

RELACIÓN TUBO POLÍNICO/PISTILO EN CRUZAMIENTOS INTERESPECÍFICOS EN EL GÉNERO *Nierembergia* (SOLANACEAE)

RELATIONSHIP BETWEEN POLLEN TUBE/PISTIL IN INTERSPECIFIC CROSSES IN *Nierembergia* GENUS (SOLANACEAE)

Víctor José Milicia^{1*}, María Andrea Coviella², Gabriela Facciuto², y María Silvina Soto²

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora, Ruta Provincial N° 4, km 2, C.P. (1832), Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Floricultura, Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Nicolas Repetto y de los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Argentina.

* Autor para correspondencia E-mail: victormilicia@hotmail.com

RESUMEN

Se estudió la relación estigma-polen/estilo-tubo polínico (EPETP) en cruzamientos interespecíficos recíprocos entre *N. linariaefolia*, *N. ericoides*, *N. scoparia*, *N. aristata*, *N. veitichii*, y *N. calycina*, con el objetivo de identificar cruzamientos compatibles para la obtención de híbridos como herramientas del mejoramiento. Para ello se colectaron pistilos 24 horas post-polinización (PP). Los materiales fueron observados con microscopía de fluorescencia utilizando azul de anilina como tinción. Para la evaluación del crecimiento de tubos polínicos en pistilos se consideró la distancia recorrida por los tubos y la cantidad de tubos en diferentes porciones del estilo. El estudio de EPETP permitió corroborar que la incompatibilidad en muchas de las especies pertenecientes al género *Nierembergia* se expresa en el estilo, inhibiendo el crecimiento del tubo polínico en diferentes niveles del mismo. Los cruzamientos *N. scoparia* x *N. ericoides*; *N. aristata* x *N. veitichii*, *N. linariaefolia* x *N. scoparia*, *N. linariaefolia* x *N. ericoides* y sus recíprocos fueron detectados como los putativos para la obtención de híbridos interespecíficos. Estos cruzamientos fueron los únicos donde se observaron tubos polínicos penetrando la micrópila de los óvulos.

Palabras claves: mejoramiento, híbridos, relación estigma-polen/estilo-tubo polínico, incompatibilidad pre-cigótica.

ABSTRACT

The relationship between stigma-pollen/style-pollen tube (EPETP) was studied in reciprocal interspecific crosses between *N. linariaefolia*, *N. ericoides*, *N. scoparia*, *N. aristata*, *N. veitichii* and *N. calycina* in order to identify compatible crosses to obtain hybrids as a tool for ornamental breeding programs. Pistils were collected 24 hours post-pollination (PP). The materials were examined by fluorescence microscopy and stained with aniline blue. Pollen tube growth in the pistils was evaluated based on the distance traveled by the tubes and the number of tubes in different portions of the style. The EPETP study confirmed that the inconsistency in many species that belong to the genus *Nierembergia* is expressed in the style, inhibiting the growth of the pollen tube at different levels of it. Crosses between *N. scoparia* x *N. ericoides*, *N. aristata* x *N. veitichii*, *N. linariaefolia* x *N. scoparia*, *N. linariaefolia* x *N. ericoides* and their reciprocals were detected as

putative parents to obtain interspecific hybrids. These were the only crosses in which pollen tubes were observed penetrating the micropyle of the ovules.

Key words: breeding, hybrid, relationship stigma-pollen/style-pollen tube, pre-cigotic incompatibility.

INTRODUCCIÓN

El género *Nierembergia* (Solanaceae) comprende alrededor de 20 especies, todas ellas nativas de Sudamérica, excepto una de origen mejicano (Cocucci y Hunziker, 1995). El centro de distribución está en Argentina, con 15 especies, muchas de las cuales tienen valor ornamental por el color y la vistosidad de sus flores, y el largo período de floración, entre otras características (Shizukawa y Mii, 1997).

En la Argentina, el mejoramiento del género *Nierembergia*, desde el punto de vista ornamental, comienza en el año 1999 en el Instituto de Floricultura (IF) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, en el marco del Proyecto "Desarrollo de la Floricultura en la Argentina" (Suárez et al., 2003). Como resultado en el año 2000 se obtuvieron dos variedades que fueron registradas en el Registro Nacional de Cultivares del Instituto Nacional de Semillas (INASE), 'Luna INTA-JICA' y 'Estrella INTA-JICA' (Soto et al., 2004). Durante la primera etapa de mejoramiento se trabajó con la variabilidad intraespecífica presente en *N. linariaefolia*. Posteriormente, la búsqueda de mayor variabilidad llevó a la incorporación de la hibridación interespecífica como herramienta del mejoramiento. A partir de este momento se comienza con estudios vinculados a la identificación de barreras de incompatibilidad y técnicas para poder superarlas (Van Tuyl y De Jeu, 2005).

Las Angiospermas han desarrollado diferentes mecanismos a partir de los cuales los granos de polen deseables son discriminados de los no deseables (Wheeler et al., 2001). Un mecanismo es la incompatibilidad intraespecífica, generalmente referida a la auto-incompatibilidad, donde el polen si bien es originado de la misma especie receptora, es rechazado por la gran similitud debido a su origen en la misma planta o en plantas genéticamente muy cercanas (Clark et al., 1990). Otro mecanismo se da en la incompatibilidad interespecífica, donde el polen es rechazado por la gran disimilitud genética entre la especie dadora y la especie receptora (Wheeler et al., 2001).

Un mecanismo estudiado en la incompatibilidad interespecífica, es la imposibilidad del polen de nutrirse desde la matriz extracelular del tejido materno (Shivanna y Johri, 1985). En muchos casos, los nutrientes presentes en el polen no son suficientes para generar todas las sustancias necesarias para el crecimiento del tubo hasta los óvulos

(Heslop-Harrison et al., 1984). Por otro lado, considerando que en Solanaceae el sistema de auto-incompatibilidad gametofítica se pone de manifiesto a lo largo del estilo (Lush y Clarke, 1997) y también que similares procesos podrían regir la incompatibilidad interespecífica (Liedl y Anderson, 1994), es lógico pensar que ambos procesos de reconocimiento podrían ser similares.

En este trabajo se estudió la relación Estigma-Polen/Estilo-Tubo polínico (EPETP) en cruzamientos dirigidos entre especies pertenecientes al género *Nierembergia* con el objetivo de establecer el grado de compatibilidad pre-cigóticas y poder detectar las combinaciones putativas más exitosas en la obtención de híbridos interespecíficos para ser usados en el programa de mejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el IF INTA-Castelar (34°36' Sur, 58°40' Oeste), Argentina, durante la primavera del año 2012.

Se realizaron cruzamientos interespecíficos recíprocos entre clones selectos por su aptitud ornamental de seis especies del género *Nierembergia*. Las plantas utilizadas para las polinizaciones fueron obtenidas de poblaciones recolectadas en distintas áreas del noreste y noroeste argentino, en las provincias de Entre Ríos, Misiones, Corrientes, Buenos Aires y Catamarca. Se utilizaron plantas de un año cultivadas en maceta bajo condiciones de invernáculo. Los cruzamientos fueron realizados en botón floral (pimpollos) en estados previos al momento de la antesis (Soto et al., 2005). En todos los casos la polinización se realizó al mediodía inmediatamente la castración, utilizando polen fresco. Al momento de la castración fue extraída la corola para evitar la visita de polinizadores.

Los pistilos se fijaron en FAA (formol, alcohol, ácido acético) 24 horas PP. Se maceró el tejido del pistilo, previo enjuague con agua destilada, con una solución de NaOH 0,6% durante 12 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se efectuaron tres enjuagues con agua destilada y el material fue sumergido en azul de anilina durante 15 minutos y posteriormente montado sobre porta-objetos para su observación, usando microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX50F4, Tokio, Japón) (Martin, 1958). Se evaluó el crecimiento de los tubos polínicos en pistilos considerando la distancia recorrida y el porcen-

taje de tubos hallados en cada porción del pistilo. Para ello se dividió el pistilo en cuatro partes: estigma, primer, segundo y tercer porción. Se tomó como presencia de tubos polínicos cuando dichas porciones contenían una cantidad de tubos polínicos que superaba al 40% del espacio confinado entre las paredes del estilo, considerando como el 100 % el ancho total del estilo observado por medio de epifluorescencia. En cada uno de los cruzamientos se evaluaron al menos 10 pistilos. Las observaciones fueron descriptas y los resultados fueron presentados en una tabla según Pandey (1962).

Materiales utilizados en los cruzamientos

Los materiales utilizados en los cruzamientos se presentan en la Tabla 1.

RESULTADOS

El estudio del crecimiento del tubo polínico en el pistilo en los cruzamientos interespecíficos permitió detectar diferentes patrones de incompatibilidad pre-cigótica. Si bien la germinación de los granos de polen fue normal para todos los cruzamientos, se observó diferencia en el crecimiento de tubos polínicos mostrando distintos patrones de compatibilidad entre las especies.

La Tabla 2 muestra los patrones de las relaciones EPETP (Estigma-Polen/Estilo-Tubo Polínico) en los cruzamientos y se observan dos grupos (los cuales se encuentran remarcados por bordes oscuros) formados por especies compatibilidad, donde los tubos polínicos llegan al ovario y penetran en la micrópila de los óvulos. Estos grupos

son *N. aristata* y *N. veitchii* por una parte y *N. linariaefolia*, *N. scoparia* y *N. ericoides* por otra parte.

A continuación se describen los resultados obtenidos, agrupados por la especie utilizada como parental femenino:

***N. aristata*:** En los cruzamientos con *N. veitchii* se observó un crecimiento normal y la penetración de los tubos polínicos en la micrópila de los óvulos (Fig. 1). En los cruzamientos con *N. linariaefolia* y *N. scoparia*, más del 40% de tubos polínicos llegaron al tercer tercio del estilo, mientras que en los cruzamientos con *N. calycina* y *N. ericoides* los tubos polínicos se detuvieron en la mitad del estilo, presentado estos últimos la menor compatibilidad.

***N. veitchii*:** La mayor compatibilidad se observó con *N. aristata*, de igual manera que en el cruzamiento recíproco (Fig. 2). Con respecto a las demás especies, *N. veitchii* presentó un patrón de compatibilidad semejante al observado en *N. aristata* cuando fue utilizada como receptora de polen.

***N. calycina*:** La germinación de los granos de polen fue normal en el estigma para todos los cruzamientos. En los cruzamientos con *N. veitchii* y *N. aristata* más del 40% de los tubos polínicos fueron observados en el ápice del ovario. Una compatibilidad intermedia fue detectada en los cruzamientos con *N. scoparia* y *N. ericoides* observando tubos polínicos en el segundo y el primero tercio del estilo, respectivamente. En todos los casos donde los tubos polínicos detuvieron su crecimiento, el extremo de los mismos presentó un color oscuro, con una aparente desintegración de la pared (Fig. 3).

Tabla 1. Especies utilizadas en los cruzamientos, localidad, coordenadas geográficas, fecha y nombre del recolector.

Table 1. Species used in the crosses crossing, site, geographical coordinates, date and name of collector.

Especie	Localidad y ubicación	Coordenadas	Fecha de colecta	Colector
<i>N. aristata</i> D. Don	Corrientes, San Luis de Palomar	27°30'05'' S 58°34'10'' W	20/11/2002	Soto, María Silvina
<i>N. calycina</i> Hook.	Entre Ríos, Concordia	31°39'20'' S 58°36'54'' W	20/09/2004	Soto, María Silvina
<i>N. ericoides</i> Miers	Buenos Aires, Tandil	30°55'20'' S 58°29'54'' W	20/03/2002	Miyashima, Ignacio
<i>N. linariaefolia</i> var <i>linariaefolia</i> Graham	Misiones, Oberá	27°21'36'' S 55°02'24'' W	26/09/2001	Soto, María Silvina
<i>N. scoparia</i> Sendtn	Entre Ríos, Gualaguaychú	32°41'21'' S 58°11'23'' W	20/09/2004	Soto, María Silvina
<i>N. veitchii</i> Hook	Catamarca, Cuesta del Portezuelo	32°41'10'' S 64°59'17'' W	18/11/2003	Greppi, Julian

Tabla 2. Patrones de compatibilidad al nivel estigma-estilo en cruzamientos interespecíficos entre seis especies pertenecientes al género *Nierembergia*. Los cuadros en gris agrupan las especies que se presentaron compatibles.

Table 2. Compatibility patterns at the stigma-style level in interspecific crosses between six species of the genus *Nierembergia*. Gray highlighted cells show compatible species.

		Parental receptor de polen (♀)					
		Na	Nv	Nc	Ne	Ns	NI
Parental dador de polen (♂)	Na	--	TP en ovario	TP en 2/3 de estilo	TP en 2/3 de estilo	TP en 3/3 de estilo	TP en 3/3 de estilo
	Nv	TP en ovario	--	TP en 2/3 de estilo	TP en 2/3 de estilo	TP en 3/3 de estilo	TP en 3/3 de estilo
	Nc	TP en ovario	TP en ovario	--	TP en 1/3 de estilo	TP en 2/3 de estilo	TP en 3/3 de estilo
	Ne	TP en 1/3 de estilo	TP en ovario	TP en 2/3 de estilo	--	TP en ovario	TP en ovario
	Ns	TP en 1/3 de estilo	TP en ovario	TP en 2/3 de estilo	TP en ovario	--	TP en ovario
	NI	TP en ovario	TP en ovario	TP en 2/3 de estilo	TP en ovario	TP en ovario	--

Abreviaturas:

Na: *N. aristata*; Nv: *N. veitchii*; Nc: *N. calycina*; Ne: *N. ericoides*; Ns: *N. scoparia*; NI: *N. linariaefolia*.

TP en ovario: Presencia de tubos polínicos presentes en ovario, en un porcentaje mayor al 40%.

TP en 3/3 de estilo: Presencia de tubos polínicos presentes en el último tercio del estilo, en un porcentaje mayor al 40%.

TP en 2/3 de estilo: Presencia de tubos polínicos presentes en el segundo tercio del estilo, en un porcentaje mayor al 40%.

TP en 1/3 de estilo: Presencia de tubos polínicos presentes en el primer tercio del estilo, en un porcentaje mayor al 40%.

N. ericoides: En el cruzamiento con *N. scoparia* y *N. linariaefolia* se observó la llegada de la totalidad de los tubos polínicos al ovario y la penetración en la micrópila de los óvulos (Fig. 4). Una compatibilidad intermedia fue detectada en los cruzamientos con *N. aristata* y *N. calycina*, observando tubos polínicos en el primero y el segundo tercio del estilo, respectivamente. Los cruzamientos con *N. veitchii* mostraron una alta compatibilidad observando más del 40% de los tubos polínicos en el ápice del ovario.

N. scoparia: La mayor compatibilidad se observó con *N. linariaefolia* y *N. ericoides* (Fig. 5) observando que los tubos polínicos llegan al ovario y penetran en la micrópila de los óvulos. Con respecto a las demás especies *N. scoparia* presentó un patrón de compatibilidad semejante al observado en *N. ericoides* cuando fue utilizada como receptora de polen.

N. linariaefolia: En el cruzamiento con *N. ericoides* y *N. scoparia*, un alto porcentaje de tubos polínicos alcanzó el ovario y penetró la micrópila de los óvulos (Fig. 6). Con el resto de las especies presentó una alta compatibilidad observando más del 40% de los tubos polínicos en el ápice del ovario, con excepción de *N. calycina* donde los

tubos polínicos detuvieron su crecimiento en la mitad del estilo.

DISCUSIÓN

Los estudios de la relación estigma-polen/estilo-tubo polínico (EPETP) en cruzamientos interespecíficos recíprocos realizados en *Nierembergia*, demostraron que la incompatibilidad interespecífica se manifiesta por la inhibición del crecimiento del tubo polínico en diferentes niveles del estilo. En ningún caso se encontraron signos de incompatibilidad en el nivel del estigma. El comportamiento resulta similar al reportado en sistemas de auto-incompatibilidad en especies pertenecientes a la familia *Solanaceae*, denominado GSI (Gametophytic self-incompatibility), el cual se caracteriza por presentar normal la germinación del grano de polen y el crecimiento inicial del tubo polínico, detectando la inhibición del tubo polínico a lo largo del estilo (Lush y Clarke, 1997). En este aspecto, es posible entonces sugerir que los procesos de reconocimientos presentes en las barreras de incompatibilidad interespecíficas podrían ser similares a los que actúan en el sistema de auto-incompatibilidad gametofítica (Liedl

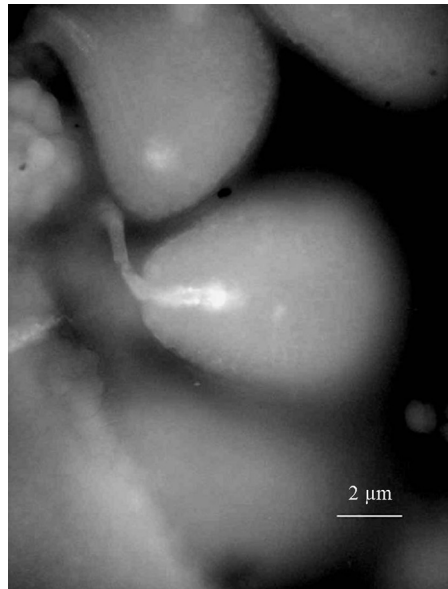


Fig. 1. Detalle del crecimiento de tubos polínicos de *N. veitichii* en óvulos de *N. aristata* 24 horas post polinización. Aumento: barra = 2 μm

Fig. 1. Detail of pollen tube growth of *N. veitichii* in eggs of *N. aristata* 24 hours after pollination. Scale bar = 2 μm



Fig. 2. Detalle del crecimiento de tubos polínicos de *N. aristata* en óvulos de *N. veitichii* 24 horas post polinización. Aumento: barra = 5 μm

Fig. 2. Detail of pollen tube growth of *N. aristata* in eggs of *N. veitichii* 24 hours after pollination. Scale bar = 5 μm

y Anderson, 1994).

Los resultados del presente estudio permiten identificar, dentro del género *Nierembergia*, dos grupos con alta compatibilidad EPETP: (i) *N. aristata* y *N. veitichii*; y (ii) *N. scoparia*, *N. ericoides* y *N. linariaefolia*. Estos grupos coinciden con los

resultados del estudio filogenético realizados en este género por Acosta et al. (2006), el cual utilizó el cariotipo como marcador. Estos autores identifican dos clados, uno de ellos formado por *N. ericoides*, *N. scoparia*, *N. linariaefolia*, *N. calycina*, *N. browaloides* y *N. micrantha*, y el otro por *N.*

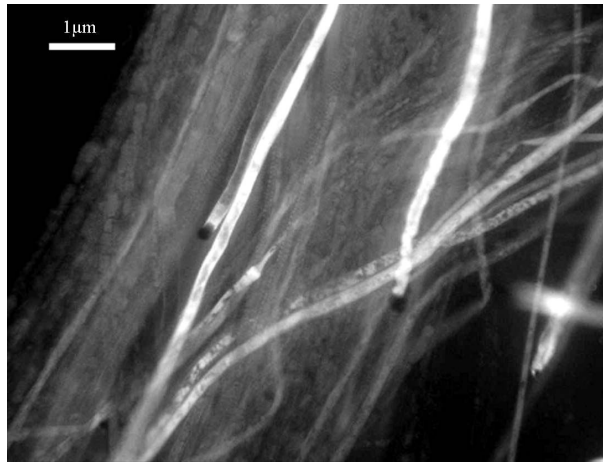


Fig. 3. Tubos polínicos de *N. scoparia* y *N. ericoides* con aparente desintegración de la pared en el extremo distal. Aumento: barra = 1 μm .

Fig. 3. Pollen tubes of *N. scoparia* and *N. ericoides* with apparent disintegration of the wall at the distal end. Scale bar = 1 μm .



Fig. 4. Detalle de la penetración de tubos polínicos de *N. scoparia* y *N. linariaefolia* en la micrópila de *N. ericoides* 24 horas post polinización. Aumento: barra = 2 μm .

Fig. 4. Detail of penetration of the pollen tubes of *N. linariaefolia* and *N. scoparia* in the micropyle of *N. ericoides* 24 hours after pollination. Scale bar = 2 μm .

aristata y *N. veitchii*. En este sentido es posible no sólo sugerir que la compatibilidad EPETP refleja la cercanía filogenético entre las especies, sino también permite predecir la probabilidad de éxito de los cruzamientos interespecíficos.

En los cruzamientos interespecíficos, donde fue utilizada como madre la especie *N. calycina*, se observó una interrupción en el crecimiento de los tubos polínicos que fue acompañada por un engrosamiento anormal del extremo apical del tubo polínico. Este fenómeno es reportado en

Lycopersicon peruvianum Mill. por Nettancourt et al. (1974) y en otros sistemas donde la acumulación de calosa provoca un estallido en la punta del tubo polínico con la consecuente liberación de las gametas en forma prematura, presentándose como otro mecanismo también involucrado en el sistema de incompatibilidad gametofítica (Williams et al., 1982; Dumas y Knox, 1983).

La interrupción en el crecimiento de los tubos polínicos separa a *N. calycina* del resto

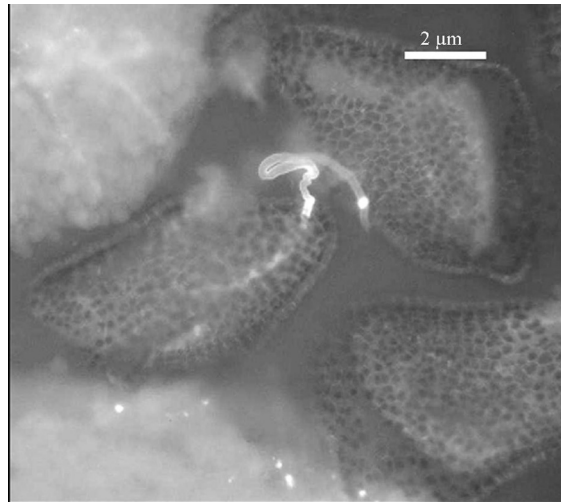


Fig. 5. Detalle de la penetración de tubos polínicos de *N. ericoides* y *N. linariaefolia* en la micrópila de *N. scoparia* 24 horas post polinización. Aumento: barra = 2 μm .

Fig. 5. Detail of penetration of the pollen tubes of *N. ericoides* and *N. linariaefolia* in the micropyle of *N. scoparia* 24 hours after pollination. Scale bar = 2 μm .

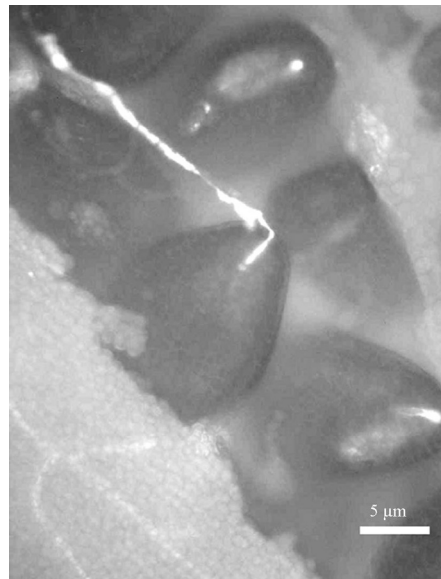


Fig. 6. Detalle de la penetración de tubos polínicos de *N. ericoides* y *N. scoparia* en la micrópila de *N. linariaefolia* 24 horas post polinización. Aumento: barra = 5 μm .

Fig. 6. Detail of penetration of the pollen tubes of *N. ericoides* and *N. scoparia* in the micropyle of *N. linariaefolia* 24 hours after pollination. Scale bar = 5 μm .

de las especies. Si bien en el estudio cariotípico realizado por Acosta et al. (2006) es incluida dentro de un clado con *N. linariaefolia*, *N. scoparia* y *N. ericoides*, los mismos autores sugieren que dicha especie es un estado derivado de un ancestro común compartido con *N. linariaefolia* y

N. browalloides, teniendo en cuenta la presencia de la región organizadora nucleolar en los brazos largos de los cromosomas (Acosta et al., 2006). Es evidente que otros estudios son necesarios para esclarecer la posición filogenético definitiva de *N. calycina* dentro del género.

CONCLUSIONES

El análisis de la relación EPETP permitió corroborar que la incompatibilidad en las especies pertenecientes al género *Nierembergia* estudiadas se expresa en el nivel del estilo. Los cruzamientos *N. scoparia* x *N. ericoides*, *N. aristata* x *N. veitichii*, *N. linariaefolia* x *N. scoparia*, *N. linariaefolia* x *N. ericoides* y sus recíprocos, serían los putativos para la obtención de híbridos. Esta información permitirá establecer estrategias racionales y eficaces de polinización en el marco del programa de mejoramiento. Estudios futuros en etapas posteriores (poscigóticas) permitirían corroborar la compatibilidad interespecífica en los cruzamientos presentados como putativos.

LITERATURA CITADA

- Acosta, M.C., A. del V. Ordoñez, A.A. Coccuci, and E.A Moscone. 2006. Chromosome reports in South American Nicotianeae (Solanaceae), with particular reference to *Nierembergia*. *Annals of the Missouri Garden* 93:634-346.
- Clark, K.R., J.J. Okuley, P.D. Collins, and T.L Sims. 1990. Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-compatible and pseudo self-compatible *Petunia*. *Plant Cell* 2:815-826.
- Cocucci, A.A. y A.T. Hunziker. 1995. Flora Fanerógamica Argentina. Pugliese Siena S.R.L., Córdoba, Argentina.
- Dumas, C., and R.B. Knox. 1983. Callose and determination of pistil viability and incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 67:1-10.
- Heslop-Harrison, Y., B.J. Reger,, and J. Heslop-Harrison. 1984. The pollen-stigma interaction in the grasses. 6. The stigma ('silk') of *Zea mays* L. as host to the pollens of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Pennisetum americanum* (L.) Leeke. *Acta Bot. Neerl.* 33:205-227.
- Liedl, B., and N. Anderson. 1994. Reproductive barriers: Identification, uses and circumvention. *Plant Breeding Reviews* 11:11-154.
- Lush, W. M. and A.E. Clarke. 1997. Observations of pollen tube growth in *Nicotiana glauca* and their implications for the mechanism of self-incompatibility. *Sex Plant Reprod* 10:27-35.
- Martin, R. N. 1958. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34:125-128.
- Nettancourt, D. de, M. Devreux, U. Leri, A. Bozzini, M. Cresti, E. Pacini, and G. Sarfatti. 1974. Genetical and ultrastructural aspects of self and cross incompatibility in interspecific hybrids between self-compatible *Lycopersicon esculentum* and self-incompatible *L. peruvianum*. *Theor Appl Genet* 44:278-288.
- Pandey, K.K. 1962. Interspecific incompatibility in *Solanum* species. *Am. J. Bot.* 49 (8): 874-882.
- Shivanna, K.R., and B.M. Johri. 1985. The Angiosperm pollen: structure and function. Wiley Eastern, Ney Delhi, India.
- Shizukawa, Y., and M. Mii. 1997. A simple and efficient regeneration system for leaf protoplasts of *Nierembergia repens* by inducing single shoots on the microcolonies. *Plant Cell Reports* 16:545-549.
- Soto, S., I. Miyajima, L. Bullrich, D. Mata, G. Facciuto, J.C. Serpa, J.C. Hagiwara, y D. Morisigue. 2004. Evaluación de cuatro clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* desarrolladas en Argentina bajo condiciones de producción. p. 72. En Acta II Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales. 2 - 5 de noviembre. Buenos Aires, Argentina.
- Soto, M.S., L. Bullrich, D. Mata, G. Facciuto, J.C. Serpa, J.C. Hagiwara, D. Morisigue, I. Miyajima, and N. Kobayashi. 2005. New clones of *Nierembergia linariaefolia* obtained from population native to Argentina. *Acta Horticulturae* 683:407-410
- Suarez, E., K. Nishiyama, G. Facciuto, A. Escandón, S. Soto, H.J. Hagiwara, D. Mata, I. Miyajima, and N. Kobayashi. 2003. The Horticulture Development Project INTA-JICA in Argentine. V International Symposium on New Floriculture Crops. August 26-30, 2003. Iguazu-Fall, Sao Paulo, Brasil.
- Van Tuyl, J.M., and M.J. De Jeu. 2005. Methods for overcoming interespecific crossing barriers. p. 273-292. In K.R. Shivana, and V.K. Sawhney (eds.). *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press, New York, USA.
- Wheeler, M.J., V.E. Franklin-Tong, and F.C.H. Franklin. 2001. The molecular and genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Physiologist* 151:565-584
- Willimas, E.G., R.B. Knox, and J.L. Rouse. 1982. Pollination sub-systems distinguished by pollen tube arrest after incompatibility interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *Journal Cell Science* 53:255-277.