FORNI-MARTINS. 2022. *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), a neotropical polyploid complex with wide geographic distribution: insights from cytogenetic and DNA content analysis. *Brazilian Journal of Botany*. 45: 943-955. <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00829-w>
- MACHADO, R. M., F. A. DE OLIVEIRA, A. C. D. CASTELLO, F. DE MATOS ALVES, A. P. DE SOUZA & E. R. FORNI-MARTINS. 2022. Population structure and intraspecific ecological niche differentiation point to lineage divergence promoted by polyploidization in *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). *Tree Genetics & Genomes*. 18: 19. <https://doi.org/10.1007/s11295-022-01551-0>
- MACHADO, R. M., F. A. DE OLIVEIRA, F. DE MATOS ALVES, A. P. DE SOUZA & E. R. FORNI-MARTINS. 2020. Population genetics of polyploid complex *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae): preliminary analyses based on new species-specific microsatellite loci and extension to other species of the genus. *Biochemical Genetics*. 59: 219-234. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-10002-1>
- MACKOVÁ, L., J. NOSKOVÁ, L. ĎURIŠOVÁ & T. URFUS. 2020. Insights into the cytotype and reproductive puzzle of *Cotoneaster integerrimus* in the Western Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*. 306: 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01684-6>
- MAHESHWARI, P. 1950. *An introduction to the Embryology of Angiosperms*. Mc. Graw-Hill, New York. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5681>
- MARKS, G. E. 1955. A polyhaploid plant of *Solanum polytrichon* Rydb. *Nature*. 175: 469-469. <https://doi.org/10.1038/175469a0>
- MACHADO, R. M. 2016. Distribuição geográfica e análise cariotípica de citótipos de *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae). Tesis de Maestría. Universidad Estatal de Campinas, Brasil.

- MATZK, F., A. MEISTER & I. SCHUBERT. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*. 21: 97-108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x>.
- MATZK, F., A. MEISTER, R. BRUTOVSKÁ & I. SCHUBERT. 2001. Reconstruction of reproductive diversity in *Hypericum perforatum* L. opens novel strategies to manage apomixis. *The Plant Journal*. 26: 275-282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01026.x>
- MCCOY, T. J. 1982. The inheritance of 2n pollen formation in diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 24: 315-323. <https://doi.org/10.1139/g82-033>
- NIC LUGHADHA, E. N. & C. PROENÇA. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 83: 480-503. <https://doi.org/10.2307/2399990>.
- NOGLER, G. A. 1984. Gametophytic apomixis. In: B. M. JOHRI, B. M. (ed.), *Embryology of Angiosperms*, pp. 475-518. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_10
- OZIAS-AKINS, P. 2006. Apomixis: developmental characteristics and genetics. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25: 199-214. <https://doi.org/10.1080/07352680600563926>
- QUARIN, C. L. 1999. Effect of pollen source and pollen ploidy on endosperm formation and seed set in pseudogamous apomictic *Paspalum notatum*. *Sexual Plant Reproduction*. 11: 331-335. <https://doi.org/10.1007/s004970050160>
- RAJASEKARAN, K. & M. G. MULLINS. 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *Journal of Experimental Botany*. 30: 399-407. <https://doi.org/10.1093/jxb/30.3.399>
- RAMSEY, J. & D. W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual review of ecology and systematic*. 29: 467-501. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467>
- RASEIRA, M. & A. RASEIRA. 1996. *Contribucao Ao Estudo Do Aracazeiro, Psidium cattleianum*. Embrapa-CPACT, Pelotas.

- ROSENBAUMOVÁ, R., A. KRAHULCOVÁ & F. KRAHULEC. 2012. The intriguing complexity of parthenogenesis inheritance in *Pilosella rubra* (Asteraceae, Lactuceae). *Sexual plant reproduction*. 25: 185-196. <https://doi.org/10.1007/s00497-012-0190-7>
- RUTISHAUSER, A. 1982. *Introducción a la embriología y biología de la reproducción de las angiospermas*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- SARTOR, M. E., C. L. QUARIN & F. ESPINOZA. 2009. Mode of reproduction of colchicine-induced *Paspalum plicatulum* tetraploids. *Crop Science*. 49: 1270-1276. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.05.0270>
- SARTOR, M. E., C. L. QUARIN, M. H. URBANI & F. ESPINOZA. 2011. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution*. 293: 31-41. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0416-4>.
- SAVIDAN, Y. 2000. Apomixis: genetics and breeding. *Plant breeding reviews*. 18: 13-86. <https://doi.org/10.1002/9780470650158.ch2>
- SCHINKEL, C. C., B. KIRCHHEIMER, S. DULLINGER, D. GEELEN, N. DE STORME & E. HÖRANDL. 2017. Pathways to polyploidy: indications of a female triploid bridge in the alpine species *Ranunculus kuepferi* (Ranunculaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 303: 1093-1108. <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1435-6>
- SHIVANNA, K. R. & N. S. RANGASWAMY. 1992. Tests for pollen viability. In: SHIVANNA, K. R. & N. S. RANGASWAMY (eds.). *Pollen biology*, pp. 33-37. Springer-Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77306-8>
- SINGH, A. K. 2005. *Cytological and morphological studies in guava germplasm*. Tesis Doctoral. Chaudhary Charan Singh Haryana Agricultural University, India.
- SINGHAL, V. K., B. S. GILL & S. S. BIR. 1985. Cytology of woody species. *Proc. Indian Acad. Sci., Plant Sci.* 94: 607–618. <https://doi.org/10.1007/BF03053228>
- SOBRAL, M., C. PROENÇA, M. SOUZA, F. MAZINE & E. LUCAS. 2015. Myrtaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponible en: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10858>

- SOUZA-PÉREZ, M. & G. SPERONI. 2017. New apomictic pathway in Myrtaceae inferred from *Psidium cattleianum* female gametophyte ontogeny. *Flora*. 234: 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.06.010>
- SPERONI, G., C. MAZZELLA, B. VIGNALE, C. PRITSCH, D. CABRERA, M. BONIFACINO & P. GAIERO. 2012. Estudios biológicos y taxonómicos en la especie frutal nativa *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). *Serie Actividades de Difusión INIA*. 679: 23-35.
- TALENT, N. & T. A. DICKINSON. 2007. Endosperm formation in aposporous *Crataegus* (Rosaceae, Spiraeoideae, tribe Pyreae): parallels to Ranunculaceae and Poaceae. *New Phytologist*. 173: 231-249. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01918.x>
- TANDON, R., K. R. SHIVANNA & M. KOUL. 2020. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: Patterns and Processes*. Springer, Singapore.
- ULUM, F. B., C. COSTA CASTRO & E. HÖRANDL. 2020. Ploidy-dependent effects of light stress on the mode of reproduction in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae). *Frontiers in plant science*. 11: 104. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00104>
- VÁZQUEZ, S. N. 2014. *Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromosómica y cariotípica en poblaciones silvestres y genotipos seleccionados en programas nacionales de mejoramiento. Tesis de Maestría. Universidad de la República, Uruguay.
- VEILLEUX, R. E., N. A. MCHALE & F. I. LAUER. 1982. 2n gametes in diploid *Solanum*: frequency and types of spindle abnormalities. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 24: 301-314.
- VIGNALE, B. & L. BISIO. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia*. 9: 35-39.

4. DISCUSIÓN

Las semillas de Myrtacece son exalbuminadas (Tobe y Raven 1983, Schmid 1980) y esta condición fue confirmada para *Psidium cattleianum* (Rotman, 1976). Estudios previos reportaron la presencia de relictos de endospermo en las semillas maduras de la especie (Landrum y Kawasaki 1997, Nic Lughada y Proença 1996, Corner 1976), lo cual fue verificado en nuestro estudio ontogenético. Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue definir en qué estadio de desarrollo de la semilla se encontraba la máxima concentración de endospermo, de modo de utilizar ese estadio seminal para realizar los análisis de citometría de flujo. La citometría de flujo en semillas detecta, además del nivel de ploidía, la cantidad de núcleos de cada uno de los componentes seminales (Matzk et al. 2000), por lo que la presencia de abundantes células de cada uno de ellos, se postuló que haría más clara la medición.

En nuestras observaciones anatómicas el endospermo mostró su máximo desarrollo entre los 36 y 43 dpp, por lo que inicialmente se realizaron los estudios de citometría en estas fechas. Sin embargo, los análisis no dieron los resultados esperados y los histogramas no mostraron claramente los contenidos de ADN de cada estructura. Una posible explicación es que, en esos estadios en que las estructuras seminales están en pleno desarrollo, se solapan los contenidos de ADN de las células de los diferentes tejidos en distintas fases de la mitosis y no se obtienen histogramas claros de los distintos contenidos de ADN. Otra posibilidad, es la existencia de diferentes compuestos secundarios en esa etapa del desarrollo de la semilla, que afectan las medidas citométricas. La presencia de compuestos secundarios es uno de los mayores problemas en los análisis por citometría de flujo, ya que los mismos interfieren con la fluorescencia del fluorocromo utilizado (Loureiro et al. 2006). Además, el procesamiento de las semillas para la extracción de ADN se hizo con rudimentos seminales enteros, por lo que otras partes de la semilla también fueron medidas por el citómetro. Para minimizar estos efectos, se utilizaron semillas maduras a las que se les retiró de forma mecánica la cubierta seminal, lo que permitió obtener poblaciones nucleares claramente identificables de diferentes contenidos de ADN correspondientes solo a embrión y endospermo. Por esto se decidió realizar todos los análisis de citometría de flujo con semillas maduras

y sin la cubierta seminal, como en trabajos precedentes en especies con semillas exalbuminadas de otras familias como Brassicaceae, Boraginaceae, Rosaceae (Samaniego et al. 2018, Dobeš et al. 2013, Taşkin et al. 2004) y Asteraceae (Krahulcová y Suda 2006). El estudio ontogenético realizado en nuestro trabajo respalda la presencia de relictos de endospermo en la semilla madura analizada por citometría.

El análisis individual de las semillas de *Psidium cattleyanum* por la técnica de citometría de flujo permitió determinar el balance de contenido de ADN embrión:endospermo, a partir del cual se pudo inferir la vía reproductiva por la que se formó cada semilla y también la frecuencia con la que ocurre cada una de esas vías. Los análisis de semillas confirmaron que el modo reproductivo de *Psidium cattleyanum* es principalmente pseudógamo con un balance embrión:endospermo 2:5. El análisis de semillas realizado en forma individual, a diferencia de la mayoría de los trabajos en los que utilizan *bulk* (Kolarčík et al. 2018, Sartor et al. 2011, Krahulcová y Suda 2006, Taşkin et al. 2004) permitió detectar la frecuencia de cada evento y además, una variedad de otras posibles combinaciones de las células reproductivas del saco embrionario y los gametos masculinos. Si bien la apomixis se presentó en un 86,2 % del total de semillas analizadas, la sexualidad representó un 13,4 % y la partenogénesis haploide un 0,4 %, determinando que la apomixis en el caso de *P. cattleyanum* es de tipo facultativo. Al igual que en otras especies, los porcentajes de apomixis y sexualidad variaron según la ploidía (Sartor et al. 2011, Kelley et al. 2009). A pesar de que los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas, las madres de ploidía par (8x) presentaron eventos sexuales en un 23,8 % de sus semillas, valor ocho veces mayor que el encontrado en las plantas madres de ploidía impar (7x).

El estudio ontogenético realizado en este trabajo permitió describir las diferentes etapas de desarrollo de las semillas de *Psidium cattleyanum* en materiales seleccionados heptaploides y octoploides de la forma *cattleyanum* y la forma *lucidum* respectivamente. La puesta a punto de la técnica no fue sencilla ya que las diferentes partes de la semilla tienen distinta consistencia celular lo que dificulta la penetración de la parafina en algunos tejidos. Esto explica, en parte, la falta de estudios

ontogenéticos a nivel de semillas (Van Wyk y Botha 1984) que varios autores plantean y adjudican a las dificultades técnicas del procesamiento del material (Devis 1968 en Beardsell et al. 1993, Mauritzon 1939). Desde los primeros estudios de Myrteae realizados por De Candolle (1828) y Berg (1857-1859) se reconoció el valor taxonómico de los caracteres morfológicos del embrión. El último de los autores mencionados utilizó estos caracteres morfológicos del embrión para diferenciar tres subtribus dentro de Myrteae. Los embriones poseen caracteres no plásticos y se asume que las diferentes subtribus definidas por sus morfologías son monofiléticas (Landrum 1981). A pesar del valor taxonómico destacado de los caracteres seminales, las descripciones están basadas en estructuras presentes en las semillas maduras, los estudios ontogenéticos son escasos y se desconoce el origen de muchas de las estructuras que se han descrito en las semillas de Myrteae. A nivel de la cubierta seminal, la presencia del opérculo fue descrita como una característica típica en la germinación de las especies de la subtribu Myrtinae (Landrum y Kawasaki 1997, Nic Lughadha y Proença 1996, Landrum y Sharp 1989). Se verifica en nuestro estudio que es originado por el tegumento interno esclerificado, que permanece y se acrecenta en la micrópila de la semilla madura, rodeado por una porción de tejido parenquimático por donde se produce el desprendimiento del opérculo cuando se inicia la germinación. Otra característica de la testa seminal cuyo origen fue determinado en nuestro trabajo, es la cubierta externa carnosa denominada sarcotesta. Se pudo establecer que no existe un origen único de estos estratos celulares externos que se re-hidratan durante la germinación y que dentro del género pueden involucrar sólo células epidérmicas como lo verificado para *Psidium cattleyanum* o involucrar también células del mesotegumento como lo observado en *P. guineense* y *P. australe* (Moreira-Coneglian 2011).

A nivel del embrión, se observaron las diferentes formas adoptadas por el mismo durante su desarrollo y se registró la duración de cada estadio, la cual varió según la planta madre que le dio origen. Se pudo establecer que el endospermo no es la única vía de nutrición del embrión durante su desarrollo (Landrum y Kawasaki 1997, Nic Lughada y Proença 1996, Corner 1976) y se observó la persistencia de

células del nucelo, la formación de una hipostasa y la penetración de células placentarias a través del micrópilo.

La observación del embrión en las distintas fechas analizadas muestra diferencias cronológicas en el desarrollo. Las plantas madres octoploides fueron más precoces en el inicio de cada etapa de desarrollo identificada, si se comparan con las plantas madres heptaploides, por lo que el desarrollo total del embrión se alcanza más rápido en las primeras. Estas diferencias pueden deberse al nivel de ploidía ya que, a mayor ploidía se espera un mayor tamaño celular y por lo tanto de la semilla, como ya fue observado en la especie de la familia Cactaceae *Rhipsalis baccifera* (Sol.) Stearn (Cota-Sánchez y Bomfim-Patricio 2010). Sin embargo, también se ha observado que mayores niveles de ploidía están asociados a un crecimiento más lento, por lo menos a nivel de plántula, debido a un enlentecimiento del ciclo celular y la mitosis (Ranney 2006, Comai 2005). Es importante considerar que los materiales en los que se estudió la ontogenia pertenecen a semillas obtenidas de cruzamientos dirigidos, de la misma manera que las semillas maduras analizadas por la técnica de citometría de flujo. Basados en los resultados obtenidos en el análisis del contenido de ADN, hay un 91 % de los embriones que tienen la misma ploidía de la planta madre porque son de origen apomíctico (86 %) o sexual (5 %), mientras que el resto de los embriones se distribuyen en las ploidías 4x, 11x y 12x detectadas por citometría de flujo. Es interesante destacar que, para una misma fecha de muestreo en semillas derivadas de la misma madre, se observaron embriones en distintas etapas de desarrollo. Esto podría explicarse, como mencionamos anteriormente, a embriones con niveles de ploidías menos frecuentes, que se desfasan del tiempo normal de desarrollo de los embriones observados. Los embriones 4x se formaron por partenogénesis polihaploide de oóferas 7x y 8x en un porcentaje del 0,4 %. En general está registrado que en poblaciones naturales o en cruzamientos dirigidos, la partenogénesis haploide se observa en baja proporción y es poco exitosa (Asker y Jerling 1992), porque las plantas son de lento crecimiento y de tamaño más pequeñas de lo normal (Marks 1955). Esto puede relacionarse en nuestro caso, con semillas donde el embrión tiene un desarrollo más lento. En el procesamiento de apertura de

semillas maduras para captura de imágenes, pudo observarse, además, que algunas semillas que habían alcanzado su tamaño externo normal, estaban vacías en su interior. Teniendo en cuenta las observaciones anatómicas, esto puede adjudicarse a algunos de los cigotos que no pudieron desarrollarse o a los embriones retrasados en su desarrollo que no prosperaron. Los procesos de selección durante la germinación son considerados como uno de los filtros principales durante el ciclo de vida en plantas y ha sido observada en otras especies apomícticas facultativas en las que se han comparado las ploidías de semilla y plántulas (Krahulec et al. 2006).

Otra de las fallas en el desarrollo de estos embriones puede atribuirse al gran espectro de balances entre los contenidos de ADN embrión: endospermo. Estos balances, que se separan de la relación 2:3 típica de los embriones de origen sexual a partir de gametofitos reducidos, han sido promovidos en cruzamientos de materiales de maíz con diferentes ploidías y se observó una desregulación temporal de los genes involucrados en el desarrollo del endospermo (Pennington et al. 2008). Teniendo en cuenta los niveles de ploidía de las plantas utilizadas en los tratamientos de polinización, tanto de receptoras como de dadoras de polen, los niveles de ploidía del endospermo fueron variados y muy altos (11x, 12x, 15x, 18x, 20x, 21x, 22x, 23x). Estos valores, que se separan bastante de la condición 3x que caracteriza a las angiospermas, necesitan del establecimiento de nuevos ‘diálogos’ moleculares con el embrión para que este último pueda desarrollarse exitosamente (Ingram 2020).

Queda comprobado que la fecundación ocurre en la formación apomíctica de las semillas de *Psidium cattleianum* para la unión con los núcleos polares de la célula media y formación del endospermo. Esto ocurre en la mayoría de las plantas apomícticas (Hojsgaard y Hörandl 2019) y es un detonador de la partenogénesis (Asker y Jerling 1992). Futuros trabajos merecen ser planteados para establecer la incidencia de los diferentes balances encontrados sobre el desarrollo exitoso del embrión y la semilla.

5. CONCLUSIONES

El estudio ontogenético realizado en este trabajo permitió describir las diferentes etapas de desarrollo de las semillas de *Psidium cattleianum* en materiales heptaploides y octoploides de la forma *cattleianum* y la forma *lucidum* respectivamente. A nivel del embrión, se observaron secuencialmente las formas globular, cordiforme, torpedo durante su desarrollo y en la semilla madura el eje hipocótilo-radícula adopta forma 'C' con los cotiledones bien desarrollados y recostados sobre dicho eje. La duración de cada forma varió según la planta madre que le dio origen. A nivel de la cubierta seminal, el tegumento externo se lignifica a nivel del mesotegumento formando la capa mecánica protectora de la semilla mientras que la epidermis externa forma una sarcotesta, el tegumento interno forma el micrópilo y origina un opérculo lignificado en la madurez seminal. Se reportan una gran diversidad de tejidos que participan en la nutrición del embrión, como nucelo persistente, formación de hipostasa, desarrollo del endospermo y su permanencia, y la penetración de la placenta a través del micrópilo.

El análisis individual de las semillas de *Psidium cattleianum* por la técnica de citometría de flujo permitió determinar el balance de contenido de ADN embrión:endospermo, a partir del cual se pudo inferir la vía reproductiva por la que se formó cada semilla. Los resultados mostraron que el modo reproductivo de *Psidium cattleianum* es principalmente pseudógamo facultativo con un balance embrión:endospermo 2:5 y que presenta además una variedad de posibilidades de otras combinaciones de las células reproductivas del saco embrionario y los gametos masculinos. La apomixis se presentó en un 86,2 % del total de semillas analizadas, mientras que la sexualidad se encontró en un 13,4 % y la partenogénesis polihaploide en un 0,4 %. Si tomamos en cuenta el nivel de ploidía de las plantas madres podemos decir que, se encontraron diferencias significativas, las madres de ploidía par (octoploides amarillas) presentaron eventos sexuales en un 23,8 % de sus semillas, valor ocho veces mayor que el encontrado en las plantas madres de ploidía impar (heptaploides rojas).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Asker S, Jerling L. 1992. Apomixis in plants. Boca Raton: CRC press. 298 p.
- Atchinson, E. 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. American Journal of Botany. 34 (3): 159–64. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1947.tb12970.x>
- Beardsell DV, O'Brien SP, Williams EG, Knox RB, Calder DM. 1993. Reproductive Biology of Australian Myrtaceae. Australian Journal of Botany. 41(5): 511–26. <https://doi.org/10.1071/BT9930511>
- Benevenga SM, Silveira Da Silva AC, Da Silva C. 2012. Recursos genéticos de frutas da familia Myrtaceae no Sul de Brasil. Magistra. 24(4): 250-262.
- Berg O. 1857-1859. Myrtaceae. En: C. F. P. von Martius, Flora Brasiliensis. 14: 1-655.
- 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 de Agronomía. 74 p.
- Biegelmeier R, Andrade JMM, Aboy AL, Apel MA, Dresch RR, Marin R, Raseira MCB, Henriques AT. 2011. Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) strawberry guava fruit. Journal of Food Science. 76 (7): 991-996. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x>
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. Nature reviews genetics. 6(11), 836-846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>
- Corner EJH. 1976. The Seeds of Dicotyledons: Volume 1 y 2. Cambridge: Cambridge University Press.
- Costa IR, Forni-Martins ER. 2006. Chromosome studies in species of *Eugenia*, *Myrciaria* and *Plinia* (Myrtaceae) from South-Eastern Brazil. Australian Journal of Botany. 54: 409–15. <https://doi.org/10.1071/BT04199>
- Cota-Sánchez JH, Bomfim-Patricio MC. 2010. Seed morphology, polyploidy and the evolutionary history of the epiphytic cactus *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae). Polibotánica. (29): 107-129.

- Davis GL. 1966. Systematic embryology of the angiosperms. New York: JohnWiley and Sons. Inc. 528 p.
- De Candolle AP. 1828. Myrtaceae. En: De Candolle AP (ed.). Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis. Paris: Treuttel and Würtz. (3): 207-296.
- Degener O. 1939. *Psidium cattleianum* Sabine. En: Publ. priv. Flora Hawaiiensis: The new illustrated Flora of the Hawaiian Islands fam. 273. Honolulu: Publ. priv. (4): 2.
- Dobeš C, Lückl A, Hülber K, Paule J. 2013. Prospects and limits of the flow cytometric seed screen—insights from *Potentilla* sensu lato (Potentilleae, Rosaceae). New Phytologist. 198(2): 605-616.
<https://doi.org/10.1111/nph.12149>
- Doležel J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochemical analysis. 2(4): 143-154.
<https://doi.org/10.1002/pca.2800020402>
- Fachinello JC, Hoffmann A, Menezes AL, Nachtigal JC. 1993. Efeito do ácido indolbutírico e PVP no enraizamento de estacas de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) em diferentes substratos. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, São Carlos. (5):1.
- Feippe AG, Ibañez F, Calistro P, Vignale B, Cabrera D, Zoppolo R. 2010. Evaluación del potencial nutraceutico en selecciones de frutos nativos del Uruguay. Serie Actividades de Difusión INIA. 602: 25-33.
- Feippe AG, Peralta G, Ibañez F, Vignale B, Cabrera D, Zoppolo R. 2008. Valor nutricional de los frutos nativos del Uruguay: *Eugenia uniflora* (Pitanga); *Psidium cattleianum* (Arazá); *Acca sellowiana* (Guayabo del país) y *Myrcinthes pungens* (Guaviyú). Serie Actividades de Difusión INIA. 15: 32-34.
- Franzon RC, De Oliveira Campos LZ, Proença CEB, Sousa-Silva JC. 2009. Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Planaltina DF, Embrapa Cerrados. Documentos 266.47 p.
- Franzon RC, Raseira MDCB, Corrêa E. 2004. Potencialidades agronômicas de algumas mirtáceas frutíferas nativas do sul do Brasil. En: Raseira MDCB,

- Antunes LEC, Gonçalves RTED (eds.) Espécies Frutíferas Nativas do Sul do Brasil. Pelotas, Rio Grande do Sul: Embrapa. Documentos 129. 125 p.
- Govaerts R, Sobral M, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum L, Matsumoto K, Mazine FF, Lughadha EN, Proença C, Silva LHS, Wilson P, Lucas E. 2008. World Checklist of Myrtaceae. Richmond: Kew Publishing, Royal Botanic Gardens. 455 p.
- Hojsgaard D, Hörandl E. 2019. The rise of apomixis in natural plant populations. *Frontiers in Plant Science*. 10: 358. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00358>
- Hörandl, E. 2010. The evolution of self-fertility in apomictic plants. *Sexual plant reproduction*, 23: 73-86. <https://doi.org/10.1007/s00497-009-0122-3>
- Ingram GC. 2020. Family plot: the impact of the endosperm and other extra-embryonic seed tissues on angiosperm zygotic embryogenesis. *F1000Research*. 9: 1-8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21527.1>
- Kelley AM, Johnson PG, Waldron BL, Peel MD. 2009. A survey of apomixis and ploidy levels among *Poa* L. (Poaceae) using flow cytometry. *Crop Science*. 49(4): 1395. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0553>
- Kolarčík V, Kocová V, Vašková D. 2018. Flow cytometric seed screen data are consistent with models of chromosome inheritance in asymmetrically compensating allopolyploids. *Cytometry Part A*. 93(7): 737-748. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23511>
- Krahulcová A, Rotreková O. 2010. Use of flow cytometry in research on apomictic plants. *Preslia*. 82(1): 23-39.
- Krahulcova A, Suda J. 2006. A modified method of flow cytometric seed screen simplifies the quantification of progeny classes with different ploidy levels. *Biologia Plantarum*. 50: 457–460. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0070-9>
- Krahulec F, Krahulcová A, Papoušková S. 2006. Ploidy level selection during germination and early stages of seedling growth in the progeny of

- allohexaploid facultative apomict *Hieracium rubrum* (Asteraceae). *Folia Geobotanica*. 41(4): 407-416. <https://doi.org/10.1007/BF02806557>
- Landrum LR, Kawasaki ML. 1997. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*. 49(4): 508–36. <https://doi.org/10.2307/2807742>
- Landrum LR, Sharp WP. 1989. Seed coat characters of some American Myrtinae (Myrtaceae): *Psidium* and related genera. *Systematic Botany*. 14(3): 370–76. <https://doi.org/10.2307/2418927>
- Landrum LR. 1981. The phylogeny and geography of *Myrceugenia* (Myrtaceae). *Brittonia*. 33(1): 105-129. <https://doi.org/10.2307/2806583>
- Legrand D, Klein RM. 1977. Myrtaceae. En: Reitz PR (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajai: Ed.. Herbario Barbosa Rodrigues. 553-876.
- Loureiro J, Rodriguez E, Doležal J, Santos C. 2006. Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*. 98(3): 679-689. <https://doi:10.1093/aob/mcl141>
- Machado RM, De Oliveira FA, Castello ACD, De Matos Alves F, De Souza AP, Forni-Martins ER. 2022. Population structure and intraspecific ecological niche differentiation point to lineage divergence promoted by polyploidization in *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). *Tree Genetics & Genomes*. 18(3): 19. <https://doi.org/10.1007/s11295-022-01551-0>
- Machado RM, De Oliveira FA, De Matos Alves F, De Souza AP, Forni-Martins ER. 2020. Population genetics of polyploid complex *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae): preliminary analyses based on new species-specific microsatellite loci and extension to other species of the genus. *Biochemical Genetics*. no. March. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-10002-1>
- Machado RM, Forni-Martins ER. 2022. *Psidium cattleianum* Sabine (Myrtaceae), a neotropical polyploid complex with wide geographic distribution: insights from cytogenetic and DNA content analysis. *Brazilian Journal of Botany*. 45(3): 943-955. <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00829-w>
- Maheshwari P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. Nueva York: McGraw-Hill. 453 p. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.5681>

- Manshardt R, Aradhya KM. 1990. Genetic uniformity in strawberry guava (*Psidium cattleianum*). Abstracts of Contributed Papers, 23rd International Horticulture Conference. Florence, Italy. En: Ellshoff ZE, Gardner DE, Winkle 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 Hawaii. Manoa: Cooperative National Park resources studies Unit, University of Hawaii at Manoa, Dept. of Botany, Technical Report 95.
- Marks GE. 1955. A polyhaploid plant of *Solanum polytrichon* Rydb. *Nature*. 175: 469-469. <https://doi.org/10.1038/175469a0>
- Martínez N, Vignale B, Montes F, Dellacassa E. 2008. Estudios sobre las cualidades aromáticas de los frutos nativos. En: IV Simposio Nacional de Morango e III Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul (4° y 3°, Pelotas, Brasil). Embrapa Clima Templado.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*. 21(1): 97-108. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00647.x>
- Mauritzon J. 1939. Contributions to the orders Rosales and Myrtales. *Acta Universitatis Lundensis*. 35(2): 1-121.
- Millán C. 2015. Fenología intrafloral en material seleccionado de *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). Tesis Licenciado en Biología, Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 37 p.
- Moreira-Coneglian IR. 2011. Morfoanatomia de ovário, pericarpo e semente de sete espécies de Myrteae DC (Myrtaceae). Tesis de Doctorado. Botucatu, Brasil. Universidade Estadual Paulista. 116 p.
- Natchigal JC. 1994. Propagação de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) a través de estacas semilenhosas. Tesis de Maestría. Pelotas, Brasil. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. 73 p.
- Nic Lughadha E, Proença C. 1996. A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*. 83(4): 480–503. <https://doi.org/10.2307/2399990>

- Nogler GA. 1984. Gametophytic apomixis. En: Johri BM. (Ed.). Embryology of angiosperms. Springer, Berlin, Heidelberg. 475-518. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_10
- Pennington PD, Costa LM, Gutierrez-Marcos JF, Greenland AJ, Dickinson HG. 2008. When genomes collide: aberrant seed development following maize interploidy crosses. *Annals of Botany*. 101(6): 833-843. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn017>
- Ranney TG. 2006. Polyploidy: from evolution to new plant development. En: The International Plant Propagators' Society (eds.). Combined Proceedings. Pennsylvania: International Plant Propagators' Society (IPPS). 56: 137-142.
- Raseira MDCB, Raseira A. 1996. Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum*. Pelotas, Brasil: Embrapa-CPACT. 95 p.
- Richards AJ. 2003. Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 358(1434): 1085-1093. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1294>
- Rotman AD. 1976. Revisión del género *Psidium* en la Argentina (Myrtaceae). *Darwiniana*. 20 (3-4): 418-44.
- Roy SK. 1953. Embryology of *Eugenia jambos* L. *Current Science*. 22(8): 249-250.
- Sabine J. 1821. *Psidium cattleianum*. *Transactions of the Horticultural Society of London*. 4: 315-317.
- Samaniego F, Kolár F, Urfus T, Barragán Á, Romoleroux K. 2018. Determination of apomixis by flow cytometry in two species of *Lachemilla* (Rosaceae) in Ecuador. *Neotropical Biodiversity*. 4(1): 152-163. <https://doi.org/10.1080/23766808.2018.1542785>
- Sartor ME, Quarín CL, Urbani MH, Espinoza F. 2011. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five *Paspalum* species. *Plant Systematics and Evolution*. 293(1-4): 31-41. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0416-4>
- Schmid R. 1980. Comparative anatomy and morphology of *Psiloxylon* and *Heteropyxis*, and the subfamilial and tribal classification of Myrtaceae. *Taxon*. 29(5-6): 559-595. <https://doi.org/10.2307/1220329>

- Singhal VK, GILL BS, BIR SS. 1985. Cytology of woody species. Proc. Indian Acad. Sci., Plant Sci. 94: 607–618. <https://doi.org/10.1007/BF03053228>
- Souza-Pérez M, Mourelle D, Trujillo C, Borges A, Speroni G. 2021. Pollen grain performance in *Psidium cattleianum* (Myrtaceae): a pseudogamous polyploid species. Flora. 151863. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151863>
- Souza-Pérez M, Speroni G. 2017. New apomictic pathway in Myrtaceae inferred from *Psidium cattleianum* female gametophyte ontogeny. Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants. 234: 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.06.010>
- Speroni G, Mazzella C, Pritsch C, Bonifacino M, Vaio M, Souza-Pérez M, Vázquez S, González S, Millán C, Trujillo C, Borges A, Vignale B, Cabrera D. 2015. Avances en los estudios sobre arazá. Serie Actividades de Difusión INIA. 745: 1–7.
- Speroni G, Mazzella C, Vignale B, Pritsch C, Cabrera D, Bonifacino M, Quezada M, Silva M, Jolochín G, Tardáguila A, Gaiero P, Millán C, Trujillo C. 2012. Estudios biológicos y taxonómicos de la especie frutal nativa *Psidium cattleianum* (Myrtaceae). Serie Actividades de Difusión INIA. 679: 23-35.
- Taşkın KM, Turgut K, Scott RJ. 2004. Apomictic development in *Arabis gunnisoniana*. Israel Journal of Plant Sciences. 52(2): 155-160. <https://doi.org/10.1560/L3DE-FMVY-1XCQ-QRY5>
- Tobe H, Raven PH. 1983. An embryological analysis of Myrtales: its definition and characteristics. Annals of the Missouri Botanical Garden. 70: 71-94. <https://doi.org/10.2307/2399008>
- Tomaz ZFP, Galarça SP, Lima CSM, Betemps DL, Gonçalves MA, Rufato ADR. 2011. Tratamentos pré-germinativos em sementes de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine L.). Current Agricultural Science and Technology. 17(1): 60-65. <https://doi.org/10.18539/cast.v17i1.2032>
- 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(1): 63–80. [https://doi.org/10.1016/s0022-4618\(16\)30083-3](https://doi.org/10.1016/s0022-4618(16)30083-3)

- Vázquez SN. 2014. *Psidium cattleianum* Sabine y *Acca sellowiana* (Berg.) Burret (Myrtaceae): caracterización cromosómica y cariotípica en poblaciones silvestres y genotipos seleccionados en programas nacionales de mejoramiento. Tesis de Grado. Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias. 86 p.
- Vignale B, Bisio L. 2005. Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia*. 9(1-2): 35-39.
- Vijayaraghvan MR, Prabhakar K. 1984. The endosperm. En: Johri MB (Ed.). *Embriology of Angiosperms*. Springer, Berlin, Heidelberg. 319-376. https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1_7