



## EMBRIOGÉNESIS Y ENDOSPERMOGÉNESIS EN LA HIBRIDACIÓN INTERGENÉRICA ENTRE *Calibrachoa* – *Petunia*

### EMBRYOGENESIS AND ENDOSPERMOGENESIS IN INTERGENERIC HYBRIDIZATION BETWEEN *Calibrachoa*- *Petunia*

Víctor José Milicia<sup>1a\*</sup>, Andrés Mollá Kralj<sup>1b</sup>, Candela Sanguinetti<sup>1c</sup>, Candela Cardenia<sup>1d</sup>, María  
Silvina Soto<sup>2</sup> y Marcelo Ramón Lovisoló<sup>1e</sup>

<sup>1a</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y  
Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0003-1450-1570>

<sup>1b</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y  
Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0003-2048-5941>

<sup>1c</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y  
Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina

<sup>1d</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y  
Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina  
<https://orcid.org/0009-0004-8605-8509>

<sup>1e</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta provincial N° 4 y  
Juan XXXIII, (B1832) Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-0588-9107>

<sup>2</sup> Instituto de Floricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Nicolas Repetto y De los  
Reseros, (B1712) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina  
<https://orcid.org/0000-0002-0407-9567>

\* Autor para correspondencia: [vmilicia@agrarias.unlz.edu.ar](mailto:vmilicia@agrarias.unlz.edu.ar)

#### RESUMEN

En los cultivos ornamentales, la hibridación intergenérica está limitada por diferentes barreras de incompatibilidad que se establecen después de la fecundación. Los objetivos del presente trabajo fueron: conocer a nivel histológico cómo se manifiesta la incompatibilidad en la combinación de *Petunia inflata* x *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow, identificar durante el proceso de embriogénesis el momento oportuno para realizar el rescate de embriones y determinar el estado de desarrollo del embrión y endosperma en el que se manifiesta la incompatibilidad poscigótica. Se realizaron cruzamientos entre *Petunia inflata* y *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow. Para la observación a través de cortes histológicos de semillas en desarrollo se realizaron inclusiones en parafina de frutos cosechados desde los 3 a los 10 días posteriores a la polinización (DPP), y para la observación de semillas maduras se recolectaron frutos, previos a la dehiscencia, y se cortaron las semillas longitudinalmente bajo lupa. A los 5 DPP se observó que el endosperma detiene su división y a los 7 DPP no se observa la presencia de embriones. Por otro lado, las semillas cortadas manualmente mostraron desarrollo del tegumento y ausencia de embrión y endosperma. En estas semillas, la incompatibilidad se manifiesta a través de la eliminación de células por muerte celular programada, lo cual lleva a la autólisis de los embriones y del endosperma, culminando en la

formación de semillas vanas. De esta manera el rescate de proembriones a los 5 DPP podría ser una buena técnica para superar barreras reproductivas poscigóticas.

**Palabras clave:** Histología, plantas ornamentales, mejoramiento, semillas, plantas nativas.

### ABSTRACT

In ornamental crops, intergeneric hybridization is limited by different incompatibility barriers that are established after fertilization. The objectives of this work were to know at a histological level how the incompatibility manifests itself in the combination of *Petunia inflata* x *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow; identify the optimum timing to rescue embryos during the embryogenesis process; and determine the stage of development of the embryo and endosperm in which postzygotic incompatibility manifests. Crosses were made between *Petunia inflata* and *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow. For observation through histological sections of developing seeds, paraffin inclusions were made from fruits harvested from 3 to 10 days after pollination (DPP), and for observation of mature seeds, fruits prior to dehiscence were collected and seeds were cut longitudinally under a magnifying glass. It was observed that the endosperm stops its division at 5 DPP, and no presence of embryos is observed at 7 DPP. On the other hand, manually cut seeds showed development of the integument and absence of embryo and endosperm. In these seeds, incompatibility is manifested through the elimination of cells by programmed cell death, which leads to autolysis of the embryos and the endosperm, and finally to the formation of empty seeds. Therefore, the rescue of proembryos at 5 DPP could be a good technique to overcome postzygotic reproductive barriers.

**Keywords:** Histology, ornamental plants, improvement, seeds, native plants.

### INTRODUCCIÓN

En los cultivos ornamentales la hibridación interespecífica e intergenérica es considerada como el recurso más importante para la obtención de variación genética (Afkhami-Sarvestani et al., 2012; Van Tuyl y De Jeu, 2005). En efecto, los cruzamientos interespecíficos fueron herramientas básicas en programas de mejoramiento de cultivos tales como *Rosa*, *Chrysanthemum*, *Lilium*, *Gladiolus*, *Delphinium*, *Freesia*, *Hippeastrum* y *Alstroemeria*, entre otros (Datta, 2022). Si bien la hibridación se presenta como una técnica de gran aplicación, la obtención de híbridos interespecíficos, y en mayor medida intergenéricos, está muchas veces limitada por diferentes barreras de incompatibilidad que se establecen antes o después de la fecundación (De Souza et al., 2017). En cuanto a las barreras de prefecundación o precigóticas, Shivanna (2005) las clasifica considerando el lugar del gineceo donde se manifiesta la incompatibilidad: en la superficie del estigma, en el estilo y/o en el ovario/óvulo.

A su vez, entre las barreras de posfecundación o poscigóticas, la más común es el aborto del embrión híbrido en diferentes estadios de desarrollo (Bugallo, 2021).

Entre las técnicas para intentar superar las barreras poscigóticas, el rescate embrionario es una de las más utilizadas, donde la identificación

de los factores involucrados también resulta de suma importancia, siendo identificados, entre ellos, la presencia de genes letales, desarmonía genética en el embrión o fracaso del desarrollo del endosperma en etapas tempranas (Rogo et al., 2023; Shivanna, 2005).

En Solanaceae, se han identificado barreras que incluyen esterilidad masculina nucleocitoplasmática (Li et al., 2023), interacción estilo-tubo polínico (Liao et al., 2020) e interrupción del desarrollo del endosperma (Florez-Rueda, 2021).

Con respecto al endosperma, existen estudios que demuestran su rol esencial en el desarrollo de la semilla, tanto en la nutrición del embrión como fuente de señales requeridas en la embriogénesis (Köhler et al., 2021; Ali, 2016; Wolff et al., 2015). La interrupción del desarrollo del endosperma, en el género *Solanum*, ha sido señalada como mecanismo preventivo en la hibridación entre especies, las cuales están aisladas desde el punto de vista reproductivo (Florez-Rueda, 2021).

Teniendo en cuenta los cruzamientos entre plantas con diferentes niveles de ploidía, como es el caso de los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*, diversas hipótesis han sido propuestas para explicar la interrupción en el desarrollo del endosperma que se produce cuando los cruzamientos resultan incompatibles. La relación genómica materna:paterna 2:1 en el endosperma ha sido considerada una condición necesaria para el éxito en el desarrollo del endosperma

tanto en cruzamientos intraespecíficos como interespecíficos e intergenéricos (Alling et al., 2024). Sin embargo, aunque todos los casos de cruzamientos intraespecíficos con diferentes niveles de ploidía se ajustan a esta propuesta, parece no suceder del mismo modo con todos los cruzamientos interespecíficos e intergenéricos. Una causa aparente es la intervención de genes específicos en el desarrollo del endosperma de los híbridos, los cuales pueden tener diferentes valores o “fuerzas”, según las especies, sin tener en cuenta el nivel de ploidía (Masuelli y Camadro, 1997). De acuerdo con Köhler et al. (2021), para cada especie existe un número efectivo, es decir, el Balance del Número Endospermico (BNE), el cual no debe tener necesariamente una relación directa con el nivel de ploidía.

Es importante destacar que los estudios de embriogénesis y/o endospermogénesis en cruzamientos intergenéricos, el complejo sistema del BNE en niveles precigóticos y poscigóticos puede explicar el rol dentro de las barreras de incompatibilidad (Masuelli y Camadro, 1997). Estos estudios también proporcionan información valiosa para la aplicación precisa de técnicas de rescate embrionario, las cuales posibilitan el aislamiento de embriones o su transferencia a un medio nutritivo específico, para su crecimiento y diferenciación *in vitro* antes de que la semilla colapse (Thakur et al., 2024). Las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas al mejoramiento son utilizadas para sortear barreras posfecundación, causadas por la interrupción en el desarrollo del endosperma o por el aborto del embrión (Van Tuyl y De Jeu, 2005).

El rescate embrionario, como metodología para la obtención de híbridos, ha sido utilizado exitosamente en muchos cultivos ornamentales, siendo *Lilium* el género modelo en las técnicas de manipulación del estilo y de cultivo *in vitro* (Van Tuyl y De Jeu, 2005).

### Embriología de la familia Solanaceae

De acuerdo con Johri et al. (1992) los géneros estudiados hasta el momento en la familia Solanaceae presentan en común las siguientes características embriológicas: el óvulo es hemianátropo, anátropo o campilótropo, unitegumentado y tenuinucelar. El endotelio generalmente se diferencia en el estado 2-nuclear del saco embrionario, encontrando variaciones como: ausencia de este tejido en *Nicotiana tabacum* L. y presencia prominente en *Capsicum* (Bhojwani et al., 2015; Johri et al., 1992). En la nucela se diferencia una única arquéspora o varias. Una única célula funciona como célula madre de las megásporas, la cual por meiosis produce una tétrada lineal o en forma de “T”. La megáspora

calazal genera un gametofito de tipo *Polygonum*, es decir monospórico, 7-célular, 8-nucleado en la mayoría de los casos, pero en *Capsicum frutescens* L., *C. nigrum* Willd. y *C. pendulum* Willd., el saco embrionario es de tipo *Allium*, es decir bispórico 7-célular, 8-nucleado; las sinérgidas alargadas y las antípodas son efimeras (Bhojwani et al., 2015; Johri et al., 1992).

En el género *Solanum* la fecundación ocurre entre 24 y 48 h posteriores a la polinización. La primera división del núcleo endospermogénico se produce 48 h posteriores a la polinización y la división del cigoto ocurre aproximadamente, con el endosperma de 40 células (Bhojwani et al., 2015; Johri et al., 1992).

Los tres tipos de desarrollo de endosperma reportados en Solanaceae, por Johri et al. (1992), son: el tipo Celular, el cual se presenta como el más común, el tipo Nuclear que ocurre en *Salpiglossis picta* Sweet, *Scopolia atropoides* Schult. y *Schizanthus pinnatus* Ruiz y Pav. y el tipo Intermedio que se reporta en *Hyoscyamus orientalis* M.Bieb.

El desarrollo del embrión corresponde al tipo Solanaceae, en *Sclerophylax caducifructus* Di Fulvio, y de tipo Onagraceae, en *Capsicum annuum* L. (Johri et al., 1992).

Son escasos los trabajos sobre el desarrollo embrionario y del endosperma en el género *Petunia*. Según Sink (2013), la fecundación ocurre entre las 24 y 32 h luego de la polinización. La estructura del saco embrionario maduro se ajusta estrechamente al tipo comúnmente descrito para las Angiospermas. Después de la fertilización, el embrión presenta las siguientes etapas de desarrollo: globular, cordiforme, torpedo y embrión maduro. El endosperma es de tipo celular y persiste en el embrión maduro como tejido de almacenamiento de reservas (Rezanejad, 2008). Por otro lado, reportes sobre estudios de embriogénesis y endospermogénesis en el género *Calibrachoa* como en híbridos intergenéricos entre ambos géneros son limitados.

### Antecedentes de hibridaciones entre el género *Petunia* y *Calibrachoa*

En un trabajo anterior, publicado por Milicia et al. (2021), se realizaron cruzamientos intergenéricos entre cuatro especies correspondientes al género *Petunia*: *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell, *P. inflata* R.E. Fr., *P. interior* Ando & Hashim y *P. axillaris* subespecie *axillaris* (Lam.) Britton et al., y cuatro especies correspondientes al género *Calibrachoa*: *C. linoides* (Hook.), *C. ovalifolia* (Miers) Stehmann & Semir, *C. thymifolia* (A. St.-Hill.) Stehmann & Semir y *C. caesia* (Sendth.) Wijsmann, y dos variedades comerciales: *C. x hybrida* var. Kabloom blue y

*C. x hybrida* var. Kabloom yellow, y se evaluó el porcentaje de frutos obtenidos cada diez flores polinizadas. Las semillas híbridas obtenidas en dichos frutos fueron sembradas y germinó una sola de ellas, la cual dio origen a un híbrido entre *Petunia inflata* y *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow, denominado híbrido HPC (Milicia et al., 2021).

En este marco, los objetivos del presente trabajo fueron: conocer a nivel histológico la manifestación de la incompatibilidad en la combinación putativa de *Petunia inflata* x *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow, identificar durante el proceso de embriogénesis el momento oportuno para realizar rescates de embriones en aquellos cruzamientos que dieron origen a híbridos putativos y hallar el estadio de desarrollo del embrión y endosperma en el que se manifestó la incompatibilidad posgónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Observación de cortes histológicos y estudios de embriogénesis en semillas híbridas

Se realizaron cruzamientos dirigidos entre *Petunia inflata* R.E. Fr. y *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow, como parentales, para la obtención de híbridos puente cuando las flores se encontraban en estado de pimpollo. La emasculación fue realizada previa a la polinización; los pimpollos fueron abiertos con una pinza, extrayendo las anteras juntamente con la corola e inmediatamente fue depositado sobre el estigma polen fresco. Para cada combinación evaluada se efectuaron 10 cruzamientos. La especie de *Petunia* fue utilizada como parental femenino, mientras que la de *Calibrachoa* como parental masculino, debido a que presentan compatibilidad unilateral (Olschowski et al., 2012). Los cruzamientos fueron realizados en uno de los invernaderos tipo túnel del Instituto de Floricultura del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Argentina), Hurlingham (34°36' Sur, 58°40' Oeste) durante la primavera-verano del año 2018-2019.

Para la observación a través de cortes histológicos en semillas en desarrollo se realizaron inclusiones en parafina de frutos cosechados desde los 3 a los 10 días posteriores a la polinización (DPP). Para la fijación los frutos fueron conservados en un fijador a base de formol 10%, alcohol etílico 50%, ácido acético 5% y agua destilada 35% (FAA). Posteriormente, fueron sometidos a un proceso de deshidratación con una serie de soluciones ascendentes de alcohol etílico en agua desionizada (Tabla 1).

Finalizada la deshidratación, se procedió al aclarado progresivo del material en xilol (Tabla 2).

**Tabla 1. Proceso de deshidratación de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

**Table 1. Dehydration process of the fruits of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

Deshidratación	Horas
50% FAA / 50% alcohol 50°	12
Alcohol 50°	12
50% alcohol / 50% alcohol 60°	12
Alcohol 60°	12
50% alcohol 60° / 50% alcohol 70°	12
Alcohol 70°	12
50% alcohol 70° / 50% alcohol 80°	12
Alcohol 80°	12
50% alcohol 80° / 50% alcohol 96°	12
Alcohol 96°	12
50% alcohol 96° / 50% alcohol 100°	12
Alcohol 100°	12

**Tabla 2. Proceso de aclarado de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

**Table 2. Lightening process of the fruits of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

Aclarado	Horas
50% alcohol 100° / 50% xilol	8
Xilol puro	8

Luego del proceso de aclarado, se inició la inclusión de los materiales en parafina pura en escamas (56-58 °C) "tipo Paraplast" (Tabla 3). Para la inclusión se confeccionaron moldes formando pequeñas cajas de papel donde fueron ubicados los frutos en forma longitudinal.

Una vez solidificados se montaron individualmente sobre tacos de madera para su seccionamiento posterior.

Los cortes seriados histológicos fueron realizados con micrótopo rotativo vertical (marca Arcano, modelo KB-1508A, Jinhua, China) a un espesor de 12-15 µm.

Las secciones fueron adheridas sobre portaobjetos de vidrio con albumina de Meyer e inmediatamente se realizó el planchado de las cintas cortadas con una plancha calefactora a temperatura constante.

Luego de que las muestras se secaron a temperatura ambiente durante diez días, se llevó



**Tabla 3. Proceso de inclusión en parafina de los frutos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

**Table 3. Paraffin embedding process of the fruits of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow.**

Inclusión	Horas
50% xilol / 50% parafina	8
Parafina pura I	8
Parafina pura II	8

a cabo el desparafinado de los cortes. Este proceso se realizó en cajas de Coplin para posteriormente iniciar la coloración combinada doble sucesiva de safranina-fast green. Concluida la coloración, se montaron los preparados permanentes con bálsamo sintético (Álwik).

Las secciones de frutos obtenidos fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico Binocular "Biotraza" NLCD-307B, con cámara fotográfica integrada.

#### Corte manual de semillas maduras

A los 25 DPP se realizó la recolección de los frutos en estado de madurez previo a la dehiscencia. Las cápsulas fueron colocadas en cajas de Petri y rotuladas en función de cada cruzamiento realizado. Además, se tomaron muestras de semillas tanto de los cruzamientos intergenéricos como de los intraespecíficos

utilizados como testigo. Posteriormente, las semillas fueron hidratadas en agua durante 12 h y se realizaron cortes longitudinales bajo lupa (Lupa trinocular "Biotraza" XTD-317T), mediante una hoja flexible de afeitar y agujas histológicas. Las fotografías fueron tomadas acoplando a la lupa una cámara digital con puerto USB marca "Arcano".

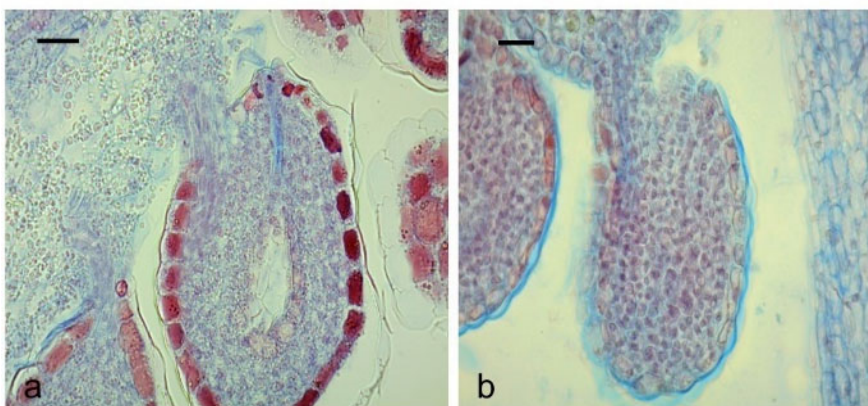
## RESULTADOS

#### Observación de cortes histológicos y estudios de embriogénesis en semillas híbridas

El gineceo de *Petunia inflata* presentó numerosos óvulos o rudimentos seminales anátropos, crasinucelados y bitementados (Fig. 1 a y b). Al igual que en otras Solanáceas el saco embrionario es de tipo *Polygonum* y consta, por lo tanto, de tres antípodas poco desarrolladas en la zona del extremo calazal, dos **núcleos polares en la región central**, dos sinérgidas y una ovocélula en el extremo micropilar.

La fecundación ocurrió entre los 2 y 3 días posteriores a la polinización (DPP), el tubo polínico penetró en el óvulo por la micrópila y liberó los núcleos gaméticos masculinos (Fig. 1a). Uno de ellos se unió a la ovocélula, dando lugar al cigoto diploide y el otro al núcleo polar secundario, originando el núcleo endospermogénico que es triploide.

Antes de que el cigoto comenzara a dividirse para formar el embrión, se observó que el núcleo endospermogénico sufrió varias divisiones sucesivas que conducirán a la formación del



**Fig. 1. Óvulos de *Petunia inflata* utilizada en los cruzamientos intergenéricos. a- Ingreso del tubo polínico de *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. b- Silueta del óvulo anátropo. Aumento: barras= 100  $\mu$ m.**

**Fig. 1. Ovules of *Petunia inflata* used in intergeneric crossings. a- Entry of the pollen tube of *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. b- Silhouette of the anatropous ovule. Increase: bar = 100  $\mu$ m.**

endosperma de tipo nuclear.

En los cruzamientos intergenéricos entre *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow, a partir de los 4 DPP se observó la presencia de cigotos en división al igual que se observan en el cruzamiento interespecífico testigo entre genotipos distintos de *P. inflata*. Entre los 3 y 4 DPP también se diferenciaron las células del

endotelio en ambos cruzamientos (Fig. 2).

5 DPP se observó, en el cruzamiento intergenérico como en el testigo, el proembrión, originado por divisiones del cigoto y, en el cual, se encuentran diferenciadas las células que darán origen al suspensor (Fig. 3).

Al mismo tiempo, el endosperma, en estado nuclear del cruzamiento entre *P. inflata* x *C. x*

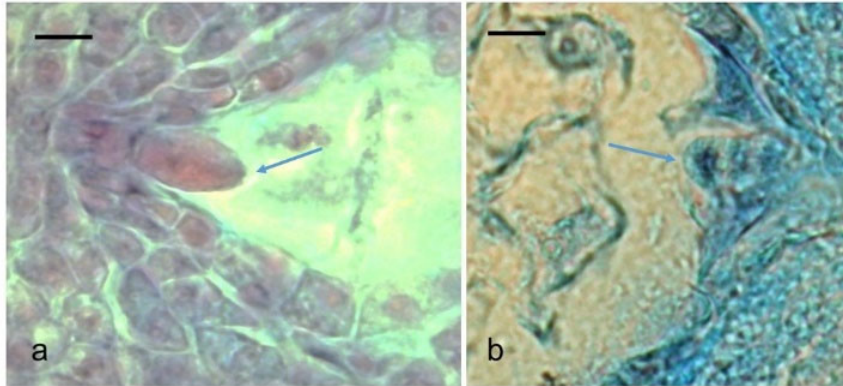


Fig. 2. Cigotos de *Petunia* a 4 días post polinización. a- Cigoto formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. b- Cigoto formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Aumento: barras = 10  $\mu$ m.

Fig. 2. *Petunia* zygotes 4 days after pollination. a- Zygote formed by crossing *Petunia inflata* x *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. b- Zygote formed by crossing *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Increase: bars = 10  $\mu$ m.

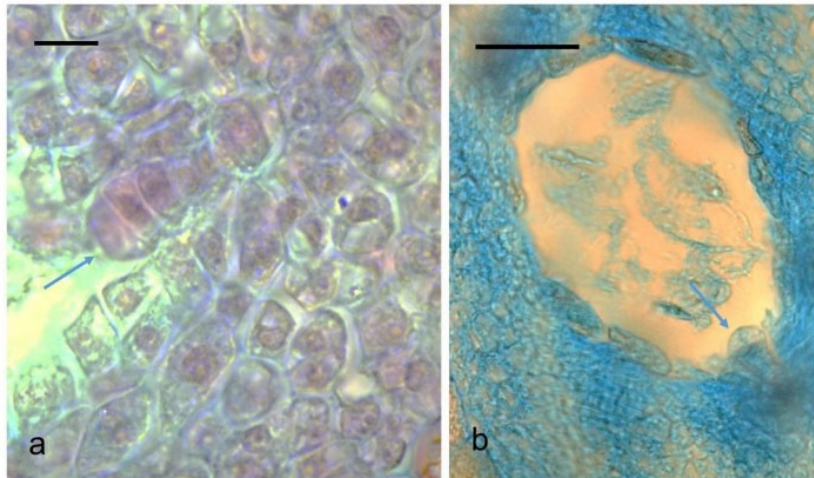


Fig. 3. Proembriones de *Petunia* a 5 días post polinización. a- Proembrión formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. Aumento: barra= 10  $\mu$ m. b- Proembrión formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Aumento: barra = 50  $\mu$ m.

Fig. 3. *Petunia* proembryos 5 days after pollination. a- Proembryo formed by crossing *Petunia inflata* x *Calibrachoa x hybrida* var. Kabloom yellow. Increase: bar = 10  $\mu$ m. b- Proembryo formed by crossing *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Increase: bar = 50  $\mu$ m.

*hybrida* var. Kabloom yellow, detuvo la división de los núcleos y no continuó su desarrollo, mientras que en el cruzamiento testigo sí continuó la división nuclear (Fig. 4).

6 DPP se observaron embriones degenerados en algunos óvulos fecundados y proembriones en otros, mientras que en el cruzamiento testigo se observaron embriones que continúan su crecimiento hacia el estado globular temprano (Fig. 5).

A los 7 DPP se observó la desaparición de

embriones en la zona micropilar de gran parte de los óvulos de los cruzamientos intergenéricos y la desorganización de las células que conforman el endotelio (Fig. 6).

En los cruzamientos testigo continuó el crecimiento del embrión globular que presentó 80  $\mu\text{m}$  de longitud, incluyendo el suspensor, por 60  $\mu\text{m}$  de diámetro en la zona globular. Se observó celularización de los núcleos del endosperma y acumulación de sustancias de reserva en las células que conforman el endosperma de tipo celular. El

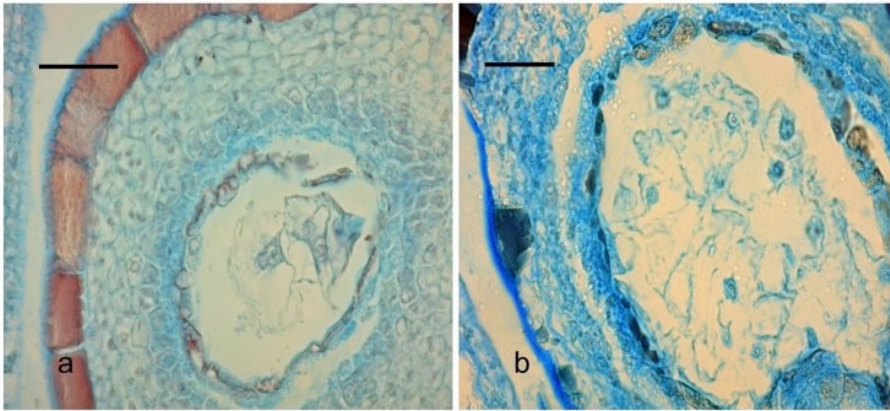


Fig. 4. Endospermas de *Petunia* utilizadas en los cruzamientos a 5 días post polinización. a- Endosperma formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow. b- Endosperma formado por el cruzamiento de *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Aumento: barras = 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 4. *Petunia* endosperms used in crosses 5 days after pollination. a- Endosperm formed by the crossing of *Petunia inflata* x *Calibrachoa* x *hybrida* var. Kabloom yellow. b- Endosperm formed by the crossing of *Petunia inflata* x *Petunia inflata*. Increase: bars = 50  $\mu\text{m}$ .

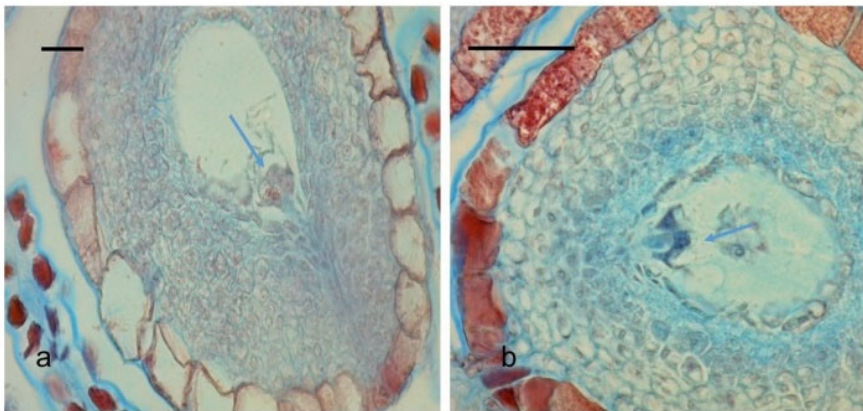


Fig. 5. Embriones y proembriones de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 6 DPP. a- Embrión degenerado. Aumento: barra= 100  $\mu\text{m}$ . b- Proembrión. Aumento: barra= 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 5. Embryos and proembryos of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow at 6 DPP. a- Degenerated embryo. Increase: bar = 100  $\mu\text{m}$ . b- Proembryo. Increase: bar = 50  $\mu\text{m}$ .



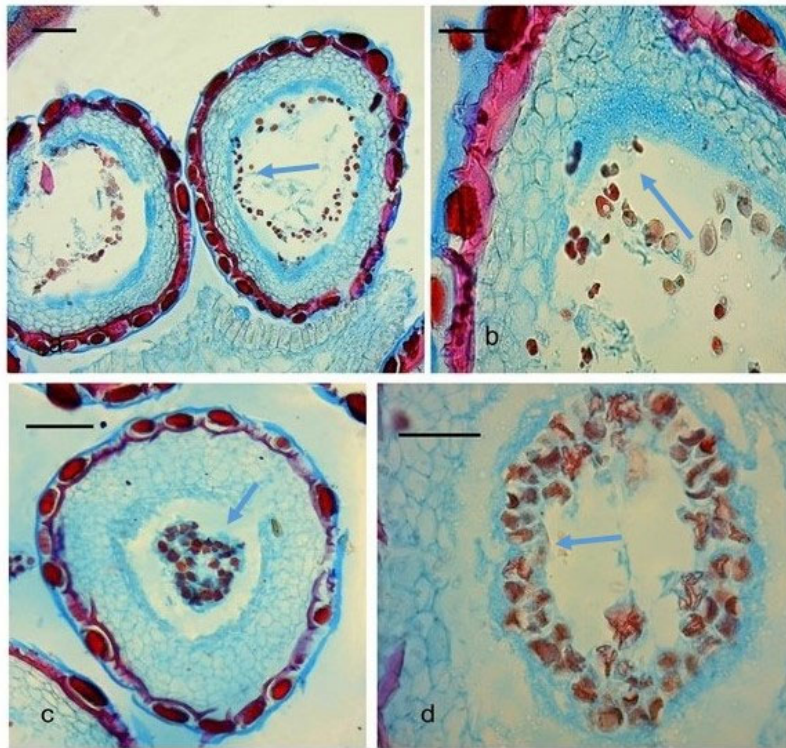


Fig. 6. Óvulos fecundados de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 7 DPP. a- Endotelio desorganizado. Aumento: barra = 100  $\mu\text{m}$ . b- Ausencia de embriones en zona micropilar. Aumento: barra = 50  $\mu\text{m}$ . c y d- vista superficial del endotelio desorganizado. c: Aumento: barra = 100  $\mu\text{m}$ . d: Aumento: barra = 50  $\mu\text{m}$ .

Fig. 6. Fertilized eggs of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow at 7 DPP. a- Disorganized endothelium. Increase: bar = 100  $\mu\text{m}$ . b- Absence of embryos in the micropylar area. Increase: bar = 50  $\mu\text{m}$ . c and d- surface view of the disorganized endothelium. c: Increase: bar = 100  $\mu\text{m}$ . d: Increase: bar = 50  $\mu\text{m}$ .

endotelio se mantuvo conservado (Fig. 7).

Entre los 8 y 10 DPP no se observaron mayores cambios en la anatomía interna de la mayoría de los óvulos fecundados en los cruzamientos intergenéricos, pero se destaca el endurecimiento de los tegumentos. Excepcionalmente se observaron algunos óvulos con embriones con forma asincrónica a los 10 DPP sin observarse presencia de endosperma celular (Fig. 8).

En los cruzamientos testigo se pudieron apreciar embriones en estado globular, transformándose a estado de corazón entre los 8 y 9 DPP y embriones en estado de torpedo a los 10 DPP. El endosperma se encuentra celularizado y el endotelio se desorganizó a los 10 DPP (Fig. 9).

#### Cortes de semillas maduras

A los 25 DPP las semillas se encontraron maduras tanto en los cruzamientos intergenéricos

como en los intraespecíficos utilizados como testigo. Ambas presentaron aspecto externo similar, con forma esferoidal algo angulosa y el tegumento externo con presencia de células epidérmicas que forman un arreglo isomorfológico con hexágonos, limitados por los relieves marginales de las células. Las semillas embebidas tuvieron un diámetro aproximado de 600  $\mu\text{m}$  (Fig. 10).

Los cortes longitudinales de las semillas formadas en los cruzamientos intergenéricos involucrados en este trabajo mostraron gran número de semillas vanas, es decir, solamente con desarrollo del tegumento y ausencia de embrión y endosperma (Fig. 11).

En los cruzamientos testigo, además del tegumento, se observó la presencia del embrión de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de longitud y del endosperma desarrollado (Fig. 12).



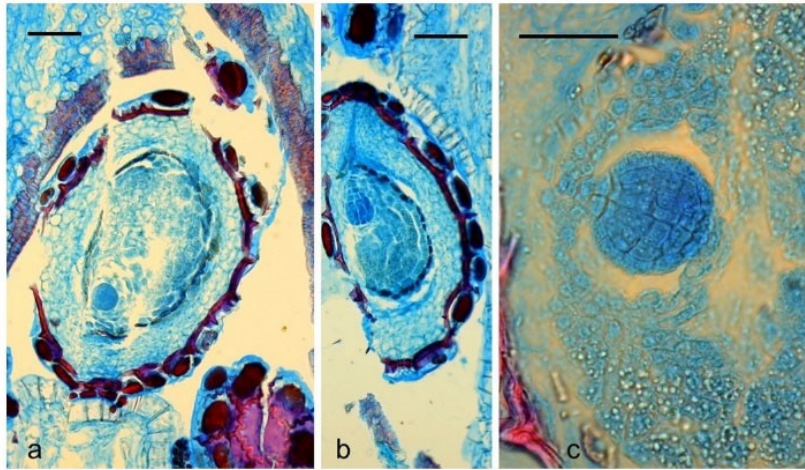


Fig. 7. Desarrollo de embriones y endosperma en óvulos fecundados de *P. inflata* x *P. inflata* a 7 DPP. a- Embrión globular con endosperma en celularización. Aumento: barra = 100  $\mu$ m. b- Embrión medido. Aumento: barra = 100  $\mu$ m. c- Células del endosperma con acumulación de sustancias de reservas. Aumento: barra = 50  $\mu$ m.

Fig. 7. Development of embryos and endosperm in fertilized ovules of *P. inflata* x *P. inflata* at 7 DPP. a- Globular embryo with endosperm in cellularization. Increase: bar = 100  $\mu$ m. b- Measured embryo. Increase: bar = 100  $\mu$ m. c- Endosperm cells with accumulation of reserve substances. Increase: bar = 50  $\mu$ m.

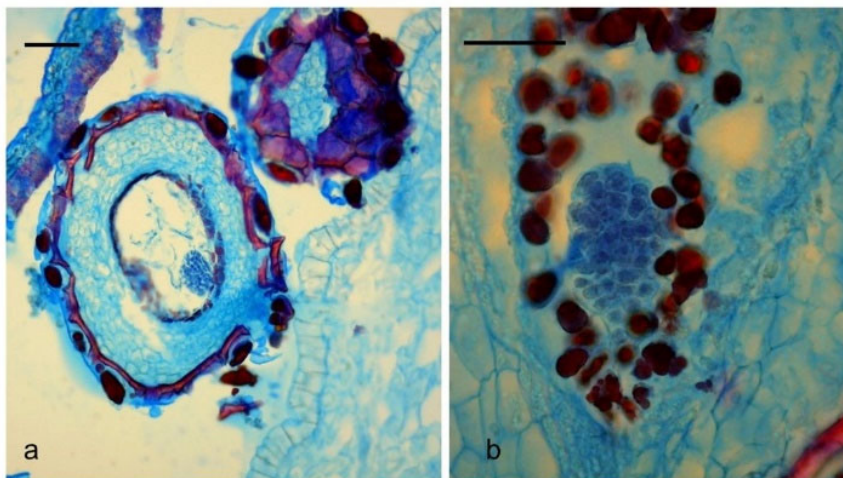


Fig. 8 a-b. Embriones observados excepcionalmente en cruzamientos de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a 10 DPP. a- Aumento: barra = 100  $\mu$ m. b- Aumento: barra = 50  $\mu$ m.

Fig. 8 a-b. Embryos observed exceptionally in crosses of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow at 10 DPP. a- Increase: bar = 100  $\mu$ m. b- Increase: bar = 50  $\mu$ m.

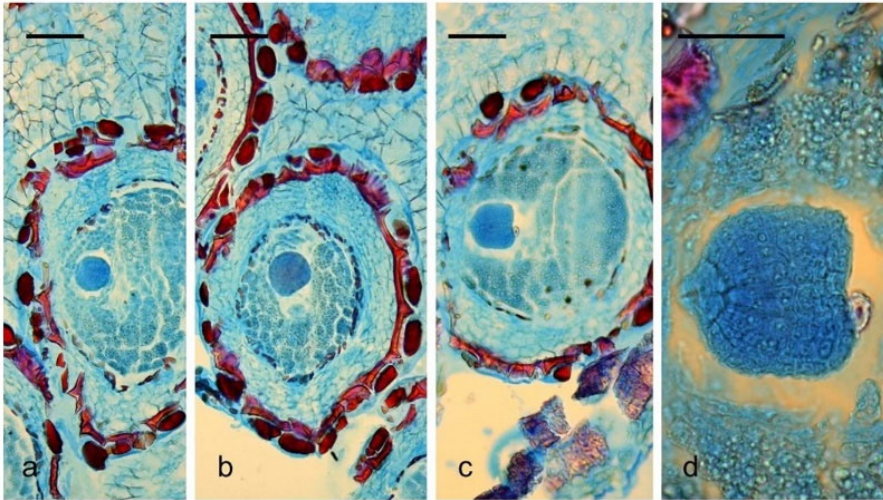


Fig. 9 a-b-c-d. Embriones observados en cruzamientos de *P. inflata* x *P. inflata* entre los 8 y 9 DPP. a-b-c = Aumento: barra = 100  $\mu$ m. d- Aumento: barra = 50  $\mu$ m.

Fig. 9 a-b-c-d. Embryos observed in crosses of *P. inflata* x *P. inflata* between 8 and 9 DPP. a-b-c = Increase: bar = 100  $\mu$ m. d- Increase: bar = 50  $\mu$ m.

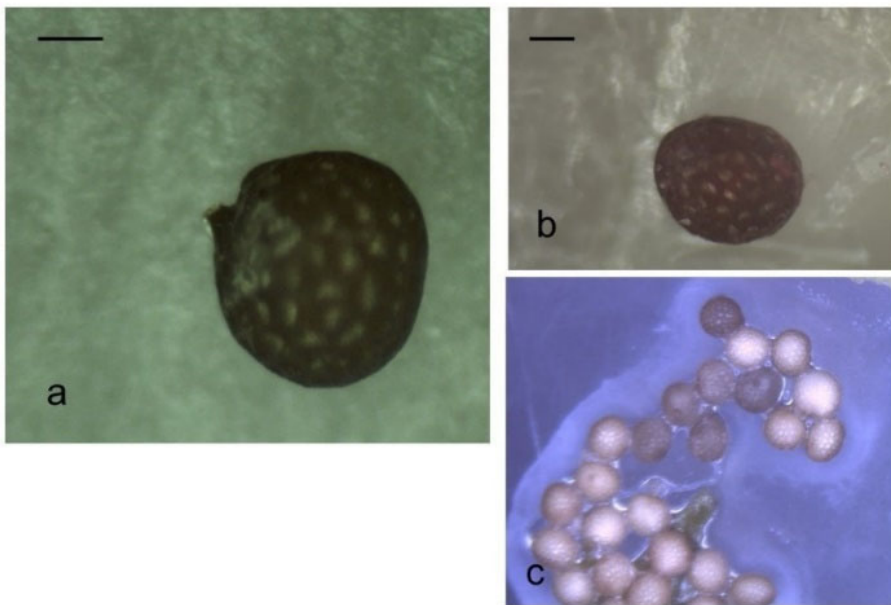


Fig. 10 a. Semilla madura hidratada obtenida en el cruzamiento de *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow a los 25 DPP. b-c: Semillas maduras hidratadas obtenidas en cruzamientos de *P. inflata* x *P. inflata* a los 25 DPP. Aumento: barras= 100  $\mu$ m.

Fig. 10 a. Mature hydrated seed obtained from the cross of *P. inflata* x *C. x hybrida* var. Kabloom yellow at 25 DPP. b-c: Mature hydrated seeds obtained from crosses of *P. inflata* x *P. inflata* at 25 DPP. Increase: bar = 100  $\mu$ m.



Fig. 11. Tegumento de semillas híbridas obtenidas en los cruzamientos intergenéricos entre las distintas especies de *Petunia* y *Calibrachoa* que formaron frutos en el presente trabajo a los 25 DPP. Aumento: barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 11. Tegument of hybrid seeds obtained in intergeneric crossings between the different species of *Petunia* and *Calibrachoa* that formed fruits in the present work at 25 DPP. Increase: bar = 100  $\mu\text{m}$ .



Fig. 12. Corte longitudinal de semillas obtenidas en los cruzamientos intraespecíficos testigo entre las distintas especies de *Petunia* a los 25 DPP. Aumento: barra = 100  $\mu\text{m}$ .

Fig. 12. Longitudinal section of seeds obtained from intraspecific control crosses between the different *Petunia* species at 25 DPP. Increase: bar = 100  $\mu\text{m}$ .



## DISCUSIÓN

En las observaciones realizadas en el presente estudio, las combinaciones incompatibles presentaron anomalías en el desarrollo, tanto del embrión como del endosperma. El endosperma, cuyo desarrollo en los cruzamientos incompatibles sigue los mismos estadios que los cruzamientos compatibles hasta el 5 DPP, interrumpe su crecimiento en los cruzamientos intergenéricos y a esta interrupción le sucede el aborto del embrión. Un proceso similar fue detectado en cruzamientos interespecíficos entre diferentes especies del género *Fagopyrum*, donde se encontraron varias anomalías (Woo et al., 2008). Dentro de la familia Solanáceas, híbridos interespecíficos como *Solanum incanum* L. y *Solanum pinnatisectum* L., presentaron el saco embrionario gravemente distorsionado e irregular y no se observó evidencia de ningún embrión a los 6 DPP, a pesar de búsquedas diligentes de secciones seriadas de numerosos óvulos (Lester y Kang, 1998). En concordancia con ello, se encontraron resultados similares en los cortes histológicos de los cruzamientos entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom yellow, donde, a partir de los 7 DPP, no se observan embriones en desarrollo. En este sentido, aunque es conocida la importancia del endosperma como reserva de nutrientes en las semillas de Angiospermas, su significado durante la embriogénesis no debe ser descuidado (Doll y Ingram, 2022).

El endosperma tiene un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de un medio adecuado para el crecimiento de los jóvenes embriones, proporcionando alimento y otras condiciones esenciales para el crecimiento y diferenciación del cigoto (An et al., 2020). La interrupción del desarrollo del endosperma podría ser ocasionada por un desbalance en la relación genómica del mismo (Städler et al., 2021; Dinu et al., 2005), considerando al género *Petunia* ( $2n=2x=14$ ) y *Calibrachoa* ( $2n=2x=18$ ) (Pezzi et al., 2024). Desbalances de este tipo son descriptos por Masuelli y Camadro (1995, 1997) en cruzamientos interespecíficos de especies salvajes del género *Solanum*, donde el BNE posee un rol principal en la interrupción del desarrollo del endosperma.

Durante tiempo se ha reconocido que la producción exitosa de semillas de híbridos interespecíficos e intergenéricos depende no sólo de la compatibilidad de los dos genomas parentales combinados en el embrión híbrido, sino también de alguna manera de las interacciones entre estos genomas en el endosperma, entre el embrión y el endosperma, y posiblemente, incluso, con el tejido esporofítico en los óvulos (Städler et al., 2021). Al respecto, la relación

genómica materna:paterna (2:1) en el endosperma ha sido considerada una condición necesaria para el éxito del desarrollo del endosperma (Köhler et al., 2021). La viabilidad de las semillas no siempre depende directamente del nivel de ploidía; de hecho, se ha postulado que son dos o tres genes los responsables del sistema BNE (Lafon-Placette et al., 2018). Aún más, Masuelli y Camadro (1995) reportan que el desbalance endospermico está dado por “fuerzas” (o valores) características de cada especie, pudiendo estar relacionado con la carga alélica o el número de genes involucrados. Esta hipótesis del BNE ha resultado útil, tanto en complicadas hibridaciones interespecíficas, que involucran varios niveles de ploidía, como también para postular la posible evolución de las papas silvestres en todo México y América del Sur. Sin embargo, para algunos investigadores existen ciertas inconsistencias en esta hipótesis, debido a que no tiene la capacidad de capturar y categorizar completamente las complejas y matizadas barreras de hibridación poscigóticas que resultan en la falla del endospermo (Behling et al., 2023).

Por el contrario, la desintegración del endosperma y del embrión podría haberse debido a la autólisis celular, considerando que en las primeras etapas de desarrollo puede haber un crecimiento normal y semanas después de la polinización, en la fase embrionaria globular temprana, el endosperma y luego el embrión se autodegradan (Daunay et al., 2019). Esto podría explicarse considerando que el desarrollo del embrión puede ser controlado por el endosperma, donde se producirían diferentes reguladores de crecimiento u otras moléculas mensajeras, así como sustancias alimenticias. Las vías biosintéticas para producir estas moléculas dependen de enzimas diferentes, producidas en distintas etapas. Asimismo, nuevas moléculas de ARN mensajero y proteínas son producidas y las antiguas se descomponen en procesos que involucran un control genético bioquímico, para la producción y control de proteasas y nucleasas (Andrade Buono et al., 2019). Sin embargo, en los híbridos interespecíficos e intergenéricos los diferentes mecanismos de control de ambos padres se mezclan dentro del mismo núcleo del endosperma y, si estos mecanismos son incompatibles, puede ser que se pierda el control adecuado de la producción y ubicación de nucleasas y proteasas, y puede haber producción en exceso cuando el control de la biosíntesis no está adecuadamente coordinado por los núcleos híbridos que presentan desequilibrios genéticos (Valandro et al., 2020), causando así, la digestión no deseada de las células que componen el embrión, como se observa en este trabajo y o

también en el endosperma (Zhou et al., 2021; Lester y Kang, 1998).

En este sentido, actuales investigaciones sostienen el concepto de muerte celular programada (MCP). La MCP es un proceso activado y accionado por la propia célula, organizado a nivel genético y bioquímico. Esto implica que las células conservan los mecanismos moleculares requeridos para llevar a cabo su propia destrucción (Locato y De Cara, 2018).

La eliminación selectiva de las células por MCP en la embriogénesis incompatible representa una estrategia para impedir la propagación de características genéticas negativas en la progeñe (Locato y De Cara, 2018). Se podría asumir que procesos semejantes podrían regir la degradación de la mayoría de los embriones en los cruzamientos entre los géneros *Petunia* y *Calibrachoa*.

En cuanto al endotelio, en los cruzamientos intergenéricos realizados en el presente trabajo se observó una degradación anticipada, lo cual podría deberse a mecanismos de MCP. En este sentido, Andème Ondzighi et al. (2008) estudiaron la influencia de la proteína disulfuro isomerasa 5 (PDI5) en la MCP de las células endoteliales en *Arabidopsis*.

La pérdida de PDI5 conduce a la iniciación prematura de la MCP en las células endoteliales durante desarrollo del embrión y a la obtención de menos semillas viables (Andème Ondzighi et al., 2008).

En base a que una de las semillas híbridas del cruzamiento entre *P. inflata* y *C. x hybrida* var. Kabloom Yellow, esta completó su desarrollo y germinó formando una plántula que dio origen al híbrido HPC y, que embriones híbridos dentro de óvulos fecundados que no contenían endosperma normal continuaron desarrollándose durante 5 días adicionales, podría sugerirse que la técnica de rescate embrionario sería de utilidad para superar barreras reproductivas e incrementar el número de híbridos puente obtenido. Sin embargo, para facilitar el rescate embrionario debe ser determinado el momento adecuado para iniciar el proceso. Esto se puede lograr mediante la determinación del momento en que el embrión híbrido detiene su desarrollo o el momento en que el embrión degenera, así como el número de embriones sobrevivientes y la posibilidad técnica de extirpar los embriones jóvenes. En el caso de los embriones del cruzamiento entre *Petunia* y *Calibrachoa* debería iniciarse a los 5 DPP. De manera similar, Wakizuka y Nakajima (1975) encontraron en *Petunia hybrida* que el 42 y 64% de los embriones de óvulos cultivados luego de 3 y 4 DPP se desarrollaron normalmente, mientras que el 11% de los embriones desarrolló

luego de 2 DPP.

Las semillas cortadas de los cruzamientos intergenéricos involucrados en este estudio sólo presentaron el tegumento seminal desarrollado, similar al resultado logrado por Manrique et al. (2014), trabajando con diferentes accesiones de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob., donde obtuvieron 100% de semillas vacías en los cruzamientos dirigidos, debido al aborto del embrión y del endosperma.

Otros estudios realizados en cruzamientos interespecíficos entre *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose y *H. undatus* produjeron semillas viables y vanas. La formación de semillas vanas se adjudica a la disfunción del endosperma que actúa como barrera poscigótica. Esto permite solamente el desarrollo normal de la cubierta de las semillas sin desarrollo del embrión y del endosperma (Cisneos et al., 2011).

A partir de estas consideraciones, se podría asumir que la desintegración del endosperma y del embrión y la formación de semillas vacías, podría regirse por procesos de autólisis celular iniciados en la fase embrionaria globular temprana (Daunay et al., 2019).

## CONCLUSIONES

La identificación de cruzamientos intergenéricos con alto porcentaje de fructificación abrió una ventana hacia importantes estudios sobre el desarrollo de los embriones híbridos. En estos, la incompatibilidad se manifiesta a través de la eliminación selectiva de células por muerte celular programada durante la embriogénesis, lo cual lleva a la autólisis de los embriones y del endosperma, culminando en la formación de semillas vanas.

El desarrollo embrionario evaluado permitió conocer el momento oportuno para aplicar técnicas de rescate de embriones con miras a aumentar el número de plantas híbridas puente. De esta manera el rescate de proembriones a los 5 DPP podría ser una de las técnicas alternativas para superar barreras reproductivas de incompatibilidad poscigótica e incrementar el número de plantas puente entre *Petunia* y *Calibrachoa*.

## LITERATURA CITADA

Afkhami-Sarvestani, R., M. Serek and T. Winkelmann. 2012. Interspecific crosses within the *Streptocarpus* subgenus *Streptocarpella* and intergeneric crosses between *Streptocarpella* and *Saintpaulia ionantha* genotypes. *Scientia horticultrae* 148:215-222.

- Ali, M. 2016. Endosperm-based postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* and *Capsella*. Plant Biology Master's program. <http://stud.epsilon.slu.se>
- Alling, R. M., K. Bjerkan, J. Bramsiede, M. Nowak, A. Gustafsson, C. Brochmann, et al. 2024. Low parental conflict, no endosperm hybrid barriers, and maternal bias in genomic imprinting in selfing *Draba* species. bioRxiv 2024-01. <https://doi.org/10.1101/2024.01.08.574548>
- An, L., Y. Tao, H. Chen, M. He, F. Xiao, G. Li, et al. 2020. Embryo-endosperm interaction and its agronomic relevance to rice quality. *Frontiers in Plant Science* 11:587-641.
- Andrade Buono, R., R. Hudecek and M. Nowack. 2019. Plant proteases during developmental programmed cell death. *Journal of Experimental Botany* 70(7): 2097-2112.
- Andème Ondzighi, C., D. Christopher, E. J. Cho, S. C. Chang, and L. Staehelin. 2008. *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *The Plant Cell* 20(8):2205-2220.
- Behling, W., J. Coombs, P. Collins, and D. Douches. 2023. An Analysis of inter-endosperm balance number crosses with the wild potato *Solanum verrucosum*. *American Journal of Potato Research* 1-11.
- Bhojwani, S., S. P. Bhatnagar and P. K. Dantu. 2015. *The embryology of Angyosperms*. Vikas Publishing House. India.
- Bugallo, V. y G. R. Facciuto. 2021. Barreras de aislamiento reproductivo e hibridación interespecífica en el mejoramiento de *Passiflora* en la Argentina. Ediciones INTA. Instituto de Floricultura. Buenos Aires. Argentina.
- Cisneros, A., R. Garcia, and N. Tel-Zur. 2011. Ovule morphology, embryogenesis and seed development in three *Hylocereus* species (Cactaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 206(12):1076-1084.
- Datta, S. K. 2022. Breeding of ornamentals: Success and technological status. *The Nucleus* 65(1):107-128.
- Daunay, M., J. Salinier and X. Aubriot. 2019. Crossability and diversity of eggplants and their wild relatives. p. 135-191. In *The Eggplant Genome*. Springer, Cham.
- De Souza, E., L. Versieux, F. Souza, M. Rossi, M. Pereira de Carvalho Costa, and A. Pinheiro Martinelli. 2017. Interspecific and intergeneric hybridization in Bromeliaceae and their relationships to breeding systems. *Scientia Horticulturae* 223:53-61.
- Dinu I., R. Hayes, R. Kynast, R. Phillips, and C. Thill. 2005. Novel interseries hybrids in *Solanum*, section Petota. *Theoretical and Applied Genetic* 110:403-415.
- Doll, N., and G. Ingram. 2022. Embryo-Endosperm Interactions. *Annual Review of Plant Biology* 73.
- Florez-Rueda, A., F. Fiscalini, M. Roth, U. Grossniklaus and T. Städler. 2021. Endosperm and seed transcriptomes reveal possible roles for small RNA pathways in wild tomato hybrid seed failure. *Genome Biology and Evolution* 13(8):evab107.
- Johri, B.M., K.B. Ambegaokar and P.S. Srivastava. 1992. *Comparative embryology of angiosperms vol. 1/2*. Springer Science & Business Media.
- Köhler, C., K. Dziasek and G. Del Toro-De León. 2021. Postzygotic reproductive isolation established in the endosperm: mechanisms, drivers and relevance. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biology* 376 (1826).
- Lafon-Placette C., M.R. Hatorangan, K. A. Steige, A. Cornille, M. Lascoux, T. Slotte, and C. Köhler. 2018. Paternally expressed imprinted genes associate with hybridization barriers in *Capsella*. *Nature Plants* 4:352-357.
- Lester, R., and J. H. Kang. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany* 82(4):445-453.
- Li, J., M. Li, W. Wang, D. Wang, Y. Hu, Y. Zhang, and X. Zhang. 2023. Morphological and physiological mechanism of cytoplasmic inheritance stigma exertion trait expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Science* 326:111528.
- Locato, V., and L. De Gara. 2018. Programmed cell death in plants: an overview. *Plant Programmed Cell Death* 1-8.
- Manrique, I., R. Gonzales, A. Valladolid, R. Blas y L. Lizárraga. 2014. Producción de semillas en yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) mediante técnicas de polinización controladas. *Ecología aplicada* 13(2):135-145.
- Masuelli, R. W., and E. L. Camadro. 1995. A genetic model for the endosperm balance number (EBN) in the wild potato *Solanum acaule* Bitt. and two related diploid species. *Sexual Plant Reproduction* 8:283-288.
- Masuelli, R. W., and E. L. Camarro. 1997. Crossability relationships among wild potato species with different ploidies and Endosperm Balance Numbers (EBN). *Euphytica* 94:227-235.



- Milicia, V., M. F. Rodríguez, J. C. Hagiwara y M. S. Soto. 2021. Utilización de plantas puente en el mejoramiento del complejo *Calibrachoa* – *Petunia*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 37(2):136-150.
- Olschowski, S., L. Meyer, V. Mubmann, and M. Serek. 2012. Investigation of crossing barriers between *Calibrachoa* and *Petunia* species. In *II All Africa Horticulture Congress 1007*:765-769.
- Pezzi, P. H., L. Wheeler, L. Freitas, and S. Smith. 2024. Incomplete lineage sorting and hybridization as drivers of tree discordance in *Petunia* and related genera (Petunieae, Solanaceae). <https://ecoevorxiv.org/repository/view/6889/>
- Rezanejad, F. 2008. Development of ovule, female gametophyte, embryo and endosperm in *Petunia hybrid grandiflora*. 57-66. *Research Journal of University of Isfahan "Science"* 31(2): 57-66.
- Rogo, U., M. Fambrini, and C. Pugliesi. 2023. Embryo rescue in plant breeding. *Plants* 12(17): 3106.
- Städler, T., A. Florez-Rueda, and M. Roth. 2021. A revival of effective ploidy: the asymmetry of parental roles in endosperm-based hybridization barriers. *Current Opinion in Plant Biology* 61:102015.
- Shivanna, K. 2005. Barriers to hybridization. In: K. R. Shivanna. *Pollen Biotechnology for crop production and improvement*, Cambridge, Cambridge University Press, 261-272.
- Thakur, A., S. Kumari, and A. Baldaniya. 2024. Embryo rescue techniques in horticultural crops. *Vigyan Varta* 5(1): 301-304.
- Valandro, F., P. Menguer, C. Cabreira-Cagliari, M. Margis-Pinheiro, and A. Cagliari. 2020. Programmed cell death (PCD) control in plants: New insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome. *Plant Science* 299:110603.
- Wakizuka, T., and T. Nakajima. 1975. Development of proembryo in cultured ovules of *Petunia hybrida* Vilm. *Japanese Journal of Breeding* 25(3):161-167.
- Wolff, P., H. Jiang, G. Wang, J. Santos-Gonzalez, and C. Köhler. 2015. Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4: e10074.
- Zhou, X., P. Zhao, and M. X. Sun. 2021. Autophagy in sexual plant reproduction: new insights. *Journal of Experimental Botany* 72(22):7658-7667.