

Estudio de la auto(in)compatibilidad en *Ipomoea batatas* (L.) Lam:
segregación del carácter, variantes alélicas y mecanismos involucrados

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,

Área Producción vegetal, orientación genética vegetal

Martín Alejandro Ferrari

Ingeniero Agrónomo

Universidad Nacional de Rosario

2015

Lugar de trabajo: Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Carla Marcela Arizio

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Co-director de Tesis

Beatriz Gloria Galati

Licenciada en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctora en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

JURADO

Ramiro Néstor Curti

Licenciado en Ciencias Biológicas, Ecología, Conservación y Evolución
(Universidad Nacional de Salta)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

María Cecilia Bedogni

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de Mar del Plata)

Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Mar del Plata)

JURADO

Vanina Pamela Cravero

Licenciada en Genética (Universidad Nacional de Misiones)

Doctora en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional de Rosario)

Fecha de defensa de la tesis: 12 de octubre de 2023

Agradecimientos

Agradezco a mi directora de tesis Carla Arizio por su tiempo, su paciencia, su calidad humana y su profesionalismo; por ser guía y responsable de mi desarrollo profesional y personal. A mi co-directora Beatriz Galati por su calidez, su predisposición, y por acompañar y colaborar en todo el proceso. A Gabriela Zarlavsky por su ayuda y compañerismo en increíbles y extensos días de pandemia en el laboratorio de anatomía vegetal. A Sabrina Costa Tártara, por su apoyo y su empeño por mejorar las cosas. A Teresa Boca por su dedicación y sus inmensurables aportes. A Juan Miguez por su asesoramiento en diseño. Agradezco también a Héctor Martí, por enseñarme a amar este cultivo, y por presentarme a Carla y a Marcela. A Mariel Mitidieri, por transmitir e inculcar en mí el amor por la investigación; por sus palabras y por su ejemplo. A Laura Hansen, por su apuesta y siempre hacer que las cosas sean más fáciles. A mis compañeros de INTA San Pedro que colaboraron y facilitaron a que esta etapa se desarrolle de la mejor manera, asistiendo en mis ausencias y alentando en el cotidiano. A los compañeros del Instituto de Recursos Biológicos de INTA por las sugerencias, debates y hacerme sentir parte durante mi estadía. Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria por brindarme la posibilidad de avanzar en mi formación como investigador. A todos los que colaboraron de una u otra manera y aquí me estoy olvidando de nombrar. A mi familia y amigos por su incondicionalidad y por estar siempre.

Dedicatoria

A todos los que me acompañaron en este camino, con su paciencia, aliento y cariño.

A Lolita, el amor de mi vida y mi ángel por siempre.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo, y que no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis o publicación en esta u otra institución.

Ing. Agr. Martin Alejandro Ferrari

Índice general

Índice general	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	IX
Abstract	X
Capítulo 1 - Introducción	1
1.1 Introducción	2
1.2 Morfología de <i>Ipomoea batatas</i>	3
1.3 Importancia del cultivo - Producción de batata en Argentina.....	5
1.4 Objetivos	7
1.5 Hipótesis.....	7
Capítulo 2 - Evaluación del comportamiento del sistema de auto(in)compatibilidad	9
2.1 Introducción	10
2.1.1 Sistema de Incompatibilidad Gametofítico (SIG).....	11
2.1.2 Sistema de Incompatibilidad Esporofítico (SIE).....	11
2.1.3 Sistemas de incompatibilidad en <i>Ipomoea</i>	15
2.1.4 Importancia agronómica de la auto(in)compatibilidad	18
2.1.5 Genética de la especie	19
2.2 Materiales y métodos	22
2.2.1 Material vegetal.....	22
2.2.2 Desarrollo de dos progenies para la evaluación del carácter auto(in)compatibilidad.	23
2.2.3 Evaluación del estatus SI en <i>Ipomoea batatas</i>	24
2.2.3.1 Tipos de cruzamientos evaluados.....	27
2.2.4 Análisis estadístico	29
2.3 Resultados y discusión	31
2.3.1 Evaluación de genotipos parentales	31
2.3.2 Evaluación de genotipos C y S1	32
2.3.3 Evaluación de genotipos C y S1 contra sus progenitores.....	36
2.3.3.1 Cruzamiento progenie S1(30x30) x P30	36
2.3.3.2 Cruzamiento progenie C(28x30) x P30/P28	38
2.3.4 Aproximaciones a la interpretación de un modelo que explique la segregación del locus <i>S</i>	40

2.3.4.1 Modelo de relaciones de dominancia diferencial entre haplotipos <i>S</i>	44
2.3.4.2 Modelo de ruptura del haplotipo <i>S</i> , un alelo <i>S</i> mutante con capacidad de anular el sistema de incompatibilidad	47
Capítulo 3 - Evaluación de la fertilidad	50
3.1 Introducción	51
3.2 Materiales y métodos	54
3.2.1 Índice de Fertilidad Masculina - Viabilidad de granos de polen.....	54
3.2.2 Fertilidad Femenina - Número de óvulos.....	55
3.2.3 Número de Semillas por Fruto	55
3.2.4 Análisis estadístico	55
3.3 Resultados y discusión	57
3.3.1 Fertilidad Masculina.....	57
3.3.2 Fertilidad femenina	65
3.3.3 Número de semillas en autocruzamientos y cruzamientos dirigidos	69
Capítulo 4 - Evaluación del crecimiento del tubo polínico.....	72
4.1 Introducción	73
4.2 Materiales y métodos	77
4.2.1 Genotipos evaluados	79
4.2.2 Análisis estadístico	80
4.3 Resultados y discusión	81
4.3.1 Evaluación del tubo polínico en 5 posiciones del gineceo.....	81
4.3.2 Descripción del crecimiento del tubo polínico.....	90
4.3.3 La microscopía de fluorescencia en la detección del SIE	93
Capítulo 5 – Discusión general, conclusiones y perspectivas.....	95
5.1 Discusión general	96
5.2 Conclusiones	100
5.3 Perspectivas.....	101
Bibliografía	102

Abreviaturas

SI	Sistema de incompatibilidad
SIG	Sistema de Incompatibilidad Gametofítico
SIE	Sistema de Incompatibilidad Esporofítico
IG	Incompatibilidad Gametofítica
IE	Incompatibilidad Esporofítica
AI	Autoincompatibilidad/ Autoincompatible
AC	Autocompatibilidad/ Autocompatible
EEA San Pedro	Estación Experimental Agropecuaria INTA San Pedro
FAA	Formaldehído, alcohol, acético.
NaOH	Hidróxido de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio

Resumen

La autoincompatibilidad es un mecanismo presente en las angiospermas basado en la capacidad del pistilo para identificar e inhibir la germinación o el desarrollo posterior de polen propio o relacionado genéticamente. El sistema de incompatibilidad esporofítico está controlado por un locus multigénico (locus *S*) que es heredado generalmente como una unidad segregante denominado “haplotipo *S*” permitiendo preservar el sistema de autoincompatibilidad. *Ipomoea batatas* (L.) Lam es una especie autohexaploide, con 90 cromosomas, autoincompatible, altamente heterocigota y que presenta segregación principalmente hexasómica. Además, la especie presenta incompatibilidad cruzada dificultando aún más el mejoramiento genético de la especie.

El objetivo de la tesis fue estudiar la segregación del carácter autoincompatibilidad en *I. batatas*, su ruptura y las relaciones de dominancia existentes entre haplotipos. Se generaron dos progenies, una de ellas segregante para el carácter autoincompatibilidad y la otra a partir del autocruzamiento de un genotipo autocompatible. Se realizaron autocruzamientos en las progenies a fin de evaluar el carácter autocompatibilidad y retrocruzas recíprocas para evaluar las relaciones de dominancia. Además se evaluó la fertilidad masculina, femenina y el crecimiento del tubo polínico a través del gineceo.

La presencia del carácter autocompatibilidad se observó en ambas progenies, comportándose como un carácter recesivo. Se encontraron diferentes comportamientos de compatibilidad en las retrocruzas recíprocas (incompatibilidad total, compatibilidad total, compatibilidad en un solo sentido). La progenie endocriada presentó disminución en la expresión de los caracteres vegetativos y reproductivos. Respecto a la fertilidad masculina, se observaron diferencias ($p < 0,05$) entre los genotipos parentales y ambas progenies. El parental autocompatible fue siempre más fértil que el autoincompatible, y la progenie segregante más fértil que la endocriada. Respecto a la fertilidad femenina, no

se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambas progenies. A partir de la evaluación del crecimiento del tubo polínico se detectaron genotipos autocompatibles. Se plantearon dos modelos que podrían explicar la ruptura de la autoincompatibilidad.

Palabras claves: *Ipomoea batatas* (L) Lam., Incompatibilidad, Esporofítica, Esterilidad, Segregación.

Abstract

Self-incompatibility is a mechanism present in angiosperms based on the ability of the pistil to identify and inhibit germination or further development of self or genetically related pollen. The sporophytic incompatibility system is controlled by a multigene locus (S locus) that is generally inherited as a segregating unit called the "S haplotype" allowing the self-incompatibility system to be preserved. *Ipomoea batatas* (L.) Lam is an autohexaploid species, with 90 chromosomes, self-incompatible, highly heterozygous and presenting mainly hexasomic segregation. In addition, the species is cross-incompatible, making genetic improvement of the species even more difficult.

The objective of the thesis was to study the segregation of the trait self-incompatibility in *I. batatas*, its breakage and the dominance relationships between haplotypes. Two populations were generated, one of them segregating for the self-incompatibility trait and the other from the self-crossing of a self-incompatible genotype. The progenies were self-crossed to evaluate the self-incompatibility trait and reciprocal backcrosses were performed to evaluate dominance relationships. In addition, male and female fertility and pollen tube growth through the gynoecium were evaluated.

The presence of the self-compatibility trait was observed in both progenies, behaving as a recessive trait. Different compatibility behaviors were found in reciprocal backcrosses (total incompatibility, total compatibility, one-way compatibility). The inbred population showed a decrease in the expression of vegetative and reproductive

traits. Regarding male fertility, differences ($p < 0.5$) were observed between the parental genotypes and both populations. The self-compatible parental was always more fertile than the self-incompatible, and the segregating progeny more fertile than the inbred. Regarding female fertility, no significant differences ($p > 0.05$) were found between both progenies. From the evaluation of pollen tube growth, self-compatible genotypes were detected. Two models were proposed that could explain the breakdown of self-incompatibility.

Key words: *Ipomoea batatas* (L) Lam., Incompatibility, Sporophytic, Sterility, Segregation.

Capítulo 1 - Introducción

1.1 Introducción

El orden Solanales está comprendido por cinco familias, 165 géneros y más de 4.080 especies. Casi todas las especies del grupo se reparten sólo en dos familias: Solanaceae y Convolvulaceae. Esta última es una familia cosmopolita, representada en todas las regiones templadas y tropicales, comunes en los bosques higrofilos y en terrenos modificados en una amplia gama de hábitats (Stevens, 2001). Dentro de los 57 géneros y más de 1.600 especies de la familia Convolvulaceae se encuentra *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Es la única especie de importancia económica como alimento para consumo humano dentro de esta familia, siendo uno de los principales cultivos a nivel mundial (Woolfe, 1992).

Es una planta hexaploide con 90 cromosomas ($2n = 6x = 90$), y aún hoy se discute el carácter de su ploidía, proponiéndola algunos autores como un alopoliploide con dos genomas homólogos y un tercer genoma homeólogo, resultante de una hibridación interespecífica entre *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don e *Ipomoea triloba* (L.) (Austin, 1988). Otros autores concluyen a partir de trabajos citológicos (Shiotani y Kawase, 1989; Srisuwan et al., 2006) y con marcadores moleculares (ISSR, RFLP y RAPD) (Jarret y Austin, 1994; Huang y Sun, 2000; Huang et al., 2002; Hu et al., 2003) que la especie es un autopoliploide derivado de *I. trifida*.

Además de su ploidía, *I. batatas* presenta un sistema de incompatibilidad esporofítico (SIE) que afecta tanto la capacidad de autocruzamiento como la de hibridarse en cruzamientos dirigidos específicos. El sistema de incompatibilidad (SI) se denomina esporofítico debido a que está determinado por la interacción entre la cubierta del polen y el estigma, ambos tejidos esporofíticos. La autoincompatibilidad (AI) es uno de los principales sistemas presentes en muchas especies de plantas que previene la autopolinización y, por consiguiente, es un mecanismo importante para generar y

mantener la diversidad genética dentro de una especie (Takayama e Isogai, 2005). La incompatibilidad es un mecanismo fisiológico que dificulta y previene la fertilidad en plantas que presentan polen y óvulos viables para producir semillas. Es útil diferenciar la misma de la esterilidad, que abarca todos los casos de falta de fertilidad producto de irregularidades en el sistema de reproducción sexual. La esterilidad puede ser causada por anomalías en el desarrollo de los órganos reproductivos, por la falla en el desarrollo de granos de polen viables y fallas en el desarrollo del embrión o el endosperma luego de la fertilización, entre otras (Sleper y Poehlman, 2006).

1.2 Morfología de *Ipomoea batatas*

La batata es una planta herbácea y perenne que se cultiva como anual. Presenta un sistema radicular conformado por tres tipos de raíces: las fibrosas, encargadas de absorber nutrientes y agua, y sostener a la planta, raíces tipo lápiz, que se encuentran levemente engrosadas por haber detenido su crecimiento por distintos factores, y finalmente raíces reservantes, las cuales almacenan los productos fotosintéticos (Figura 1.1). Estas últimas constituyen los órganos comerciales de la batata y varían en forma y tamaño, según el cultivar, el tipo de suelo donde la planta se desarrolla y otros factores bióticos y abióticos. Los tallos son cilíndricos y su longitud varía de 1 a 5 m dependiendo del hábito de crecimiento del cultivar, como así también varía el color, pigmentación y longitud de los entrenudos. Las hojas son simples y están dispuestas alternadamente en espiral sobre los tallos. La forma del perfil general de las hojas puede ser redondeada, reniforme (en forma de riñón), cordada (en forma de corazón), triangulada, hastada (trilobular y en forma de lanza), lobulada y casi dividida. El color de estas varía entre los cultivares y puede cambiar durante su crecimiento. Los cultivares de batata difieren en su hábito de floración, algunos no florecen, otros producen muy pocas flores y otros florecen profusamente. La flor de la batata es perfecta. El cáliz consiste en cinco sépalos y la corola

presenta cinco pétalos que se unen en forma de embudo. El limbo es generalmente de color lila o morado blanquecino con el fondo del interior de color rojizo o morado. El androceo se compone de cinco estambres cuyos filamentos varían en longitud respecto a la posición del estigma. Las anteras son blanquecinas, amarillas o rosadas, y su dehiscencia es longitudinal. Los granos de polen son esféricos. El gineceo consta de un pistilo de ovario súpero, con dos carpelos, con dos lóbulos cada uno y un total de 4 óvulos. El estilo es relativamente corto y termina en un estigma ancho dividido en dos lóbulos. El estigma es receptivo en las primeras horas de la mañana y la polinización se realiza principalmente a través de las abejas. El fruto es una cápsula más o menos esférica con una punta terminal, y puede ser pubescente o glabra. Cada cápsula contiene de una a cuatro semillas ligeramente aplanadas en un lado y convexas en el otro, de aproximadamente 3 mm. El embrión y el endosperma están protegidos por una testa gruesa, muy dura e impermeable (Huamán, 1992; Huamán, 1999).

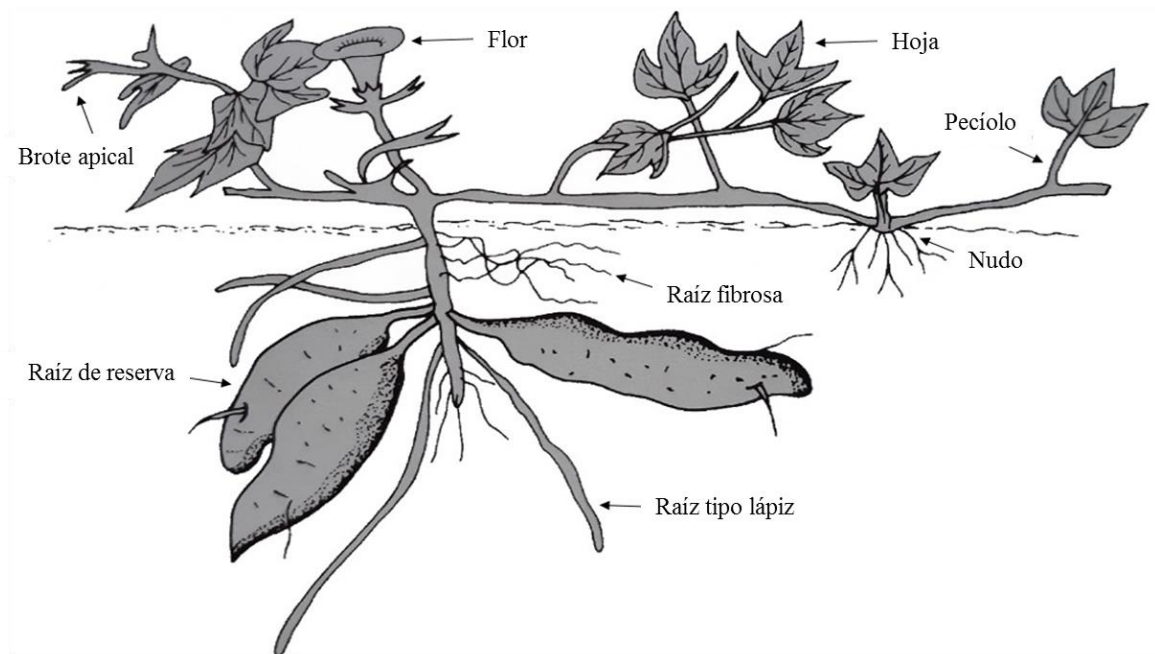


Figura 1.1 Planta de Batata. Fuente: Adaptado de Woolfe (1992).

1.3 Importancia del cultivo - Producción de batata en Argentina

A nivel mundial la batata se encuentra dentro de los diez cultivos más importantes destinados a la alimentación humana. Es cultivada en más de 100 países, sumando alrededor de 9 millones de hectáreas, produciendo aproximadamente 140 millones de toneladas. La producción se encuentra principalmente localizada en países en desarrollo, los cuales aportan con un 95% del total de la producción. Aproximadamente un 80% de las batatas cultivadas en el mundo son producidas en Asia, alrededor de un 15% en África y solo un 5% en el resto del mundo. China es responsable del 65% de la producción mundial, destinando gran parte de esta a la alimentación animal. Otros importantes productores son Malawi, Nigeria, Uganda, Tanzania, Indonesia y Vietnam (FAOSTAT, 2022; Theisen, 2020). Dentro del continente americano, Argentina se encuentra dentro de los cinco países más importantes, siendo el segundo en Sudamérica, luego de Brasil (FAOSTAT, 2022). El consumo promedio nacional se calcula entre 3 y 4 kg/habitante/año (Martí, 2018).

En Argentina se cultivan entre 10.000 y 12.000 hectáreas de batata, produciéndose alrededor de 120.000 toneladas por año. La producción se encuentra principalmente en tres zonas productivas: Centro (Córdoba, sur de Entre Ríos y Santa Fe y norte de Buenos Aires), NEA (Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, norte de Entre Ríos y Santa Fe) y NOA (Tucumán, Salta, Santiago del Estero y Catamarca) (Cusumano y Zamudio, 2013; del Valle Di Feo, 2015). Las dos primeras producen alrededor de un 80% de la producción nacional. También el cultivo se lleva a cabo en otros esquemas productivos en regiones como Cuyo y en el norte de la Patagonia.

En la zona norte de la Provincia de Buenos Aires, principalmente en el partido de San Pedro, se cultivan alrededor de 2.000 ha (Figura 1.2). En la zona se cuenta con un

total de 50 productores de los cuales 15 cuentan con lavaderos que acondicionan producción propia, de otros productores de la zona y de otras regiones productivas.

La Estación Experimental Agropecuaria de INTA San Pedro (EEA San Pedro), es considerada referente a nivel nacional en el cultivo de batata. En la misma se desarrolla un equipo interdisciplinario que comprende especialistas en fitopatología, entomología, caracterización nutricional y poscosecha. También tiene sede, desde hace más de 30 años, el Programa de Mejoramiento Genético de Batata de INTA. El mismo fue responsable de la inscripción de los cultivares Morada INTA, Colorado INTA, Boni INTA y Capicúa INTA.

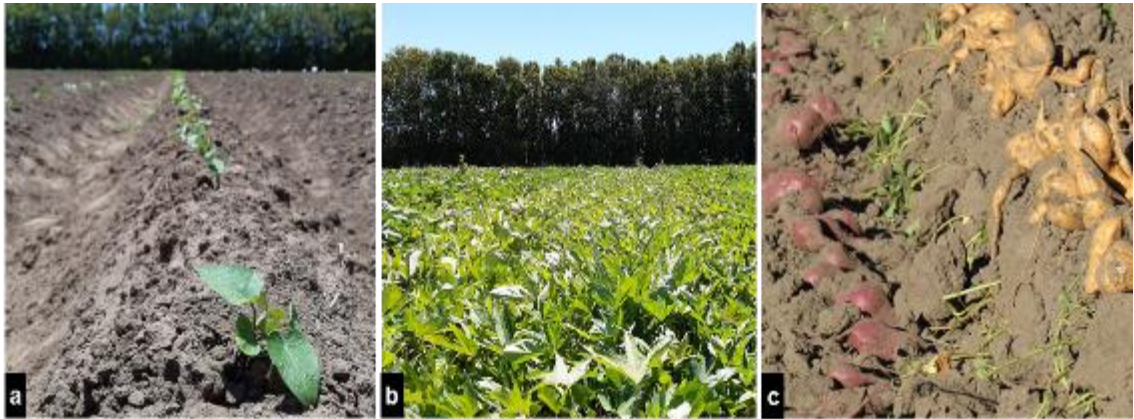


Figura 1.2 Ciclo de cultivo de la batata. a) Plantín de batata trasplantado. b) Cultivo de batata. c) Raíces de reserva de batata a la cosecha.

La mejora genética de las plantas cultivadas está dirigida entre otros objetivos a incrementar la producción y mejorar atributos nutricionales y de manejo de cultivo desde hace miles de años, posiblemente desde el inicio de la agricultura. Para ello, el hombre ha empleado cruzamientos entre parentales seleccionados con el fin de incrementar la variabilidad genética, paso inicial en el proceso de mejoramiento. En *I. batatas*, el mejoramiento genético se encuentra limitado por varios factores: floración escasa y dependiente del genotipo, baja floración en climas templados, esterilidad, poliploidía y elevado número de cromosomas, autoincompatibilidad e incompatibilidad cruzada y baja

fertilidad (limitada formación de semillas) luego de cruzamientos libres o controlados (Gurmu et al., 2013).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Estudiar los mecanismos de auto(in)compatibilidad en *Ipomoea batatas* mediante la caracterización del comportamiento genético del carácter, lo que permitirá aportar herramientas para optimizar los programas de mejoramiento y contribuir al conocimiento de esta especie.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Verificar el mecanismo de auto(in)compatibilidad en *Ipomoea batatas*.
2. Determinar si existen relaciones de dominancia entre la autocompatibilidad/ autoincompatibilidad.
3. Evaluar la tasa de segregación del carácter según las diferentes hipótesis que existen para la especie.
4. Proponer un mecanismo que explique la ruptura de la autoincompatibilidad.
5. Caracterizar la fertilidad femenina y masculina de las progenies generadas y en los genotipos parentales.
6. Determinar los eventos post-polinización en autocruzamientos y en cruzamientos entre genotipos a nivel de desarrollo del tubo polínico.

1.5 Hipótesis

- Existe una relación de dominancia entre los diferentes haplotipos del locus de incompatibilidad que explica la existencia de genotipos autocompatibles.
- Existen procesos que generan esterilidad e interfieren con la evaluación de la incompatibilidad.

- La evaluación del crecimiento del tubo polínico permite diferenciar entre genotipos autocompatibles y autoincompatibles.

Capítulo 2 - Evaluación del comportamiento del sistema de auto(in)compatibilidad

2.1 Introducción

La incompatibilidad es un mecanismo genético, bioquímico y fisiológico presente en las angiospermas basado en la capacidad del pistilo para identificar la presencia de polen propio o relacionado genéticamente e inhibir su germinación o su desarrollo posterior (Nasrallah y Nasrallah, 1993). Los sistemas de incompatibilidad se encuentran presentes en 91 de las 271 familias de angiospermas descritas (Jiménez Duran y Cruz García, 2011). Es una interacción célula-célula entre el estigma y la superficie del grano de polen, mediante interacciones proteicas (McCormick, 1998). Este mecanismo previene la endogamia, favoreciendo la polinización cruzada, contribuyendo así a la diversidad genética de la población.

Los SI pueden clasificarse en dos tipos: heteromórfica y homomórfica. La incompatibilidad heteromórfica se caracteriza por presentar diferencias en la morfología floral, principalmente en la longitud del estambre y el estilo, que obstaculizan la fecundación. Los polimorfismos sexuales son comunes en las plantas (presentes en al menos 28 familias de angiospermas), y se plantean como un mecanismo que promueve el entrecruzamiento (Ferrero, 2014; Acquaah, 2012).

En los SI homomórfica, las estructuras florales, tanto el pistilo como las anteras de los genotipos involucrados, son similares. Los SI homomórficos pueden clasificarse en Incompatibilidad Gametofítica (IG) cuando los componentes que determinan la incompatibilidad son expresados por el genotipo haploide del grano de polen e Incompatibilidad Esporofítica (IE) cuando la incompatibilidad está determinada por el producto de los alelos *S* que son expresados y sintetizados por los tejidos diploides de la planta madre (del esporofito), los cuales son incorporados a la cubierta del grano de polen durante su maduración en la antera (Jimenez Duran y Cruz García, 2011; Acquaah, 2012). Estudios de genética clásica han establecido que el reconocimiento de polen propio o

relacionado es controlado, en la mayoría de las especies, por un locus multialélico denominado “locus *S*”, y que la inhibición sobre el polen ocurre cuando el mismo “alelo *S*” es expresado específicamente tanto por el polen como por el pistilo. Este complejo “locus *S*” multigénico es heredado generalmente como una unidad segregante (ausencia de recombinantes) por lo que las variantes del complejo génico son denominadas “haplotipos *S*” (Takayama e Isogai, 2005), permitiendo que se preserve el sistema de autoincompatibilidad intacto.

2.1.1 Sistema de Incompatibilidad Gametofítico (SIG)

En el sistema gametofítico la incompatibilidad del polen (liberado en estado bicelular) está determinado por los alelos “*S*” propios, y el encuentro entre el polen y pistilo que portan el mismo alelo “*S*”, activa la reacción de incompatibilidad. En este caso el rechazo del polen ocurre cuando el haplotipo *S* del polen coincide con uno de los dos haplotipos *S* presentes en el pistilo diploide de una planta heterocigota receptora, lo que provoca que el crecimiento del tubo polínico se inhiba generalmente a nivel del estilo. En este sistema, los alelos *S* se expresan co-dominantemente en el pistilo y por lo tanto todos los individuos dentro de la población que se genera, serán heterocigotas para *S*, pues el polen nunca podrá fertilizar una planta con su mismo genotipo *S* (Hiscock, 2002).

2.1.2 Sistema de Incompatibilidad Esporofítico (SIE)

La autoincompatibilidad esporofítica fue detectada hasta el momento en seis familias: Asteraceae, Betulaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Convolvulaceae y Polemoniaceae (Gibbs, 2014). El polen liberado se encuentra en estado tricelular y el proceso de inhibición ocurre en el estigma, en la fase de hidratación y germinación del grano de polen y en el comienzo del crecimiento del tubo polínico (Susanto et al., 2013).

En este sistema, generalmente, el locus S corresponde a una región con varios genes que determinan la especificidad del polen y el estigma. Como características más relevantes del SIE podemos mencionar la existencia de relaciones de codominancia y dominancia entre los haplotipos S expresados en el pistilo y en el polen, y que además esas relaciones pueden ser diferentes en el polen que en el pistilo, complejizando los cruzamientos (Bateman, 1954; Kowiyama et al., 1994).

Como ejemplo del funcionamiento del SIE, Gibbs (2014) plantea el cruzamiento de 2 genotipos diploides, heterocigotas, con distintos haplotipos S : $S_1S_2 \times S_3S_4$, y con las siguientes relaciones de dominancia en el polen: $S_1 = S_4 > S_3 > S_2$ y en el estigma: $S_1 = S_3 = S_4 > S_2$ (= representa codominancia y > representa dominancia). De este modo se podría obtener una progenie con 4 fenotipos distintos: S_1S_3 , S_1S_4 , S_2S_3 , S_2S_4 . La compatibilidad entre hermanos y de la progenie con sus parentales entonces sería la planteada en la figura 2.1.

♀ \ ♂	S_1S_3	S_1S_4	S_2S_3	S_2S_4	S_3S_4
S_1S_3	-	-	-	+	+
S_1S_4	-	-	+	-	-
S_2S_3	+	+	-	+	+
S_2S_4	+	-	+	-	-
S_1S_2	-	+	+	+	+

Figura 2.1 Resultado de cruzamientos entre dos genotipos heterocigotas para el locus S . (Gibbs, 2014).

Las relaciones alélicas dominantes en el polen o el estigma están indicadas en negrita. Por ejemplo, el polen que lleva el alelo S_3 desde el fenotipo S_1S_3 reaccionará como S_1 debido a que el producto de su alelo dominante, es el que es expresado en el tapete y

está presente en las paredes del polen. De igual manera, el estigma del genotipo diploide S_2S_3 , expresa los productos del alelo dominante S_3 .

En especies con SIE la mayoría de los hermanos son inter incompatibles, así como algunas retrocruzas con sus parentales y algunos hermanos podrían mostrar compatibilidad no recíproca (en una sola vía). Las compatibilidades reales dependen de la dominancia alélica en el polen y el estigma. En una población con un SIE (con relaciones de dominancia para los alelos S), una mezcla de individuos con el locus S en estado heterocigota y S en estado homocigota es teóricamente posible porque los alelos recesivos S pueden estar enmascarados en el polen y/o el estigma por alelos dominantes S (Hiscock y Tabah, 2003; Hiscock, 2002).

En el SIE analizado en Brassicaceae, las relaciones de dominancia pueden ser clasificadas en lineales o no lineales (ejemplo con tres alelos “ S ”, denominados S_a , S_b y S_c . Si “ S_a ” es dominante respecto a “ S_b ” ($S_a > S_b$) y “ S_b ” es dominante sobre el alelo “ S_c ” ($S_b > S_c$), si “ S_a ” es además dominante sobre “ S_c ”, entonces la dominancia es lineal ($S_a > S_b > S_c$), pero, si “ S_a ” no es dominante sobre “ S_c ”, entonces la dominancia es No lineal (Hatakeyama et al., 1998). Por otro lado, en una investigación realizada en Convolvulaceae (*Ipomoea trifida*) se observó que el patrón de dominancia entre 28 alelos “ S ” evaluados, fue lineal tanto en el estigma como en el polen (Kowyama et al., 1994).

La genética de los SIE fue primero descrita en dos especies de Asteraceae y luego en varias especies de Brassicaceae (Hiscock y Tabah, 2003). En Convolvulaceae el estudio de la SIE se llevó adelante en algunas especies diploides del género *Ipomoea*. El estado diploide y la alta fertilidad de estas especies permitió proponer un modelo de SIE no enmascarado por la esterilidad, que ayudó a elaborar una propuesta de funcionamiento en *Ipomoea batatas* (Martin, 1967). Sin embargo, aún está pendiente comprender el sistema de incompatibilidad en batata, así como la ruptura de la misma, para la que no

existe bibliografía publicada. La falta de similitud entre los productos génicos provenientes de los locus *S* en las distintas familias, sustenta la hipótesis que diversos SIE evolucionaron de manera independiente y probablemente en múltiples momentos en diferentes linajes de angiospermas (Kowayama et al., 2000).

Sobre el control molecular de la incompatibilidad, en el género *Brassica* es donde más detalle del mecanismo se conoce. El locus *S* consiste en por lo menos dos genes fuertemente ligados que codifican para proteínas del polen y del pistilo, que interactúan de una manera alelo específica. El principal determinante femenino es una quinasa receptora del locus *S* (SRK) ubicado en el estigma (contiene un dominio extracelular en la película estigmática, un dominio transmembrana y un dominio intracelular) mientras que el determinante masculino es una pequeña proteína rica en cisteína (SP11 o SCR) con origen en el tapete y localizada en la cubierta del polen (figura 2.2). La interacción de las proteínas SCR y SRK provenientes del mismo haplotipo, inicia una cascada de señalización río abajo que activa el rechazo de polen, impidiendo la auto fertilización y la reproducción entre cruzamientos que comparten idénticos haplotipos *S*. Estudios en la familia de Asteraceae (Allen et al., 2011) y Convolvulaceae (Kowayama et al., 2000), muestran que ambos presentan mecanismos similares, pero con algunas diferencias a lo observado en *Brassica*.

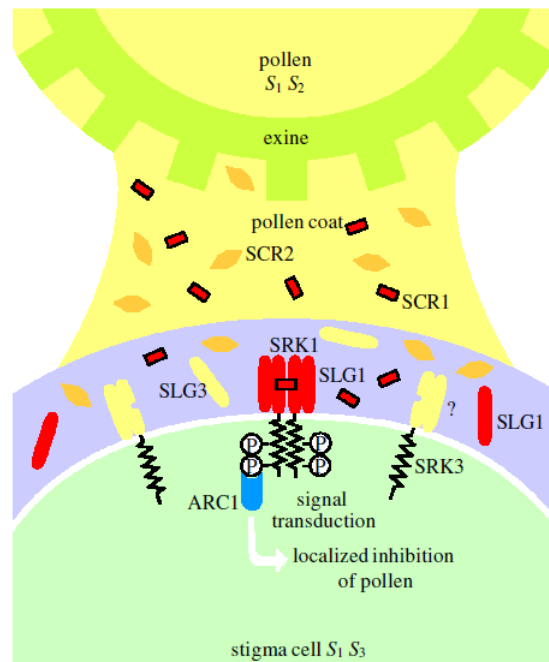


Figura 2.2. Modelo del mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen en *Brassica* (Hiscock y Tabah, 2003).

2.1.3 Sistemas de incompatibilidad en *Ipomoea*

En el género *Ipomoea* se han reportado dos grupos de especies las cuales están aisladas sexualmente entre sí y no es posible su hibridación. El primer grupo compuesto por *Ipomoea lacunosa* (L.), *Ipomoea triloba*, *Ipomoea trichocarpa* (Elliott), *Ipomoea tiliacea* (Willd.) Choisy e *Ipomoea gracilis* (R.Br.), se caracteriza por ser autocompatible. Mientras que, en el segundo grupo, se ubican especies que presentan SIE, entre ellas *Ipomoea trifida*, *Ipomoea litoralis* (L.) Bl e *Ipomoea batatas*.

Las especies dentro del género *Ipomoea* presentan un SIE controlado por un único locus con múltiples haplotipos *S* (Kowyama et al., 1994) que pueden presentar diferentes relaciones de dominancia en el polen y el estigma, ocasionando una falla absoluta de la germinación del polen en la superficie del estigma cuando ocurre la autopolinización. Si bien no hay trabajos publicados en batata analizando directamente el SIE, las

investigaciones realizadas en otras *Ipomoeas* aportan información que puede utilizarse para comprender o modelar el funcionamiento en *I. batatas*. Kowyama et al., (2000) y Kakeda et al., (2000) centraron sus investigaciones en *I. trifida* para investigar la base genética y fisiológica de la IE debido al menor tamaño de su genoma respecto al de batata y su carácter diploide. En los estudios de cruzamientos a partir de seis poblaciones naturales, detectaron un total de 49 alelos *S* diferentes (o haplotipos *S*), con relaciones lineales y jerarquías de dominancia y recesividad, así como también la presencia de relaciones de codominancia (detectadas más frecuentemente en el estigma que en el polen). El 6% de los alelos detectados muestran además interacciones diferenciales entre el polen y el estigma (Kowyama et al., 1994), lo que explica las diferencias en cruzamientos recíprocos. Los investigadores detectaron dentro de las poblaciones evaluadas un genotipo que resulta autocompatible (MX1) y a través de diferentes cruzamientos y autocruzamientos, plantearon que esta característica es explicada por la presencia de un alelo mutado, localizado en el locus *S* (alelo *Sc*). El mismo se inserta en la cadena de dominancia y recesividad en relación a los otros alelos presentes. El autocruzamiento del genotipo autocompatible, genera una progenie S1 con genotipos autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI), con una tasa de segregación 3:1, evidenciando una relación de dominancia del alelo *Sc* sobre el otro alelo presente. Si bien se pudo corroborar que el alelo *Sc* se encuentra ligado al locus *S*, no fue posible establecer si el mismo corresponde a una mutación en el determinante femenino o el masculino. Tomita et al. (2004), identificó en *I. trifida* una región genómica de 313 Kb de distancia física, que contiene el locus de *S* y detectó una importante supresión de la recombinación genética en la región, reforzando el concepto de “haplotipo *S*”, donde las variantes alélicas dentro del locus, se heredan de manera conjunta. El análisis a un nivel molecular dentro del locus *S*, permitió identificar una región genómica hipervariable de 35 a 95 kbp, que

fue denominada como región SDR (región divergente específica del locus *S*). De los genes ubicados dentro del SDR, se identificó un gen específico de antera (AB2), y tres genes específicos de estigma (E1, SE2 y SEA) considerados los genes candidatos que pueden codificar los determinantes masculinos y femeninos de autoincompatibilidad (Rahman et al., 2007).

Si bien *I. batatas* está caracterizada como autoincompatible, igual que en *I. trifida* (Kowyama et al., 1994), se han reportado algunas variedades que resultan autocompatibles (Wang, 1963; Van Rheenen, 1964; Martin, 1965; Young-Sup et al., 2004; Arizio, 2011) y que han permitido el desarrollo de este trabajo.

Además de la AI, es común la existencia de incompatibilidad cruzada (incompatibilidad entre genotipos diferentes que comparten alelos dominantes del locus *S*) entre ciertos genotipos (Hernández y Miller, 1962), pero la misma solo se observa en materiales con base genética estrecha y que por lo tanto comparten alelos del locus *S*. La identificación de los grupos de incompatibilidad cruzada se efectúa mediante la realización de cruzamientos controlados: individuos que pueden cruzarse se consideran que pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad mientras que dentro de los grupos los individuos son incompatibles (Reynoso et al., 1999a). En los diversos trabajos publicados donde se evalúa el comportamiento de diferentes genéticas respecto al carácter de interés, pueden distinguirse tres tipos de respuesta a los cruzamientos dependiendo del éxito de la fertilización: compatibilidad recíproca (el cruzamiento es positivo en ambos sentidos), incompatibilidad recíproca (cruzamiento negativo en ambos sentidos) e incompatibilidad unilateral (solo la polinización prospera cuando el genotipo en cuestión es usado como femenino y no como masculino, o viceversa) (Martin, 1965). La existencia de la citada incompatibilidad unilateral incrementa la dificultad para clasificar los distintos grupos (Martin, 1965) y deja al descubierto la existencia de diferentes relaciones

de dominancia entre alelos involucrados en el control de la autoincompatibilidad tanto en el polen como en el estigma como se mencionó anteriormente (Kowyama et al., 1980).

2.1.4 Importancia agronómica de la auto(in)compatibilidad

Algunas dificultades, como la baja floración, pueden ser reducidas aplicando varias técnicas de inducción floral (tratamiento de día corto, injertos en pie de especies silvestres, sprays con pesticidas y reguladores de crecimientos, nutrición mineral, etc.) (Reynoso et al., 1999b). Por el contrario, la incompatibilidad continúa siendo una barrera para el mejoramiento y la conservación del cultivo, reduciendo el número de combinaciones posibles, impidiendo los retrocruzamientos y el desarrollo de genéticas con alta homocigosis o las denominadas líneas puras (Gurmu et al., 2013). También dificulta los estudios genéticos, que requieren de contar con parentales puros para la evaluación de dosis alélicas, entre otras. La incompatibilidad cruzada dificulta el progreso del mejoramiento pues padres con caracteres deseados, como la resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía, destacados niveles de proteínas, vitaminas, macro y micronutrientes y materia seca, pueden pertenecer a un mismo grupo de incompatibilidad (Charles et al., 1973), y por lo tanto no ser capaces de producir semillas viables cuando son cruzados (Vimala y Hariprakash, 2011). De este modo los nuevos genotipos son desarrollados a partir de la recombinación de un híbrido hexaploide altamente heterocigota con otro híbrido hexaploide altamente heterocigota, siendo muy difícil obtener éxito en combinaciones específicas y haciendo que las semillas de batata provenientes de cruzamientos controlados tengan un gran valor (Grüneberg et al., 2015). Algunas técnicas para superar las limitaciones de la autoincompatibilidad o de la incompatibilidad cruzada han sido evaluadas en *I. batatas*. Charles et al. (1973), mediante la remoción de los lóbulos estigmáticos evitaron un retraso en la penetración del tubo polínico y sumado a la aplicación de 2,4D a los pedicelos consiguieron suprimir el

proceso de abscisión, proveyendo un tiempo adecuado para que la penetración de los tubos polínicos ocurra, obteniéndose como resultado fertilización y producción de semillas en cruzamientos normalmente incompatibles. La aplicación de distintas concentraciones de sacarosa sobre los estigmas escindidos, sumado al uso de 2,4D sobre los pedicelos permite también incrementar el éxito de los cruzamientos (Susanto et al., 2013).

A pesar de ser un mecanismo que genera dificultades al mejorador en la tarea de autopolinizar y obtener líneas endocriadas en especies autoincompatibles, la autoincompatibilidad es usada para facilitar los cruzamientos entre líneas autoincompatibles y producir semilla híbrida. Además, como fue mencionado anteriormente, mantiene la variabilidad genética de la especie y el nivel de heterocigosidad. A la vez que provee un medio para controlar las polinizaciones en algunas especies donde otros mecanismos, como la androesterilidad, no están presentes (Sleper y Poehlman, 2006). Clones que son autoincompatibles pero compatibles entre sí, pueden ser plantados en sitios aislados y cruzarse exitosamente mediante insectos polinizadores, constituyendo parcelas de policruzamiento (Gurmu et al., 2013).

2.1.5 Genética de la especie

El conocimiento de la constitución genómica, la segregación y el tipo de apareamiento entre cromosomas resulta información relevante a la hora de analizar la información genética y de pensar estrategias de mejoramiento en la especie. Originalmente, se proponían diferentes patrones de segregación de la especie (Disómica, tetrasómica/tetradisómica y hexasómica) de acuerdo al carácter evaluado y según observaciones citológicas.

Las proporciones de segregación observadas (presencia/ausencia) del carácter a evaluar en la progenie, se realizan de acuerdo a la dosis alélica o dosaje predicho, de acuerdo a las cuatro hipótesis citológicas propuestas por Jones (1967) y resumidas por Kriegner et al. (2003) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Tasa de segregación esperada para la herencia de un gen simple en una planta hexaploide (Fuente: Kriegner et al. 2003). a) Herencia disómica. b) Herencia tetrasómica. C) Herencia tetradisómica.

Dosaje alélico	Hipótesis I		Hipótesis II y III		Hipótesis IV	
	Autohexaploide (hexasómico)		Tetradiploide (tetradisómico, tetrasómico, disómico)		Alohexaploide (disómico)	
Simple	Aaaaaa	1:1	Aaaa aa	1:1	Aa aa aa	1:1
			aaaa Aa	1:1		
Doble	AAaaaa	4:1	AAaa aa	5:1b	Aa Aa aa	3:1
			Aaaa Aa	3:1c		
			aaaa AA	1:0a	AA aa aa	1:0
Triple	AAAaaa	19:1	AAAa aa	1:0	Aa Aa Aa	7:1
			AAaa Aa	11:1		
			Aaaa AA	1:0	AA Aa aa	1:0
Cuádruple	AAAAaa	1:0	AAAA aa	1:0	AA Aa Aa	1:0

La compleja naturaleza de la especie (ploidía, número de cromosomas, autoincompatibilidad) ha dificultado alcanzar un consenso hasta el día de hoy sobre la constitución genómica de la especie: hexaploide con $2n=6x=90$ cromosomas (Ting y Kehr, 1953; Jones 1965, Magoon et al., 1970). Las hipótesis acerca de la constitución genómica en batata fueron variando a lo largo del tiempo, proponiéndose como un

alopoliploide (Ting y Kehr, 1953), o un auto-alopoliploide con dos genomas con un alto grado de homología y un tercero más distante (B1B1B1B1B2B2B) (Magoon, 1970; Shiotani y Kawase, 1989) que muestran diferentes tasas de segregación según el carácter evaluado (segregación hexasómica y tetradisómica) (Kumagai et al., 1990; Mwanga et al., 2002). Trabajos más recientes utilizando marcadores moleculares, sustentan la idea de autoploidía con algunos apareamientos preferenciales entre cromosomas (Ukoskit y Thompson, 1997; Kriegner et al., 2003; Cervantes-Flores et al., 2007; Chang et al., 2009 y Mollinari et al., 2019). Gao et al. (2020) proponen que el genoma de la batata tiene tres subgenomas diploides parcialmente diferenciados provenientes de especies de orígenes muy cercanos, no pudiendo describirse de manera simplificada como alo o autohexaploide.

Para abordar la primer hipótesis (Existe una relación de dominancia entre los diferentes haplotipos del locus de incompatibilidad que explica la existencia de un genotipos autocompatibles) se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Verificar el mecanismo de auto(in)compatibilidad en *Ipomoea batatas*.
2. Determinar si existen relaciones de dominancia entre la autocompatibilidad/ autoincompatibilidad.
3. Evaluar la tasa de segregación del carácter según las diferentes hipótesis que existen para la especie.
4. Proponer un mecanismo que explique la ruptura de la autoincompatibilidad.

2.2 Materiales y métodos

Las actividades tuvieron lugar entre 2017 y 2021 en la EEA San Pedro, Provincia de Buenos Aires. Fueron desarrolladas en el transcurso de cuatro años: en el primero se generaron las dos progenies segregantes, y en los posteriores se realizaron las autopolinizaciones, las retrocruzas y demás evaluaciones.

2.2.1 Material vegetal

Se cuenta con dos genotipos caracterizados en relación a su autoincompatibilidad. El genotipo parental P30, autocompatible, procedente de la Provincia de Buenos Aires (Argentina) que presenta piel y pulpa color crema y hábito de floración profuso. El genotipo parental P28, autoincompatible, procedente de Estados Unidos de América (denominado cultivar Southern Delite), que presenta piel y pulpa color anaranjado y hábito de floración profuso. Ambos genotipos pertenecen a distintos grupos de incompatibilidad, por lo que es posible su cruzamiento y la generación de una progenie contrastante. El estatus en relación al sistema de incompatibilidad de cada uno de los genotipos fue determinado por la evaluación en 30 flores para la presencia o ausencia de cápsulas después de una autopolinización (Arizio, 2011). El término F1 (primera generación filial) refiere a la descendencia que resulta del cruce de dos organismos homocigotos. Debido a la imposibilidad de obtener líneas puras en batata, en este trabajo llamaremos C(28x30) a la progenie obtenida a partir de estos dos genotipos parentales seleccionados. La progenie obtenida a partir del autocruzamiento del genotipo autocompatible se denomina S1(30x30).

Los genotipos parentales fueron solicitados al Banco Activo de Germoplasma de Batata del Instituto de Recursos Biológicos (IRB) del CNIA INTA e introducidos en la cámara de crecimiento *in vitro* de la EEA San Pedro para su multiplicación. Una vez obtenido un número considerable de clones de ambos genotipos, 15 individuos de cada

material fueron trasplantados a una cámara de crecimiento *indoor* (24°C, Humedad ambiente e iluminación led con 13 horas de luz y 11 de oscuridad) donde se rusticaron para luego dar comienzo a la investigación.

2.2.2 Desarrollo de dos progenies para la evaluación del carácter auto(in)compatibilidad.

Esta etapa se llevó a cabo en un invernáculo tipo túnel de 8 m de ancho por 16 m de largo. Se extendió desde octubre de 2017 hasta abril de 2018. Quince plantas de ambos genotipos parentales crecieron en macetas colgantes de 2,5 l sujetas a una estructura montada dentro del invernáculo, quedando las mismas a 1,5 m del suelo. Se utilizó sustrato Grow Mix® Multipro. Las mismas fueron regadas por goteo, tres veces por día con solución nutritiva Hakaphos® Rojo. Ambos genotipos presentaron floración profusa sin necesidad de ser injertadas ni conducidas verticalmente.

Desde febrero hasta abril de 2018 se realizaron cruzamientos entre el genotipo autoincompatible P28♀ y el autocompatible P30♂ con el fin de generar la progenie C(28x30). El genotipo P30 fue usado como dador de polen mientras que el genotipo P28 usado como planta receptora. Paralelamente, se realizaron autocruzamientos en P30 para obtener la progenie endocriada S1(30x30).

Flores de ambos genotipos fueron embolsadas entre las 12:00 y 15:00 hs del día previo a antesis. El día de antesis las bolsas fueron retiradas y con pinzas de acero inoxidable se extirparon anteras de P30 y se frotaron contra el estigma de P28. En paralelo, anteras del P30 fueron frotadas contra el estigma de la misma flor. Luego fueron nuevamente cubiertas con bolsas de papel. Entre cada cruzamiento o autopolinización las pinzas fueron esterilizadas sumergiéndolas en alcohol (98%) y flameadas para evitar contaminación. A los 30 días de realizados los cruzamientos, siempre y cuando los frutos se encontraran maduros, fueron cosechados, rotulados y almacenados. A partir de las

semillas de cada tipo de cruzamiento realizado se obtuvieron las dos progenies C(28x30) y S1(30x30).

En septiembre de 2018 se seleccionaron al azar 35 semillas por tipo de cruzamiento, fueron escarificadas en ácido sulfúrico por 20 minutos (Van Rheenen, 1964), enjuagadas y colocadas a germinar sobre papel en placa de petri en cámara de crecimiento *in vitro*, a 24 °C. Una vez emitida la radícula y expandidos los cotiledones fueron trasplantadas a bandejas speedlings con sustrato Grow Mix® Multipro y ubicadas en invernadero para su desarrollo. En diciembre de 2018 se trasplantaron a campo, en dos camellones, a 1,2 m de distancia y se condujeron verticalmente (en espaldera) sobre una estructura ideada para tal fin. Una vez que los tallos de los genotipos de ambas progenies alcanzaron un diámetro de 50 mm, se procedió a extraer guías de 15 cm de largo para ser injertadas e inducir la floración. A partir de este momento las progenies se mantuvieron duplicadas, una creciendo a campo y la otra injertada en invernáculo. Sobre esta última se realizó la investigación que se plantea en este trabajo.

2.2.3 Evaluación del estatus SI en *Ipomoea batatas*

Una vez obtenidas ambas progenies, las actividades orientadas a la evaluación del estatus SI se realizaron en tres temporadas (2018/2019, 2019/2020 y 2020/2021). El primer ciclo comenzó en agosto de 2018 (debido a la necesidad de acondicionar el invernáculo y establecer los portainjertos) y se extendió hasta marzo de 2019. El segundo año comenzó en octubre de 2019 y concluyó en abril de 2020 y el tercer año comenzó en octubre de 2020 extendiéndose hasta abril de 2021. Si bien el tiempo de trabajo por ciclo se aproxima a los 7 meses, es necesario aclarar que debido a las condiciones climáticas y de fotoperiodo de la zona norte de la Provincia de Buenos Aires, solo 2 meses son adecuados para realizar cruzamientos exitosos (febrero y marzo).

La evaluación se llevó a cabo en el mismo invernáculo tipo túnel, de 8 m de ancho y 16 m de largo. El suelo fue trabajado con cincel y rastra de discos. La superficie total fue dividida en 6 camellones de 14 m de largo distanciados a 0,8 m entre ellos. Se instaló un sistema de riego por goteo y los camellones fueron cubiertos con mulching plástico negro para controlar la emergencia de malezas y conservar la humedad del suelo. En octubre se trasplantaron 90 plantines de *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Mart. ex Choisy) D.F.Austin obtenidos a partir de semilla cosechada en la EEA San Pedro. El diseño fue a tresbolillo, 15 plantas por camellón a 0,90 m entre las mismas. Una vez que los tallos de los portainjertos alcanzaron 1 cm de diámetro, se procedió a tomar guías de ambas progenies segregantes (que se encontraban creciendo en espaldera a campo) e injertarlas sobre los mismos para favorecer la floración de todos los genotipos (Jones et al., 1986) (Figura 2.3).



Figura 2.3 Disposición de genotipos parentales y progenies injertados en invernáculo.

Se realizaron autopolinizaciones (ver detalle más abajo) para determinar su *estatus* de autoincompatibilidad y se llevó adelante un esquema de cruzamientos contra sus progenitores para evaluar la incompatibilidad cruzada (Figura 2.4). Siempre que se

presente un cruzamiento dirigido, en la denominación del cruzamiento, el primer genotipo corresponde al que actuó como femenino y el segundo al que actuó como masculino.

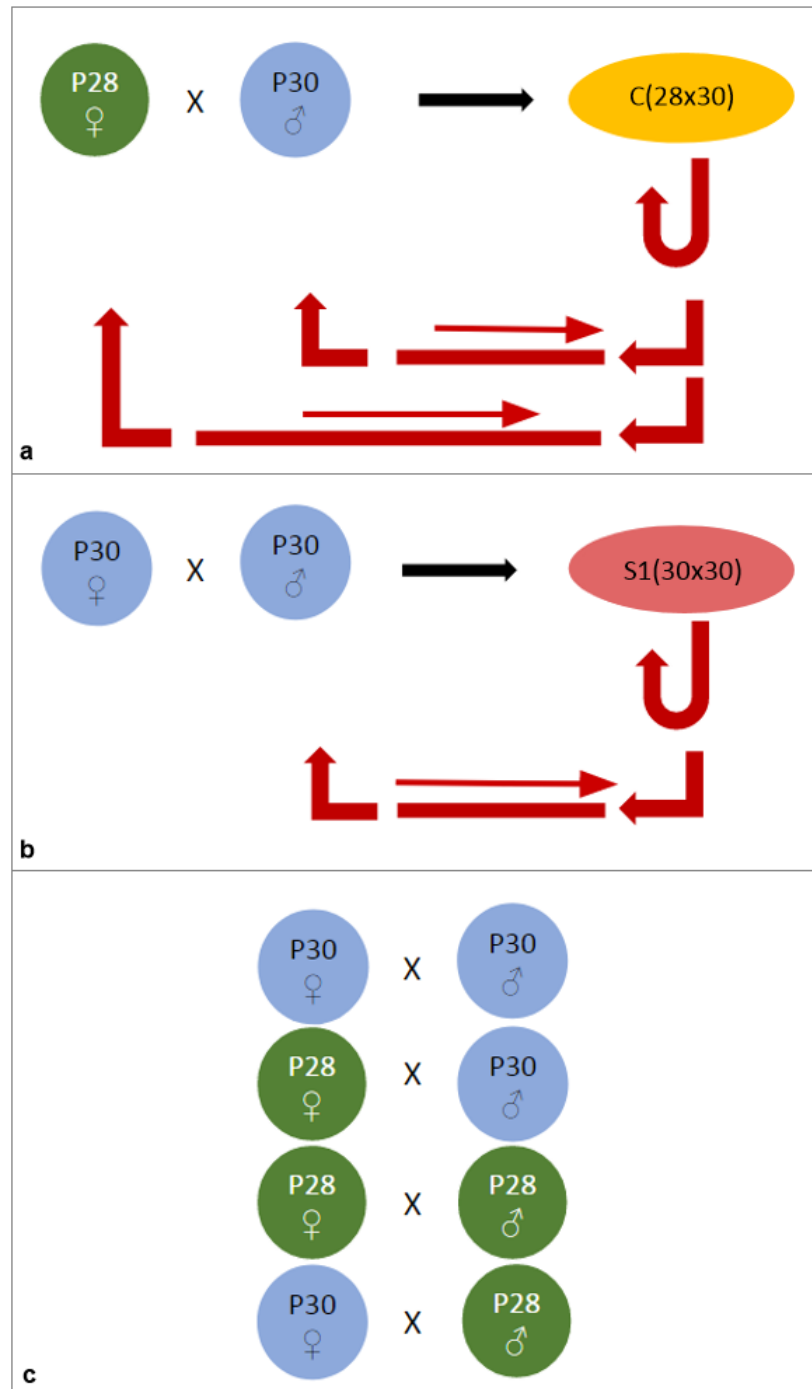


Figura 2.4 Esquema de autocrucamientos, cruzamientos y retrocruzamientos realizados. a) Autocrucamientos y retrocruzamientos en C(28x30). b) Autocrucamientos y retrocruzamientos en S1(30x30). c) Autocrucamientos y cruzamientos dirigidos entre parentales.

2.2.3.1 Tipos de cruzamientos evaluados

- Autopolinizaciones y cruzamientos dirigidos entre parentales P28 y P30

-P30 ♀ (autocompatible) x P30 ♂ (autocompatible)

-P28 ♀ (autoincompatible) x P30 ♂ (autocompatible)

-P30 ♀ (autocompatible) x P28 ♂ (autoincompatible)

-P28 ♀ (autoincompatible) x P28 ♂ (autoincompatible)

Se realizaron al menos 30 autopolinizaciones y cruzamientos dirigidos entre los genotipos parentales para confirmar su estado de autoincompatibilidad y de compatibilidad cruzada entre ellos.

- Autopolinizaciones en genotipos C(28x30) y S1(30x30)

Se realizaron al menos 30 autopolinizaciones sobre cada genotipo. La información obtenida permitió definir qué genotipos debían ser emasculados al ser utilizados como parental femenino en las retrocruzas.

- Retrocruzas C(28x30)

-P30 ♀ (autocompatible) x C(28x30) ♂

-C(28x30) ♀ x P30 (autocompatible) ♂

-P28 ♀ (autoincompatible) x C(28x30) ♂

-C(28x30) ♀ x P28 (autoincompatible) ♂

Se realizaron al menos 10 retrocruzas por tipo de cruzamiento. El polen de cada individuo C(28x30) se llevó hacia cada uno de sus progenitores y de ambos progenitores hacia cada individuo C(28x30). Se procedió a emascular las flores utilizadas en los cruzamientos que tuvieron a P30 (autocompatible) como parental femenino, y a las flores de los genotipos C(28x30) que fueron caracterizados como autocompatibles, cuando fueron utilizadas como parental femenino en las retrocruzas tanto contra P28 como P30.

- Retrocruzas S1(30x30)
 - P30 ♀ (autocompatible) x S1(30x30) ♂
 - S1(30x30) ♀ x P30 (autocompatible) ♂

Se realizaron al menos 10 retrocruzas por tipo de cruzamiento. Consistió en llevar polen de cada individuo S1 a su progenitor (P30) y de este último hacia cada individuo S1. Se procedió a emascular las flores utilizadas en los cruzamientos que tuvieron al P30 (autocompatible) como parental femenino, y a las flores de los genotipos S1(30x30) que fueron caracterizadas como autocompatibles, cuando fueron utilizadas como parental femenino en las retrocruzas contra el genotipo P30.

El procedimiento consistió en la protección de las flores con bolsas de papel entre las 13:00 y 15:00 hs del día antes de anthesis. Los genotipos identificados como autocompatibles debieron también ser emasculados antes de ser cubiertos por las bolsas. Este procedimiento consistió en hacer una incisión en la corola aún cerrada y la extirpación de las anteras con la ayuda de pinzas de acero inoxidable. Los cruzamientos se llevaron a cabo el día de anthesis entre las 8:00 y las 10:00 hs, momento en que la superficie del estigma y el estilo están receptivos (Charles et al., 1973; Wang, 1963). Las bolsas fueron cuidadosamente descubiertas y con pinzas de acero inoxidable se extirparon anteras de los distintos genotipos y se frotaron contra su propio estigma o el que correspondiera según el cruzamiento que se estuviera realizando. Entre cada cruzamiento o autopolinización las pinzas fueron esterilizadas sumergiéndolas en alcohol (98%) y flameadas para evitar contaminación. Se identificaron los distintos cruzamientos debidamente con etiquetas y cintas de distintos colores según correspondiera (Figura 2.5). Las cápsulas desarrolladas y maduras se cosecharon a los 30 días de haberse realizado el cruzamiento (Charles et al., 1973).



Figura 2.5 a. Flor de batata día previo a antesis. b. Inflorescencia de batata. c. Cápsulas autopolinizadas en proceso de formación. d. Cápsulas en estado de madurez. e. Semillas de batata.

2.2.4 Análisis estadístico

La variable estudiada fue la Presencia o Ausencia de Cápsulas (n° de cruzamientos positivos/n° de polinizaciones realizadas) y el Número de semillas por fruto (n° semillas/fruto) Es importante explicitar que fue considerado autocompatible o compatible cualquier cruzamiento que haya generado por lo menos un fruto y a partir del cuál se confeccionó un índice al que se denominó % de Autocompatibilidad (o de compatibilidad). El mismo es una relación de los cruzamientos positivos con los cruzamientos totales. Se estimó el % de Autocompatibilidad en el genotipo parental P30 y en los genotipos autocompatibles de las progenies C(28x30) y S1(30x30). También se

estimó el % de Compatibilidad (recíprocamente) entre ambos genotipos parentales y entre los mismos y los genotipos de las dos progenies generadas.

Se realizaron test de χ^2 para corroborar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el número total de genotipos autocompatibles encontrados entre ambas progenies. También se evaluó la compatibilidad entre los distintos tipos de cruzamiento dirigido recíproco: Se evaluó la existencia de diferencias entre los cruzamientos recíprocos entre ambos parentales, entre los cruzamientos recíprocos de la progenie C(28x30) con ambos parentales, y entre los cruzamientos recíprocos de la progenie S1(30x30) con su parental. Se utilizó el software RStudio®.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Evaluación de genotipos parentales

El parental P30 se autopolinizó manualmente 78 veces dando un total de 46 cruzamientos positivos (59%), mientras que el parental P28 se autopolinizó 44 veces dando 0 (cero) cruzamientos positivos. Confirmando que P28 es un genotipo autoincompatible, mientras que P30 es autocompatible.

El cruzamiento dirigido recíproco entre los genotipos parentales presentó diferencias significativas ($\chi^2=10,85$; $gl=1$; $p=0,001$). Cuando P28 fue usado como femenino y P30 como masculino se obtuvo un total de 9 frutos al cruzarse 43 veces (20,9%), mientras que en el cruzamiento recíproco, de 35 cruzamientos, se obtuvieron 21 frutos (60%). Murata y Matsuda (2003) encontraron marcadas diferencias en el porcentaje de formación de cápsulas entre los cruzamientos recíprocos de dos genotipos (Kyushu No. 58 y F683-4(B)). Dichas diferencias se encontraban relacionadas con el número promedio de tubos polínicos encontrados atravesando el estilo, diferencias que los autores asociaron directamente a la anatomía del gineceo del parental que actuó como femenino.

Mediante el autocruzamiento del P30 se obtuvo la progenie S1(30x30). Debido a fallas en el proceso de germinación y en estado de plántula se alcanzó una progenie de 33 genotipos (45% de éxito de semilla a planta adulta: 54% de poder germinativo y 83% de sobrevivencia de plántula a planta adulta). Martin (1967) describió como causas de esterilidad en batata la baja germinación de semillas y la obtención de plántulas pequeñas y débiles. En sus observaciones sólo un 50% de las semillas evaluadas consiguieron germinar (siendo las mismas las de mayor peso) y un 10% de las plántulas evaluadas morían antes de ser llevadas a campo. Estas características podrían estar acentuadas en la progenie endocriada. En este sentido Hull-Sanders et al. (2005) trabajando en *Ipomoea hederacea* (Jacq.) encontró una disminución en el número de semillas germinadas y un

aumento del tiempo de germinación de semillas resultantes de autopolinizaciones en comparación con las obtenidas por polinizaciones cruzadas.

A partir del cruzamiento dirigido entre P28 (♀) y P30 (♂) se obtuvo la progenie C(28x30). La misma contó con 35 genotipos. El 100% de las semillas obtenidas mediante este cruzamiento no presentaron problemas en la germinación, y las plántulas originadas alcanzaron el estado adulto sin ocasionar pérdidas en este periodo.

2.3.2 Evaluación de genotipos C y S1

Para la evaluación del carácter AC en los individuos de ambas progenies, se realizaron un mínimo de 30 autopolinizaciones por cada individuo C y S1 (2050 autocruzamientos totales) y se registró la presencia o ausencia de cápsulas, como indicador de AC. En la progenie C(28x30) se encontraron 6 genotipos AC y en la progenie S1(30x30) 4 genotipos AC (Tabla 2.2). Los genotipos AC se elevaron a 7 en la progenie C(28x30) y a 6 en la S1(30x30) luego de detectar crecimiento de tubos polínicos en los gineceos de genotipos caracterizados inicialmente como AI por la ausencia de cápsulas (D34, E13 y E22) (ver capítulo 4). La prueba de χ^2 no detectó diferencias significativas para el número de genotipos AC presentes entre ambas progenies ($\chi^2=0,06$; $gl=1$; $p=0,809$).

Tabla 2.2 Autocompatibilidad (%) detectada en ambas progenies a campo

Progenie	Genotipo	Nº autocruzas	AC (%)
-	P30	78	59,00
C(28x30)	D3	34	20,60
C(28x30)	D6	34	14,70
C(28x30)	D27	34	20,60
C(28x30)	D28	34	5,90
C(28x30)	D30	34	11,80
C(28x30)	D31	36	13,90
S1(30x30)	E5	36	2,80
S1(30x30)	E11	35	2,90
S1(30x30)	E28	41	4,90
S1(30x30)	E39	19	5,30

El conteo de formación de cápsulas como medida de compatibilidad podría llevarnos a una subestimación del carácter, debido a la superposición de este mecanismo con problemas de fertilidad, dado que ambos impactan en el proceso de formación de semillas. Este último dato advierte sobre la necesidad de incorporar otro tipo de evaluaciones complementarias para determinar la presencia o ausencia del carácter AC (ver capítulo 4) y diferenciar los diferentes procesos que afectan la reproducción sexual. La falta de frutos cuajados en estos individuos definidos inicialmente como AI, no estaría explicada por el sistema de autoincompatibilidad (visto la germinación del tubo polínico), sino por algún proceso posterior a la germinación de los granos de polen en el estigma. En este sentido, Martin y Cabanillas (1966), observan en tres tipos de cruzamientos compatibles, un gran número de granos de polen germinados en la superficie del estigma, pero solo una fracción de ellos pasa del estigma al estilo y lo atraviesan (número promedio de tubos polínicos: 19,6 en el estigma, 6,1 en el estilo superior, 5,7 en el estilo medio y 5

en el estilo inferior). Detectan también un amplio rango en el cuajado del fruto que va desde el 42,3% en algunos cruzamientos al 6,4% en otros. En dos tipos de cruzamiento, el número de tubos polínicos que penetraron en el estilo inferior fue aproximadamente 6 veces el número medio de semillas por polinización, indicando algún problema posterior a la germinación del polen y la llegada a la parte inferior del estilo.

En genotipos considerados AC, todos los autocruzamientos deberían tener la capacidad de formar frutos con semillas. Para un genotipo dado, todos los estigmas de dichas plantas llevarán la misma información genética, y debido a que el fenotipo del grano de polen depende del fenotipo del esporofito que lo produjo, todos los granos de polen expresarán en su cubierta la misma información. Aun así, en cruzamientos considerados autocompatibles o compatibles no se observó un 100% de cruzamientos positivos. Al comparar % de Autocompatibilidad entre progenies se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=6,105$; $gl=1$; $p=0,013$). En los individuos autocompatibles de la progenie C(28x30) se observaron valores entre 20,6 y 5,9% mientras que en los de la progenie S1(30x30) se observaron valores entre 5,3 y 2,8%. Ambas progenies muestran una disminución respecto al parental autocompatible P30 (59%) (Tabla 2.2). Esta dificultad para formar frutos, y las diferencias en el número de frutos formados entre genotipos está asociada entre otras cosas a que luego de ocurrida la polinización operan una serie de procesos ajenos al sistema de incompatibilidad, como la baja viabilidad del polen, irregularidades en el número de óvulos, fallas en el crecimiento del tubo polínico y dificultad del mismo para atravesar el estilo o fallas en el desarrollo del embrión (Martin, 1967; Martin y Cabanillas, 1966; Martin y Ortiz, 1966; Kokobu et al., 1982; Mont et al., 1993).

La marcada reducción en el % de AC en los individuos de la progenie S1(30x30) podría en parte estar explicada por un efecto de depresión endogámica observada como

una disminución en el *fitness* general y en especial de aquellos caracteres asociados a la reproducción (plantas menos vigorosas, menor cantidad de flores y más pequeñas, menor número y viabilidad de polen, baja viabilidad de semillas y muerte al estado de plántula). Busch (2005) estudiando poblaciones autocompatibles y autoincompatibles de *Leavenworthia alabamica* (Rollins) (Brassicaceae) encontró diferencias respecto a biomasa y a 10 caracteres reproductivos. En el mismo sentido, Stephenson et al. (2001) observaron en dos especies de cucurbitáceas una disminución en la performance de los microgametofitos a medida que aumenta el nivel de endocría. La reducción, en individuos endocriados, en la capacidad para aprovisionar recursos al desarrollo de los órganos reproductivos es considerada por los autores como una de las causas de esta disminución. Cravero et al. (2002) definen a la depresión por endocría como la reducción del valor fenotípico medio mostrado por los diferentes caracteres conectados con la capacidad reproductiva o la eficiencia fisiológica del cultivo, que se produce como consecuencia directa del proceso de obtención de líneas e independientemente del sistema de apareamiento utilizado. Los autores proponen que en la mayoría de las especies alógamas, esta depresión comienza en la primera generación de autofecundación pudiendo afectar severamente el proceso de endogamia pero no necesariamente inhibirlo. Hull-Sanders et al. (2005) generaron dos progenies a partir de semillas obtenidas de una población de *Ipomoea hederácea* (especie autocompatible, con un sistema de apareamiento mixto). Encontraron que, creciendo en condiciones de invernáculo, la progenie generada a partir de autocruzas presentaba menor crecimiento vegetativo y menor número de estructuras reproductivas respecto a la progenie generada mediante polinización cruzada. Los autores no encontraron depresión por endocría en las mismas variables, al repetir los tratamientos partiendo de semillas obtenidas de otra población de la misma especie, resultados

similares a los obtenidos por Mason et al. (2015) en *Ipomoea purpurea* (L.) Roth (especie autógena con un sistema de apareamiento mixto).

Respecto a la depresión endogámica, Alcántar Vázquez (2015) y Busch (2005) afirman que es causada tanto por la fijación de alelos deletéreos, como por la pérdida de variación alélica en loci con superioridad heterocigótica. Harder et al. (2011) sugieren que la depresión por endogamia es particularmente relevante en poblaciones de individuos hermafroditas que son capaces de autocruzarse, y que a pesar de que la misma podría producirse a lo largo de todo el ciclo de la vida, pareciera que actúa con especial intensidad poco después de la fecundación ya que los alelos letales recesivos se expresan en los cigotos y/o embriones recién formados. Alcántar Vázquez (2015) sugiere que los individuos poliploides presentarían cierta ventaja sobre los diploides debido a su habilidad para enmascarar mutaciones deletéreas. Si bien una mutación deletérea tiene más posibilidades de ser enmascarada en individuos que presentan mayoría de alelos no mutados, también esta situación permitiría que la mutación enmascarada se establezca y alcance una frecuencia más alta.

2.3.3 Evaluación de genotipos C y S1 contra sus progenitores

Con el fin de evaluar las relaciones de dominancia entre los haplotipos del locus *S* de los genotipos de ambas progenies y sus parentales, se realizaron un total de 2044 retrocruzamientos recíprocos.

2.3.3.1 Cruzamiento progenie S1(30x30) x P30

Considerando que existe una alta probabilidad de que los genotipos utilizados como parentales sean híbridos heterocigotas, se espera que en la progenie S1(30x30) aumente la homocigosis del locus *S* y por lo tanto observar un menor número de combinaciones compatibles entre el parental P30 y la progenie S1(30x30). Analizando las retrocruzamientos

entre P30 y la progenie S1(30x30) se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de cruzamiento ($\chi^2=5,52$; $gl=1$; $p=0.019$). Se observó un menor número de genotipos compatibles para el cruzamiento P30♀ x S1(30x30)♂ (de 33 genotipos, solo 3 fueron cruzamientos positivos) respecto al cruzamiento recíproco S1(30x30)♀ x P30♂ (de 33 genotipos, 12 generaron combinaciones positivas) (figura 2.5).

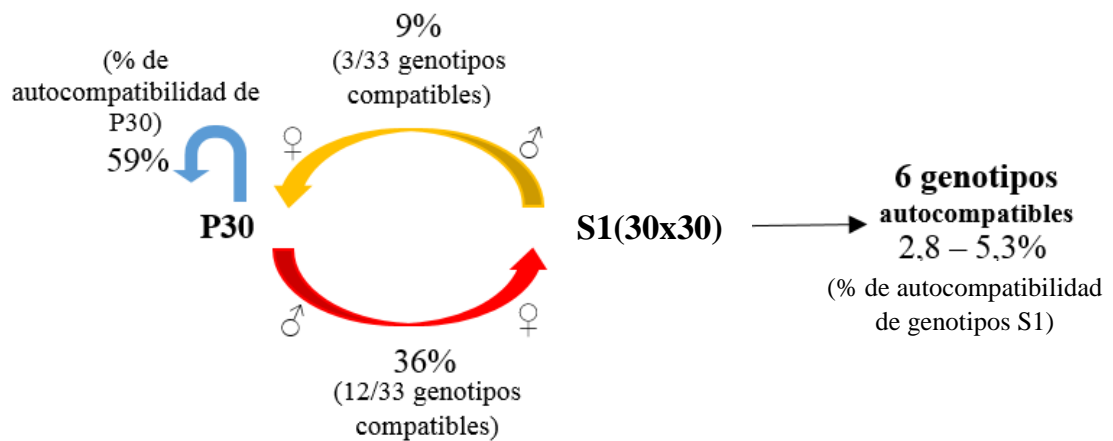


Figura 2.5 Porcentaje de autocompatibilidad en el genotipo parental P30 y en los individuos autocompatibles S1(30x30) y porcentaje de genotipos S1 compatibles con el parental P30.

Esta amplia diferencia entre cruzamientos recíprocos (figura 2.6) deja en evidencia las distintas relaciones de dominancia en el estigma y en la cubierta de los granos de polen de los diferentes haplotipos del locus *S*. Sólo un genotipo (E28) resultó ser compatible contra su progenitor en ambas combinaciones evaluadas. La progenie S1(30x30), presentó 19 genotipos que resultaron incompatibles en cruzamientos recíprocos contra su progenitor P30. Una situación particular corresponde al genotipo E13 que fue el único genotipo caracterizado como autocompatible (ver capítulo 4), que no dió fruto cuando se cruzó recíprocamente contra su progenitor, afectado posiblemente por otros procesos que impiden la formación de semillas.

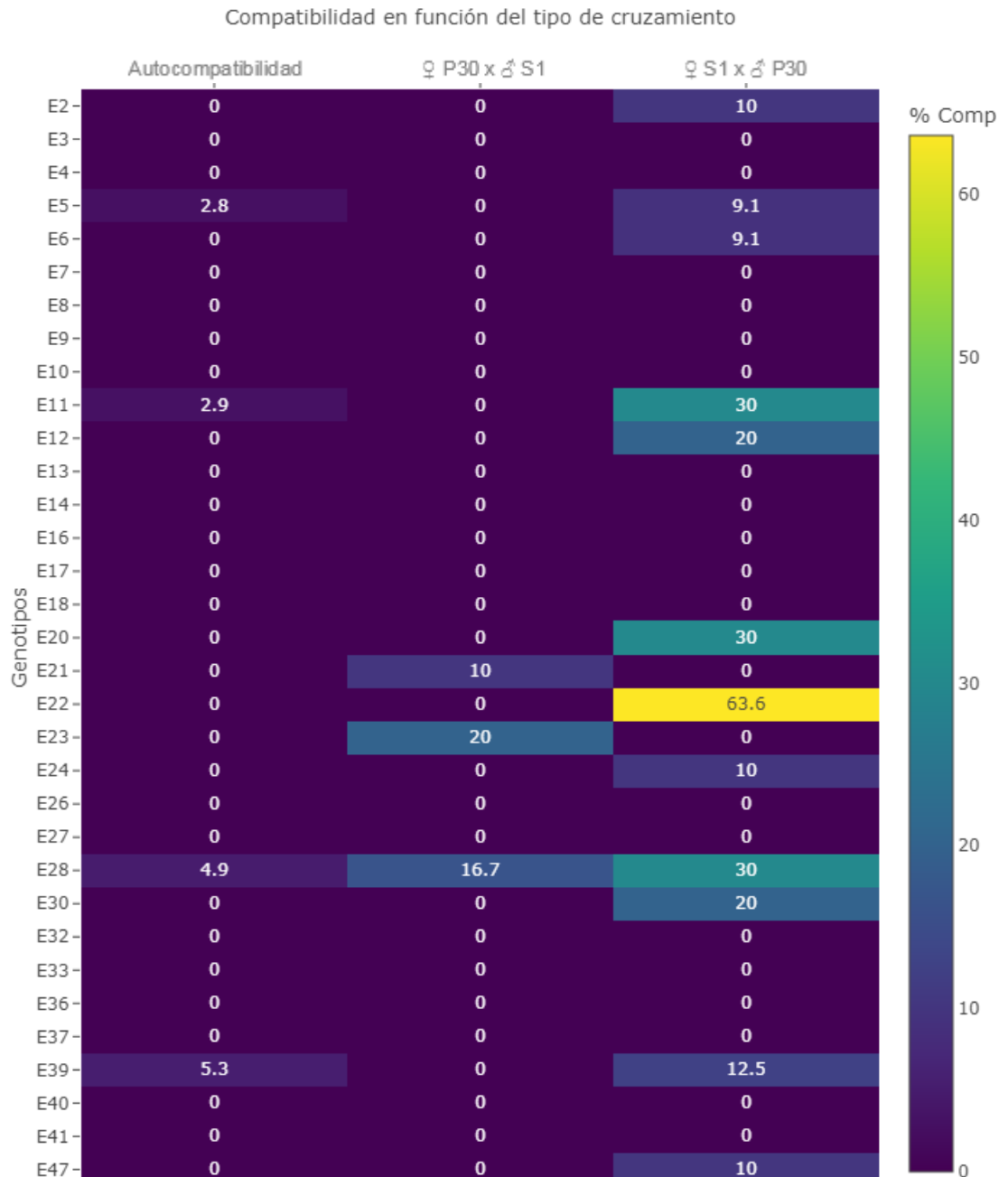


Figura 2.6 Porcentaje de autocompatibilidad y de compatibilidad cruzada de los genotipos S1(30x30) contra su progenitor (recíprocamente).

2.3.3.2 Cruzamiento progenie C(28x30) x P30/P28

En el análisis de las retrocruzas recíprocas entre los genotipos de la progenie C(28x30) contra sus parentales no se encontraron diferencias significativas (C(28x30)xP28: $x^2=0,06$; $gl=1$; $p=0,801$, y C(28x30)xP30: $x^2=0,23$; $gl=1$; $p=0,631$). Sin embargo se observó un menor número de combinaciones positivas en los cruzamientos que involucran a P28 (P28♀ x C♂= 13 positivos de 35 y C♀ x P28♂= 11 positivos de 35),

respecto a las retrocruzas contra el P30 ($P30_{\text{♀}} \times C_{\text{♂}} = 21$ positivos de 35 y $C_{\text{♀}} \times P30_{\text{♂}} = 18$ positivos de 35). Sólo el genotipo autocompatible D30 resultó ser compatible contra sus progenitores en todas las combinaciones evaluadas. La progenie C(28x30) cuenta con 7 genotipos compatibles recíprocamente cuando se retrocruza con P28 y 11 genotipos compatibles recíprocamente cuando se retrocruza con P30 (Figura 2.7).

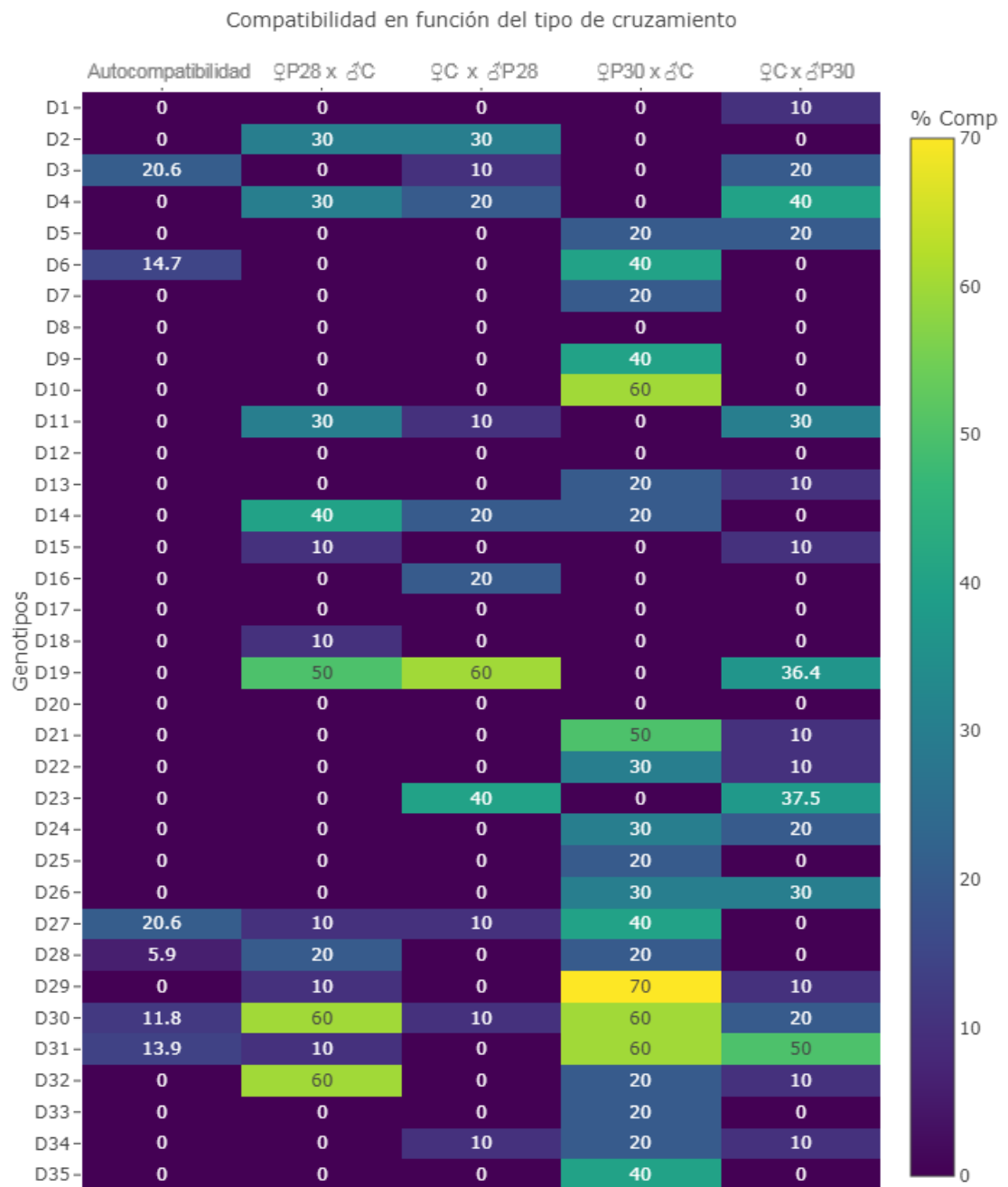


Figura 2.7 Porcentaje de autocompatibilidad y de compatibilidad cruzada de los genotipos C(28x30) contra sus progenitores (recíprocamente).

Respecto a los genotipos que resultaron incompatibles contra sus progenitores (recíprocamente), se detectaron 18 genotipos que resultaron incompatibles contra el progenitor P28 y 7 genotipos que resultaron incompatibles contra el progenitor P30. De dichos genotipos que no generaron cruzamientos recíprocos positivos contra alguno de sus progenitores, sólo 4 no pudieron hacerlo contra ninguno de los dos parentales (incompatibilidad total).

Los cruzamientos unilaterales detectados podrían explicarse por las diferentes relaciones de dominancia de los haplotipos *S* y a la vez podría existir una influencia de las distintas características morfológicas de los gineceos y de los procesos posteriores a la germinación del grano de polen (Martin y Ortiz, 1966). A modo de resumen se presenta la tabla 2.3. La misma muestra los cruzamientos que fueron positivos y negativos considerando los genotipos parentales y las progenies segregantes.

Tabla 2.3 Resumen de tipos de cruzamiento. Los signos + representan la presencia de al menos una combinación positiva. Los valores presentados entre paréntesis corresponden a genotipos compatibles respecto a genotipos totales de la progenie en cuestión.

♀ \ ♂	P30	P28	C(28x30)	S1(30x30)
P30	+	+	+ (21/35)	+ (3/33)
P28	+	-	+ (13/35)	
C(28x30)	+ (18/35)	+ (11/35)		
S1(30x30)	+ (12/33)			

2.3.4 Aproximaciones a la interpretación de un modelo que explique la segregación del locus *S*

Debido a las características de la especie (autoincompatibilidad y, por lo tanto, baja probabilidad de genotipos homocigotas), la población segregante para evaluar un carácter de interés se obtiene a partir de parentales probablemente altamente heterocigotas. Es una población de segregación denominada “pseudo-test cross” (Gratapaglia y Sederoff, 1994). La denominación se refiere a que en el tipo de cruzamiento se desconoce *a priori*

la configuración de los alelos en el locus de interés, pero la misma puede ser reconstruida a partir del análisis de segregación del carácter evaluado.

La evaluación de la segregación del carácter en una progenie F1 permite normalmente deducir la dosis en la que el alelo dominante o aquel relacionado con la expresión del carácter, está presente. En una especie hexaploide cada locus puede tener hasta un máximo de 6 alelos diferentes. Puede haber locus con dosis simples (Aaaaaa), dobles (AAaaaa), triples (AAAaaa), y así hasta dosis sextuples (AAAAAA), y la configuración con alelos recesivos (aaaaaa). Si pensamos en un cruzamiento segregante la situación más simple es aquella en donde uno de los parentales es completamente recesivo (aaaaaa) y el otro presenta dosis simple (Aaaaaa), generando, si no existen distorsiones, una segregación 1:1 en la progenie F1. En este caso, considerando la teoría de un genoma autohexaploide (siendo un parental totalmente recesivo), podemos esperar las siguientes segregaciones de acuerdo a la dosis alélica presente (detalle tabla 2.4, Kriegner et al., 2003). En configuraciones alélicas cuádruples o mayores, no se observa segregación en la población. Este tipo de análisis puede aplicarse en el cruzamiento P28 x P30, que resulta contrastante para el carácter evaluado.

Tabla 2.4 Segregación esperada de acuerdo con la dosis alélica presente al considerar la teoría de un genoma autohexaploide (contemplando un parental totalmente recesivo) (Kriegner et al., 2003).

Marker dosage	Hypothesis I	
	Autohexaploid (hexasomic)	
Simplex	Aaaaaa	1:1
Duplex	AAaaaa	4:1
Triplex	AAAaaa	19:1
Quadruplex	AAAAaa	1:0

También es posible evaluar configuraciones genéticas más complejas cuando ambos parentales comparten el carácter (alelo), pudiéndose observar diferentes tasas de segregación en función de la dosis alélica o dosaje parental (denominados alelos biparentales). Los alelos pueden estar presentes en iguales o diferentes dosis alélicas. La situación más sencilla, es aquella en donde ambos parentales presentan dosis simples (Aaaaaa x Aaaaaa) en el locus a evaluar, y generan una F1 con segregación 3:1 (1AAaaaa:2Aaaaaa:1aaaaaa). Si bien existe un gran número de combinaciones posibles, donde cada genotipo aumenta la dosis alélica (por ejemplo: Aaaaaa x AAaaaaa ó AAaaaaa x AAaaaaa), en el caso de este análisis se realizó un autocruzamiento, por lo que las opciones esperadas se reducen a aquellas donde ambos genotipos tienen el mismo dosaje alélico (una dosis, dos dosis, etc.). Los casos de cuádruple dosis o más no se consideran, ya que no se observará segregación del carácter en la población (todas las gametas contienen alelos dominantes, por lo que toda la progenie deberá presentar el carácter evaluado). En la tabla 2.5, se muestran las segregaciones esperadas para una situación similar a la del cruzamiento P30 x P30, suponiendo formación de hexavalentes durante la meiosis, sin apareamiento preferencial de cromosomas homólogos.

Tabla 2.5 Segregación esperada en el autocruzamiento de un individuo autohexaploide con formación de hexavalentes (Arizio, 2011).

Denominación	Dosis Alélicas	Frecuencias esperadas
Simple-simple	(Aaaaaa x Aaaaaa)	3:1
Doble-doble	(AAaaaaa x AAaaaaa)	14:1
Triple-triple	(AAAaaaaa x AAAaaaaa)	79:1

La situación mencionada considera un locus simple, dos alelos diferentes con distintas dosis y una relación de dominancia lineal (un alelo dominante y los demás recesivos e iguales). Considerando los resultados obtenidos al retrocruzar recíprocamente

los genotipos de ambas progenies, se corroboraron distintas relaciones de dominancia para el carácter AC.

Intentar analizar la segregación del locus *S* con un modelo sencillo como el mencionado anteriormente, no resulta apropiado, considerando que el locus *S* está compuesto por varios genes con distinta relación de dominancia según su sitio de expresión (determinante femenina y masculina). Además, la característica AC en especies con SIE suele ser recesiva y, al ser una especie alógama y hexaploide, los haplotipos *S* son muy numerosos. Visto la complejidad del carácter evaluado, y considerando que no se cuenta con un modelo para realizar un análisis de segregación esperada mediante un test de bondad de ajuste, la evaluación de la segregación del carácter autocompatibilidad en las progenies estudiadas se expresaron como una relación (Kakeda et al., 2000) (tabla 2.6). La progenie C(28x30) presenta una proporción observada del carácter AC cercana al 4:1, indicando un comportamiento recesivo del mismo.

Tabla 2.6 Segregación observada del carácter AC en las progenies C(28x30) y S1(30x30). *Si* = haplotipo autoincompatible y *Sc*= haplotipo autocompatible.

Parental ♀	Parental ♂	Progenie segregante	<i>Si</i> : <i>Sc</i> [Fenotipo]
P28	P30	C(28x30)	28 [<i>Si</i>] : 7 [<i>Sc</i>]
P30	P30	S1(30x30)	27 [<i>Si</i>] : 6 [<i>Sc</i>]

También, se puede observar que en la progenie generada a partir del autocruzamiento del parental P30, el carácter evaluado sólo está presente en 6 de los 33 individuos, acercándose a una proporción 4:1, comportándose también como recesivo. Las segregaciones observadas deberían poder ser interpretadas a partir de un modelo que explique el funcionamiento del SI en la especie. En la bibliografía consultada se plantean dos mecanismos que podrían explicar la ruptura del SI; uno basado en relaciones de dominancia y otro asociado a la pérdida de funcionalidad debido a mutaciones en el haplotipo *S*.

2.3.4.1 Modelo de relaciones de dominancia diferencial entre haplotipos S

Un mecanismo que podría explicar lo observado, es la existencia de distintas relaciones de dominancia en la expresión de los determinantes femeninos y masculinos. Schierup et al. (1997) propone tres modelos simplificados de autoincompatibilidad esporofítica con diferentes relaciones de dominancia en el locus S para especies vegetales diploides. Si bien su desarrollo se basó en un número limitado de investigaciones experimentales, proporciona ejemplos tanto de dominancia como de codominancia de los alelos del sistema de incompatibilidad y de diferencias en las relaciones de dominancia en la expresión en el estigma y en las anteras. El primer modelo (SSI-cod) supone relaciones de codominancia tanto en el estigma como en el polen, por lo cual se expresan ambos alelos del esporofito paterno. El segundo modelo (SSI-dom) supone jerarquías de dominancia tanto en el estigma como en el grano de polen, y el cruzamiento solo es compatible si no se comparten alelos. Y por último, un modelo con codominancia en el estigma y distintas jerarquías de dominancia en el polen (SSI-domcod), donde un cruzamiento es compatible si el fenotipo del polen es diferente al de los dos alelos en el estigma. En los modelos con dominancia (SSI-dom y SSI-domcod), los alelos existentes en la población se ordenan a lo largo de una jerarquía de dominancia lineal para la determinación del fenotipo del polen. Cuando surge un nuevo alelo por mutación, se ubica al azar dentro de la jerarquía de dominancia, y modifica el nivel de dominancia relativo de los alelos existentes. Siguiendo con el autor, menciona que la acción alélica codominante parece ser más común en el estigma, mientras que las relaciones de dominancia son más comunes en el polen. En el mismo sentido, Schoen y Busch (2009) expresan que la dominancia suele ser en general consistente entre el polen y el pistilo, aunque la codominancia ocurre con más frecuencia en el pistilo que en el polen. Los tres modelos podrían estar funcionando paralelamente en *Ipomoea*.

Basado en Schierup et al. (1997), se propone interpretar los resultados a partir de un modelo simplificado para *Ipomoea batatas*, asumiendo relaciones de dominancia lineal entre dos haplotipos S (S_c y S_i) con diferente dosaje y con relaciones de dominancia diferencial en los determinantes masculinos y femeninos.

El modelo más simple para la constitución genética del locus S del parental P30 que se plantea, considera un locus S compuesto por una única dosis del haplotipo S_c (que proporciona la capacidad de auto cruzarse) con distintas relaciones de dominancia sobre otro haplotipo S_i presente en cinco dosis ($S_c S_i S_i S_i S_i S_i$) y sin considerar codominancia. La expresión fenotípica dependerá de las relaciones de dominancia entre los haplotipos del locus S (figura 2.8).

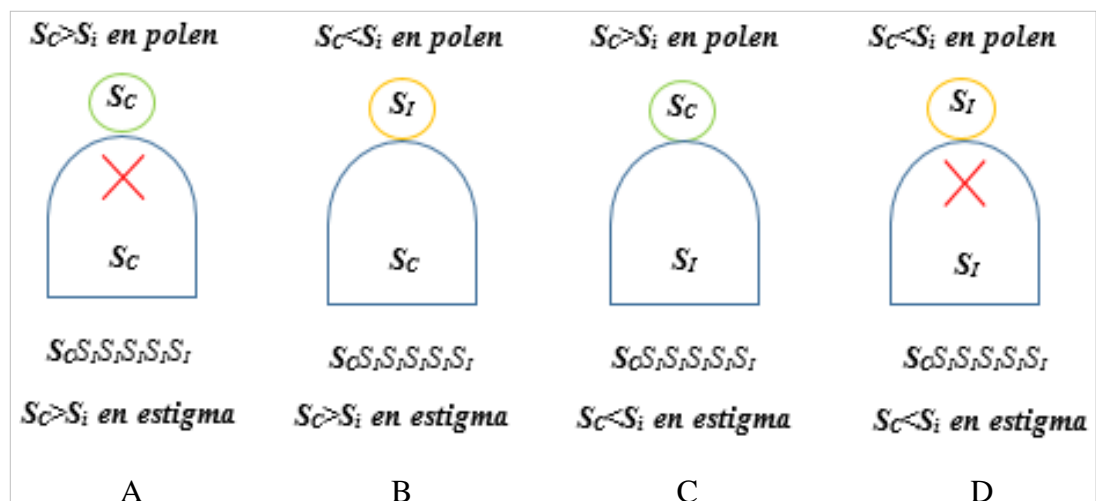


Figura 2.8 Expresión del sistema de incompatibilidad contemplando distintas relaciones de dominancia en los determinantes femenino y masculino del locus S .

A partir del genotipo P30 ($S_c S_i S_i S_i S_i S_i$), se podría obtener una progenie solo en los casos **B** y **C** (cuando el haplotipo S_c presenta dominancia para la determinante masculina y recesividad para la femenina, y viceversa). La progenie generada estaría constituida por tres genotipos: $S_c S_c S_i S_i S_i S_i$, $S_c S_i S_i S_i S_i S_i$, $S_i S_i S_i S_i S_i S_i$. En el último caso, ninguna alternativa generaría un autocruzamiento positivo, mientras que $S_c S_c S_i S_i S_i S_i$ y $S_c S_i S_i S_i S_i S_i$ darían un patrón similar propuesto en el P30.

¿Que se podría observar si se complejiza el modelo, partiendo de un genotipo parental autocompatible, completamente heterocigota, con seis haplotipos diferentes para el locus S ? Si se considera un genotipo con esas características ($S_1S_2S_3S_4S_5S_6$), se generan 15 gametas diferentes, que por autocruzamiento producen 225 genotipos en la progenie, con nuevas combinaciones de haplotipos S que presentarán diferentes relaciones de dominancia/recesividad en la nueva serie alélica conformada, lo que explica la diversidad de situaciones que se observan en los análisis realizados (genotipos autocompatibles, autoincompatibles, genotipos que se cruzan con los parentales de manera recíproca, en un único sentido o no se cruzan). En la figura 2.9 se observan todas las posibles combinaciones de gametas y de la progenie que se genera. El ejercicio de definir posibles fenotipos para el carácter evaluado dependerá del modelo elegido.

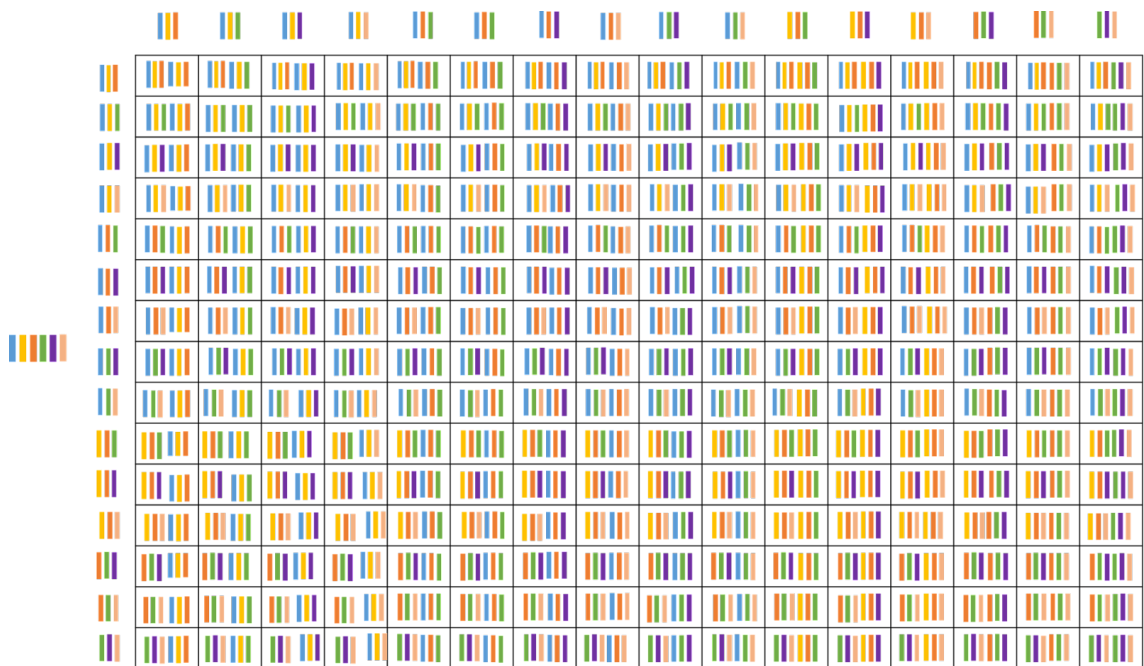


Figura 2.9 Progenie generada a partir del cruzamiento de un genotipo hexaploide bajo la suposición de formación de hexavalentes sin apareamientos preferenciales, con 6 haplotipos diferentes en el locus S . Cada barra representa un haplotipo S . Se muestran las gametas posibles, todas se generan con igual probabilidad.

2.3.4.2 Modelo de ruptura del haplotipo *S*, un alelo *S* mutante con capacidad de anular el sistema de incompatibilidad

Otro modelo que podría explicar la pérdida del SIE en *Ipomoea batatas* contempla una mutación dentro del haplotipo *S* (haplotipo *S* dominante) que genera la pérdida de funcionalidad del gen que codifica para la determinante masculina o femenina, o ambos determinantes. Esta situación fue descrita en *Ipomoea trifida* (Kakeda et al., 2000; Kakeda et al., 2010) y en el género *Brassica* (Okamoto et al., 2007). Varios autores han intentado determinar si las mutaciones que causan la pérdida de la AI se producen en los determinantes masculinos, en los determinantes femeninos o en las vías de señalización descendentes (Kakeda et al., 2000; Tsuchimatsu et al., 2012; Muhammad et al., 2022).

Kowyama et al. (2000) y Kakeda et al. (2000) realizaron análisis genéticos de una variante autocompatible detectada en una población natural de *I. trifida*. Los autores demostraron que la capacidad de autocruzarse se debe a una mutación en el locus *S* y que el alelo *S* mutado (*Sc*) se destaca por su interacción con otros alelos *S* funcionales (*Sc* dominante respecto a *S3* y recesivo respecto a *S1* y *S22*). Esta relación de dominancia resulta llamativa, ya que los alelos *Sc* mutantes son normalmente recesivos frente a los alelos *S* funcionales en los SIE. Kakeda et al. (2000) proponen que en el haplotipo *S* dominante presente en el genotipo autocompatible (MX1) se podrían estar presentando tres escenarios: la mutación sólo en el gen femenino, la mutación sólo en el gen masculino o la mutación en ambos genes. El surgimiento de una mutación en algún gen del locus *S*, rompe la relación existente, generando en un mismo esporofito un alelo nuevo, diferente al existente en los demás genes del locus *S*, evitando el reconocimiento entre las proteínas presentes en el estigma y en la cubierta del polen, permitiendo la posibilidad de la AC. Las mutaciones espontáneas que conducen a la AC fueron reportadas también en el género *Brassica*. Nasrallah et al. (1994) caracterizaron un genotipo mutante AC de

Brassica oleracea (L.), que tiene una mutación de la determinante femenina, perdiendo el estigma la capacidad para distinguir el polen propio. También observaron que la ruptura del reconocimiento del SI se produjo sólo en el determinante masculino, mientras que el SI en la determinante femenina seguía siendo funcional. La progenie derivada de la autofecundación de un genotipo autocompatible (B0479-5) mostró una relación de segregación 3:1 (AI:AC), indicando la herencia recesiva del rasgo AC, situación similar a la observada en nuestras progenies.

Se esquematiza el locus *S* de la propuesta de un haplotipo *Sc* con relaciones de dominancia diferencial entre sus determinantes (figura 2.10) y la propuesta del locus *S* que presenta una mutación en alguno de los determinantes de un haplotipo *S* dominante (figura 2.11).

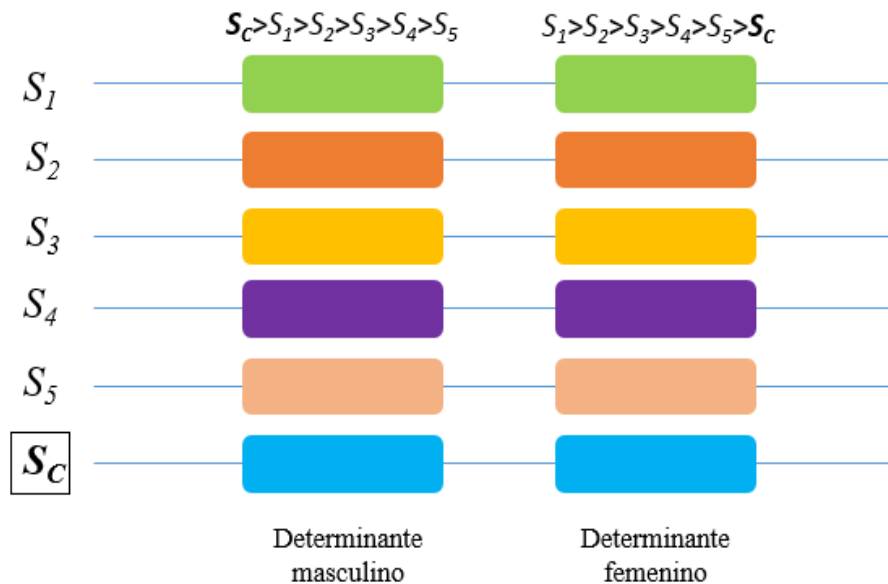


Figura 2.10 Esquema simplificado del Locus *S* para una especie hexaploide. Propuesta que explica la falla del sistema de incompatibilidad mediante relaciones de dominancia diferenciales dentro del locus *S* (un haplotipo funcional *Sc* dominante para una determinante y recesivo para la otra).

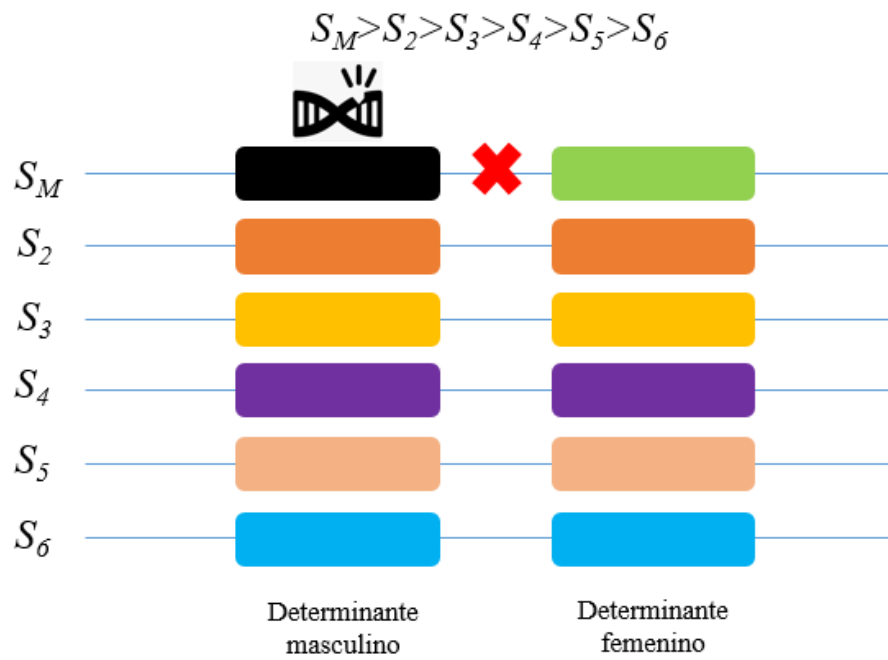


Figura 2.11 Esquema simplificado del Locus S para una especie hexaploide. Propuesta que explica la ruptura del sistema de autoincompatibilidad a partir de una mutación en uno de los determinantes dentro de un haplotipo S dominante.

Capítulo 3 - Evaluación de la fertilidad

3.1 Introducción

En *Ipomoea batatas*, junto al sistema de autoincompatibilidad, un conjunto de complejas barreras de esterilidad impide la formación de semillas luego de la autopolinización y de polinizaciones cruzadas. La evaluación de la incompatibilidad puede ser subestimada cuando es analizada únicamente mediante la fructificación. Frente a una fertilización y embriogénesis normal en una flor de batata deberían esperarse cuatro semillas (Mont et al., 1993). Sin embargo, aún en cruzamientos compatibles, la tasa de formación de frutos por polinización es generalmente baja, y la formación de las cuatro semillas por fruto ocurre muy pocas veces (Kokubu et al., 1982). La ausencia de frutos podría ser resultado de la ocurrencia de otros mecanismos relacionados a la fisiología de la reproducción, que afectan la fertilidad. Es importante distinguir entonces entre el concepto de compatibilidad/ incompatibilidad del de esterilidad, dado que afectan las variables analizadas.

Greulach (1941) considera que una planta es estéril cuando no puede producir descendencia viable. Sleper y Poehlman (2006) definen la esterilidad como todos los casos de infertilidad resultantes de irregularidades en el sistema de reproducción sexual. Específicamente, la esterilidad masculina se define como la incapacidad de producir o liberar granos de polen funcionales y sus manifestaciones son muy diversas (ausencia completa de los órganos masculinos, desarrollo anormal de los tejidos esporogénicos, aborto de los granos de polen en cualquiera de las etapas de desarrollo, ausencia de dehiscencia en los estambres o incapacidad del polen maduro para germinar en un estigma compatible (Budar y Pelletier, 2001)). El concepto esterilidad también involucra la falla en el desarrollo del tubo polínico presentando dificultad para penetrar en el estigma, o un crecimiento muy lento de modo que las gametas masculinas no alcanzan el óvulo para que la fertilización pueda llevarse a cabo.

Por otro lado, la esterilidad femenina se define como la incapacidad de producir sacos embrionarios con oóferas capaces de desarrollar un embrión (Frost y Soost, 1968). Ésta puede resultar del aborto de las partes femeninas o el desarrollo defectuoso del saco embrionario como así también que los mismos alcancen el estado de madurez con posterioridad a la llegada del tubo polínico (Jackson, 1997). Aunque la fertilización ocurra, el embrión o el endosperma podrían no desarrollarse normalmente para producir una semilla viable.

En *I. batatas*, su naturaleza hexaploide y su constitución genómica influyen en el comportamiento de los cromosomas durante la división meiótica generando por un lado gametas no reducidas y otras con menos cromosomas de los esperados. Las gametas desbalanceadas, la existencia de óvulos estériles y de desequilibrios embrionarios podrían explicar la baja producción de semillas en batata (Martin, 1967; Mont et al., 1993) así como la imposibilidad de germinar de semillas pequeñas o débiles (Martin y Cabanillas, 1966). Otros factores señalados como responsables de limitar la potencialidad reproductiva son las irregularidades en el número de óvulos, las enfermedades, anormalidades cromosómicas y la acción de genes de esterilidad (Kokubu et al., 1982).

La esterilidad se encuentra presente en distinta magnitud en todos los cruzamientos (Martin y Ortiz, 1966). La misma se puede deber a la baja viabilidad del polen, fallas en la germinación y procesos posteriores a la misma (Kokubu et al., 1982), que no tienen relación con el sistema de incompatibilidad (Martin, 1967). Entre los impedimentos que pueden ocurrir luego de la germinación del polen, puede darse la reducción en el número de tubos polínicos entre el estigma y los óvulos (Martin, 1967) producto de dificultades en el recorrido que debe hacer el tubo polínico a lo largo del gineceo (Martin y Ortiz, 1966).

Para diferenciar el solapamiento de procesos que afectan la formación de semillas y que son ajenos al sistema de incompatibilidad, resulta necesario cuantificar variables relacionadas con la fertilidad, como son la viabilidad del polen y el número de óvulos.

Lincoln (1982) define a la viabilidad del polen como la capacidad de vivir, crecer, germinar o desarrollarse. Sin embargo, el polen viable podría no germinar (tanto *in vitro* o *in vivo*) si las condiciones no son las adecuadas. El término viabilidad ha sido usado por otros autores también para describir granos de polen capaces de germinar en el estigma, de germinar *in vitro*, granos que son capaces de captar ciertos colorantes, o de producir semilla luego de la fertilización (Dafni y Firmage, 2000). Murata y Matsuda (2003), Reynoso et al. (1999a) y Susanto et al. (2013) utilizan la técnica de tinción del grano de polen con colorantes para la evaluación de viabilidad en batata que permite construir un Índice de Fertilidad. Las principales ventajas que presenta el método son su rapidez y sencillez, así como la correlación observada con la germinación *in vitro* y el cuajado del fruto (Dafni y Firmage, 2000). Estas virtudes lo convierten en el método seleccionado para utilizar en este trabajo, aunque los autores identifican como una desventaja, la sobreestimación de la viabilidad.

Para evaluar la fertilidad femenina, se determinó como variable el Número de Óvulos por ovario. Reynoso et al. (1999a) lo propone como una de las metodologías empleadas en el Centro Internacional de la Papa (CIP) para evaluar la fertilidad femenina en batata. Es relevante poder distinguir si la baja formación de semillas se encuentra relacionada con un menor número de óvulos por ovario.

En este capítulo se propuso llevar a cabo diferentes experimentos con el objetivo de caracterizar la fertilidad femenina y masculina de las progenies generadas y en los genotipos parentales (objetivo específico 5) abordando la segunda hipótesis (Existen procesos que generan esterilidad e interfieren con la evaluación de la incompatibilidad).

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Índice de Fertilidad Masculina - Viabilidad de granos de polen

Los experimentos para estimar el Índice de Fertilidad Masculina mediante la viabilidad de granos de polen se llevaron a cabo durante el mes de marzo y abril de los años 2019 (año 1) y 2020 (año 2), en ambas progenies y en los parentales. Las plantas crecieron en invernáculo en la EEA San Pedro, Provincia de Buenos Aires. Cada año se evaluaron 4 flores en 70 genotipos (P28, P30, 35 individuos de la progenie C(28x30) y 33 individuos de la progenie S1(30x30)). El experimento se proyectó en dos años para que sea factible realizar la evaluación en los dos meses propuestos, pudiendo de esa manera incrementar el número de flores evaluadas por genotipo. El día previo a la antesis se sujetaron con hilo las corolas de flores seleccionadas al azar en distintas partes de la planta, protegiéndolas de insectos polinizadores. El día de antesis, entre las 8:00 y las 10:00 hs las flores fueron cosechadas y llevadas a laboratorio donde se extrajeron los estambres, y se desmenuzaron las anteras de cada flor en una gota de solución de aceto carmín glicerol 2% (solución compuesta por 100 ml de ácido acético, 2 g de carmín y 60 ml de glicerina) sobre un portaobjetos. Luego de cubrirse con un cubreobjetos se almacenaron por 24 hs a temperatura ambiente. En el día posterior se realizó el conteo utilizando un microscopio óptico con aumento de 40x sobre cuatro campos fijados en cada portaobjetos. Se contabilizó el polen teñido (viable) y no teñido (no viable). La información obtenida fue utilizada para la construcción del Índice de Fertilidad Masculina (%), el cual es una relación entre el polen viable sobre polen total por 100 (Reynoso et al., 1999a).

3.2.2 Fertilidad Femenina - Número de óvulos

El parámetro de Fertilidad Femenina (%) se estimó contabilizando el número de óvulos contenido en los ovarios. La actividad se llevó a cabo durante el mes de marzo y abril de los años 2019, 2020 y 2021 en los parentales y ambas progenies (70 genotipos totales), creciendo en invernáculo en la EEA San Pedro, Provincia de Buenos Aires. El día de antesis se cosecharon al azar 10 flores por genotipo. En el laboratorio se removieron los sépalos y corola, y el ovario fue cortado transversalmente. Luego de forzar a los óvulos a salir de su estructura, se contaron en lupa estereoscópica con un aumento de 1 a 5 X. Se observó detalladamente la estructura de estos y la presencia de anomalías. La Fertilidad Femenina (%) se estimó multiplicando por 100 la relación entre el número promedio de óvulos por ovario dividido por 4 (Burham, 1967), citado por Reynoso et al. (1999a).

3.2.3 Número de Semillas por Fruto

Se cosecharon las cápsulas maduras obtenidas a partir de las autopolinizaciones sobre los genotipos parentales y los de ambas progenies, como así también los resultantes de los retrocruzas recíprocas (capítulo 2). Se contabilizó el Número de Semillas por Fruto.

3.2.4 Análisis estadístico

Para evaluar la variable Fertilidad Masculina entre los genotipos parentales se realizó una prueba de T para dos muestras independientes. Para analizar el comportamiento de esta variable en las progenies, se aplicó un modelo lineal mixto. El factor cruzamiento se consideró con efectos fijos, mientras que los genotipos que componen la progenie se consideraron como un factor anidado al factor fijo, con efectos aleatorios. Es decir, los genotipos que conforman cada una de las progenies se consideraron como un nivel posible del factor cruzamiento, o sea, una muestra aleatoria

de observaciones; cada genotipo no es repetible, es propio de cada progenie y no es posible evaluarlo en la otra. Analizar la variabilidad del factor con efectos aleatorios permite hacer inferencias sobre los cruzamientos que estamos estudiando. Para el año 1 se planteó un modelo mixto con efectos fijos y aleatorios. En el año 2, además, se incluyó una función para varianzas heterogéneas. El nivel para comprobar la significancia de las pruebas planteadas fue $p=0,05$.

Para corroborar la existencia de diferencias significativas ($p<0,05$) en la Fertilidad Femenina de las progenies, se aplicó un modelo lineal generalizado mixto (distribución Conway–Maxwell–Poisson). Se tomó el mismo criterio de anidamiento planteado para la evaluación de la fertilidad masculina. La variable utilizada para el análisis fue el número de óvulos contabilizados por ovario.

Para analizar el número de semillas por fruto en todos los cruzamientos dirigidos y autocruzamientos, se determinó analizar los datos con metodología no paramétrica. La prueba elegida fue Kruskal Wallis ($p=0,05$). También se llevaron a cabo pruebas χ^2 para evaluar la existencia de diferencias significativas ($p<0,05$) de esta variable entre los cruzamientos dirigidos recíprocos y entre las autopolinizaciones.

Para los análisis estadísticos de fertilidad y pruebas χ^2 se utilizó el software RStudio® y para realizar las pruebas de Kruskal Wallis, el software Infostat® (Di Renzo et al. 2008).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Fertilidad Masculina

La técnica de acetocarmín glicerol resultó adecuada para la evaluación de la viabilidad del polen y permitió el desarrollo del índice de fertilidad. Las dos progenies y sus parentales pudieron ser evaluados exitosamente (figura 3.1).

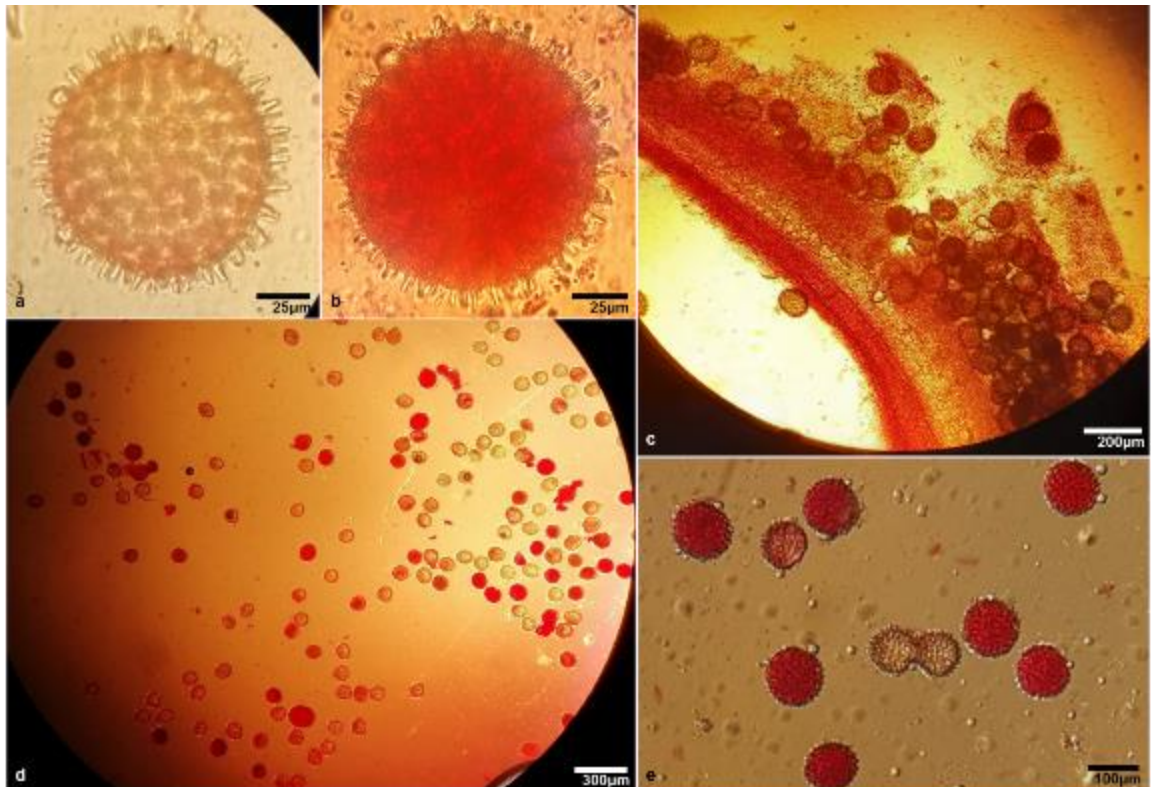


Figura 3.1 Medición de la viabilidad del polen con aceto carmin glicerol. a) Grano de polen no viable. b) Grano de polen viable. c) Tejido de antera con granos de polen. d-e) Granos de polen en el microscopio óptico.

Se observó una gran dispersión de datos entre las flores de cada genotipo, y entre los genotipos de cada progenie (figuras 3.6 y 3.7).

Mediante las mediciones individuales, se calcularon las medias del Índice de Fertilidad en los 35 genotipos de la progenie C(28x30), los 33 genotipos de la progenie S1(30x30) y en ambos parentales. Los datos corresponden a 4 flores evaluadas por genotipo por año (año 1 y año 2).

En el año 1 la media del Índice de Fertilidad de P30 fue 77,94%, el valor máximo fue 85,6% y el mínimo 64,9%. P28 presentó una media de 56,76%, el valor máximo fue 72,13% y el mínimo 44,52%. Se encontraron diferencias significativas ($t=2,85$; $gl=1$; $p=0,03$) entre las medias de los parentales. En el año 2 la media de fertilidad de P30 fue 86,54%, el valor máximo fue 90,32% y el mínimo 81,69%. P28 presentó una media de 64,83%, el valor máximo fue 77,37% y el mínimo 39,90%. No se encontraron diferencias significativas ($t=2,5$; $gl=1$; $p=0,08$) entre las medias de los parentales. Observando los datos descriptivos se observó que en los dos años, P28 presenta datos más dispersos respecto a P30 (figura 3.2).

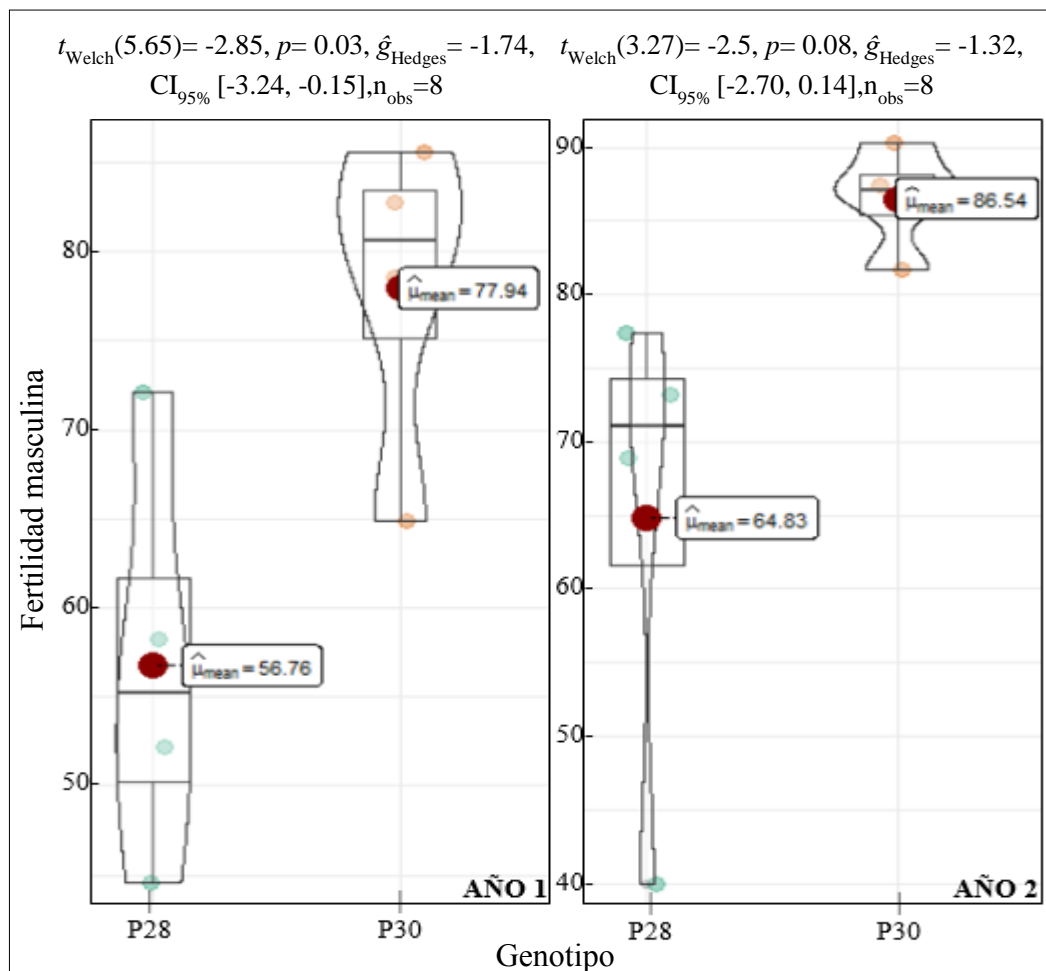


Figura 3.2 Fertilidad masculina media (%) medida en ambos genotipos parentales (año 1).

En el año 1 la media del Índice de Fertilidad de la progenie S1(30x30) fue 25%, el valor máximo fue 79,74% y el mínimo 0%. La progenie C(28x30) presentó una media

de 60,14%, el valor máximo fue 90,57% y el mínimo 2,78%. Se encontraron diferencias significativas entre ambas progenies ($F=48,11$; $gl= 66$; $p=2,069e^{-09}$). En el año 2 la media del Índice de Fertilidad de la progenie S1(30x30) fue 44,65%, el valor máximo fue 87,9% y el mínimo 0%. La progenie C(28x30) presentó una media de 68,29%, el valor máximo fue 93,67% y el mínimo 11,92%. Se encontraron diferencias significativas entre las medias de ambas progenies ($F=19,92$; $gl=59$; $p= <0,0001$) (figura 3.3).

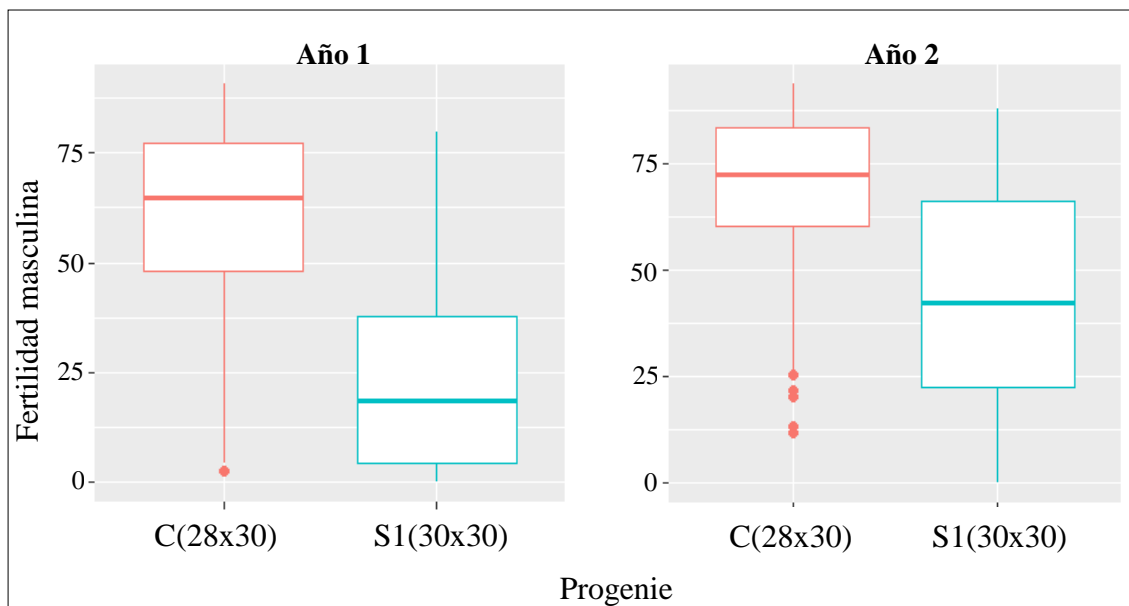


Figura 3.3 Fertilidad masculina (%) medida en ambas progenies segregantes.

La dispersión de los datos fue elevada en ambas progenies (error estándar entre 1,66 y 2,37) (Figura 3.4 y 3.5).

Analizando la componente aleatoria se observa que una importante parte de la variabilidad encontrada corresponde a la variabilidad dentro de los genotipos. En la tabla 3.1 se presenta la variabilidad observada entre y dentro de los genotipos por año obtenida a partir del cálculo del coeficiente de correlación intraclass (variabilidad de genotipos/variabilidad de genotipos + variabilidad residual).

Tabla 3.1

Año 1		Año 2	
Variación entre genotipos	Variación dentro genotipos	Variación entre genotipos	Variación dentro genotipos
76%	24%	83%	17%

Analizando los efectos fijos, se revela que en el año 1 la fertilidad en la progenie S1(30x30) es un 35,1% menor respecto a la población C(28x30). En el año 2 la fertilidad en la progenie S1(30x30) es un 24,36% menor respecto a la progenie C(28x30).

La disminución de la diferencia de medias en el segundo año parece estar asociada a la pérdida de 5 genotipos (E8, E18, E26, E39, E41) durante el periodo invernal, que en la evaluación del año 1, presentaron valores bajos para la variable en estudio.

Es de destacar la importante disminución del Índice de Fertilidad entre P30 y la S1 obtenida de su autocruzamiento. Mientras que el genotipo parental P30 presentó un valor medio de 77,94 y 86,54%, la S1 presentó una media de 25 y 44,65% (en ambos casos se reportan los valores del año 1 y 2, respectivamente).

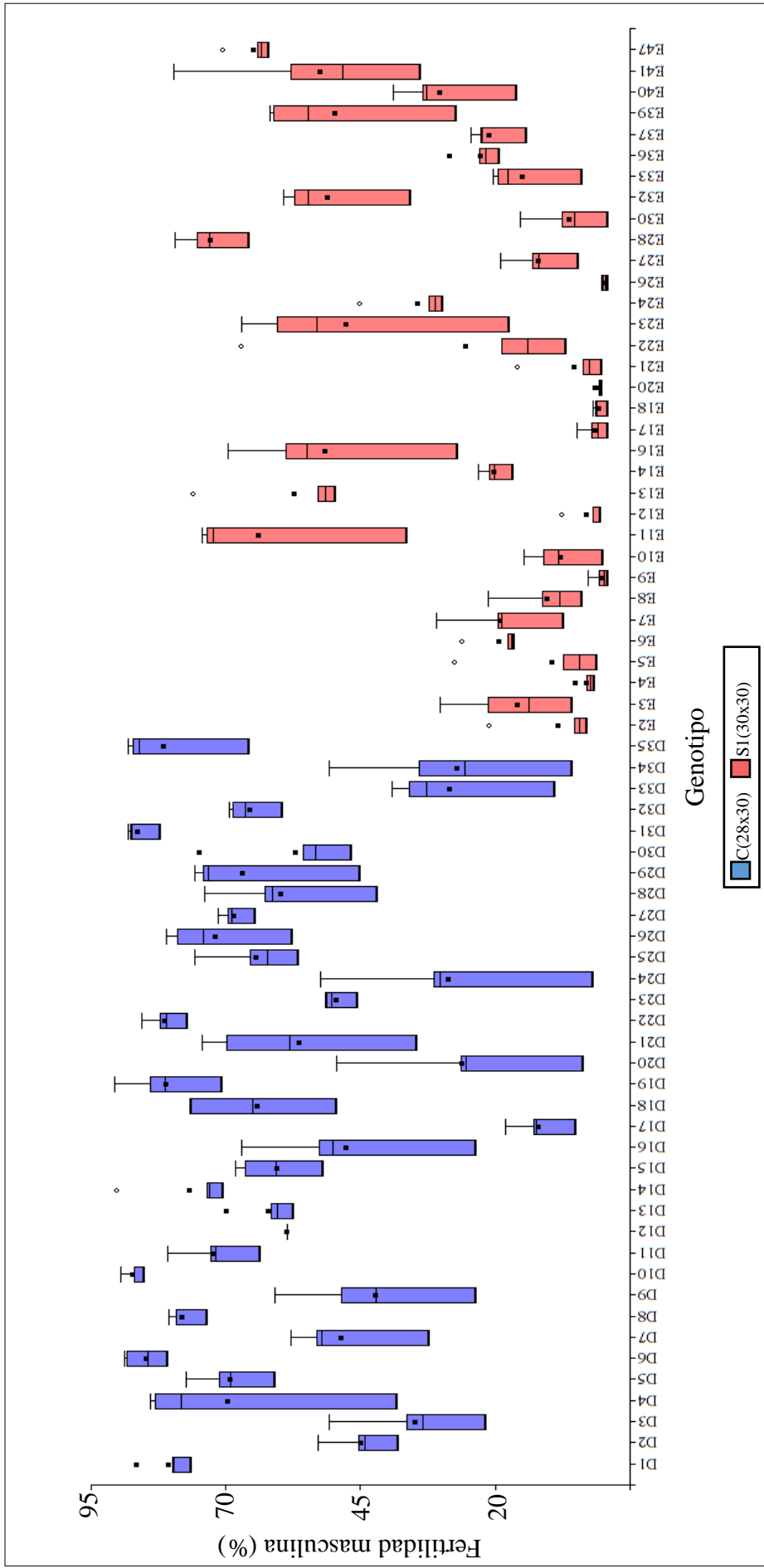


Figura 3.4 Fertilidad masculina media (%) de los genotipos de ambas progenies segregantes (año 1).

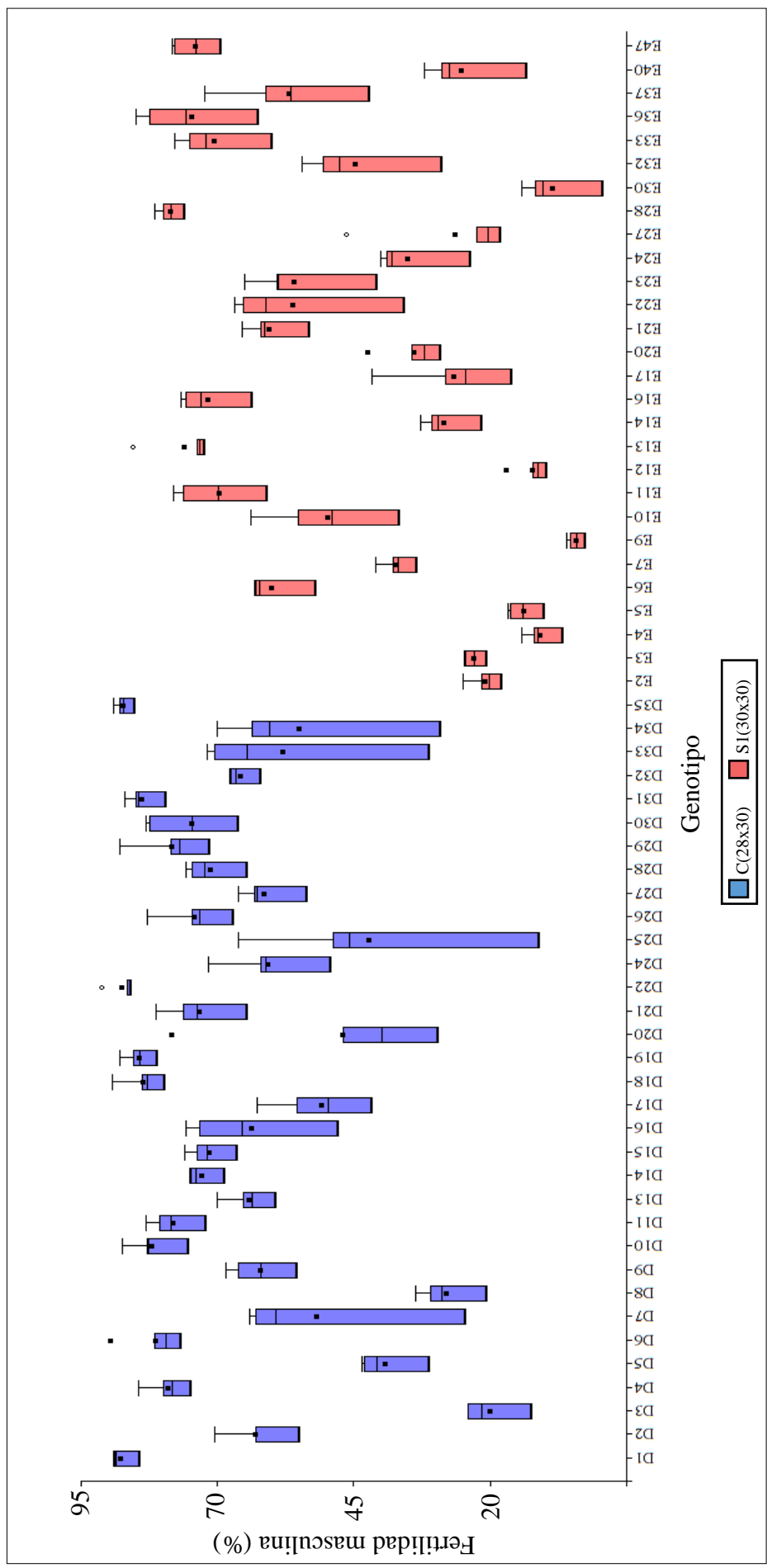


Figura 3.5 Fertilidad masculina media (%) de los genotipos de ambas progenies segregantes (año 2).

Los resultados obtenidos del Índice de Fertilidad en los parentales y en la progenie C(28x30) coinciden con los observados en los diferentes trabajos. En la publicación más reciente de Susanto et al. (2013) estudiaron la viabilidad del polen en dos variedades de batata (Papua solosa y MSU 03028-10) y obtuvieron valores entre 70,25% y 91,52%. Jones (1965) determinó que el polen fértil estuvo entre el 80% y el 95% con un valor mínimo del 64%. Van Marrewijk (1973) encontró valores de 58% a 81% entre 35 genotipos.

Por otro lado, no se observó en la bibliografía índices de fertilidad de polen tan bajos como los observados en la progenie autocruzada S1(30x30). ¿Qué factores pueden estar influyendo en la pérdida de viabilidad del polen en este cruzamiento? Dafni y Firmage (2000) enuncian diversos factores externos e internos que podrían afectar la viabilidad del polen y su longevidad. Los autores distinguen como factores internos, aquellos relacionados con el metabolismo del polen o la variabilidad genética interespecífica, y dentro de los factores externos, aquellos relacionados con aspectos morfológicos del polen y la flor, forma de exposición, la protección de las anteras hasta aspectos ambientales como puede ser la temperatura, humedad, etc. Considerando que estos factores externos son iguales para todos los genotipos evaluados, pues los mismos crecieron en el mismo invernáculo, con el mismo manejo sanitario, nutricional y de riego, y que las flores fueron tomadas siempre en distintos sectores de las plantas evaluadas (altura, posición respecto a los puntos cardinales), para interpretar la amplia diferencia encontrada entre ambas progenies tendremos en cuenta el concepto de depresión endogámica desarrollado en el capítulo 2.

Generalmente la depresión de los distintos caracteres es más marcada cuando los individuos se someten a la autocruza por primera vez, ya que quedan expuestos alelos recesivos deletéreos que disminuyen el comportamiento (Harder et al., 2011). Esta

hipótesis ha sido probada mediante la autofertilización forzada de familias que naturalmente presentan cruzamiento abierto y en autocruzamientos de especies autoincompatibles, y se corresponde a lo observado en los genotipos de la progenie S1(30x30). Esta última, además de presentar menor viabilidad del polen, presentó depresión de otros caracteres como menor tamaño de planta, menor tamaño de flor, menor viabilidad de semillas, mayor muerte al estado de plántula, floración más tardía, plantas sin desarrollo de raíces de reserva (menor performance en general). En brasicáceas, con SIE, se observa también una disminución en la viabilidad del polen, y de otros caracteres cuando se fuerzan a un ciclo de endocría. Busch (2005), observó la existencia de depresión endogámica en *Leavenworthia alabamica*, midiendo viabilidad de polen en poblaciones autoincompatibles forzadas a autocruzarse comparado con poblaciones autocompatibles.

La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio de la depresión endogámica basándose en caracteres relacionados al esporofito (tasa de crecimiento, producción de frutos y semillas, etc.) sin tener en cuenta el efecto que la misma podría tener sobre los microgametofitos.

Algunos estudios han demostrado que el rendimiento del polen (velocidad de germinación y tasa de crecimiento del tubo polínico) está influenciado por su genotipo y por la capacidad del esporofito para aprovisionar nutrientes al desarrollo de su propio polen (Vogler et al., 1999; Stephenson et al., 2001). Austerlitz et al. (2012) observó depresión por endocría en varios rasgos del polen, como la producción de polen, la viabilidad y el número o crecimiento del tubo polínico en *Silene latifolia* (Poir.) (Caryophyllacea).

Stephenson et al. (2001) estudiando algunas especies de cucurbitáceas encontraron que la mayoría de los caracteres reproductivos disminuye a medida que aumentaba el

nivel de endocría. Los autores evaluaron diferentes características comparando la *performance* entre una población autocruzada y una población cruzada, considerando diferentes grados de endogamia (de 0 a 0,75). En relación a la *performance* del polen, encontraron que el tubo polínico de progenies generadas por polinización cruzada crecía mucho más rápido en ensayos *in vitro* que el de aquellas progenies obtenidas por autocruzamiento. Adicionalmente, el polen de las plantas autocruzadas, fertilizaba cerca de un 49% de semillas, mientras que el polen de poblaciones generadas por polinización cruzada, superaba el 60%. Esta diferencia observada entre poblaciones podría deberse a la habilidad de la planta parental en proveer las fuentes necesarias para el desarrollo del grano de polen, aunque no detallan cuál sería el mecanismo genético subyacente.

La existencia de depresión endogámica y la reducción del *fitness* en individuos o poblaciones de especies autocruzadas, es ampliamente conocida, pero al igual que lo que ocurre en poblaciones naturales, la depresión endogámica es difícil de cuantificar en nuestras progenies debido a la dificultad de establecer *pedigrees* y de conocer el genotipo de los parentales.

3.3.2 Fertilidad femenina

La metodología empleada para la evaluación de la Fertilidad femenina en término de número de óvulos presentes en función de los esperados resultó adecuada (Figura 3.6). Ambas progenies y sus parentales pudieron ser evaluados exitosamente.



Figura 3.6 a) Flores de *Ipomoea batatas*. b-c) Extirpación de gineceo. d-e) Zona inferior del gineceo y óvulos de batata.

En las 30 flores evaluadas de cada genotipo parental, el 100% de las flores presentó el número esperado de óvulos (4). Al evaluar 10 flores en cada genotipo de ambas progenies se encontró que 62 genotipos presentaron el número de óvulos descrito para la especie. Los 6 genotipos restantes, en algunas repeticiones, presentaron un número diferente al esperado (tabla 3.2).

Analizando la variable número de óvulos por ovario entre ambas progenies no se encontraron diferencias significativas ($Chisq=0,46$; $gl=1$; $Pr(>Chi)=0,49$).

Tabla 3.2 Fertilidad femenina en genotipos con número de óvulos distinto a 4.

Progenie	Genotipo	AI	\bar{x} Óvulos	σ Óvulos	Fertilidad femenina (%)
C(28x30)	D35	Si	3,80	0,79	95
S1(30x30)	E3	Si	3,80	0,63	95
S1(30x30)	E4	Si	4,30	107,5	
S1(30x30)	E8	Si	3,60	1,07	90
S1(30x30)	E9	Si	4,10	0,32	102,5
S1(30x30)	E47	Si	4,40	0,70	110

Se llevó a cabo una apreciación visual de la morfología de los óvulos en todas las repeticiones. Los mismos presentaron siempre las características típicas de la especie. En aquellos ovarios donde el número era mayor a 4, algunos de ellos se presentaban con una forma más constreñida o achatada, no pudiéndose afirmar si los mismos eran viables (Figura 3.7).



Figura 3.7. Ovarios de batata con número de óvulos distinto de 4. a) Genotipo E4. b) Genotipo E9.

Los datos obtenidos coinciden con las observaciones de Burham (1967). El autor encontró en 5 de 30 genotipos, ovarios con un número menor de óvulos respecto al esperado (4). Wang (1968) encontró ovarios conteniendo 2 y 3 óvulos en una de las dos variedades analizadas. Sin embargo, no consideró que estas irregularidades fueran las responsables de las diferencias en los números de semillas obtenidos entre ambos genotipos.

En esta investigación, de los 6 genotipos que presentaron esta anomalía, 5 corresponden a la progenie endocriada S1(30x30) y 1 a la progenie C(28x30). La mitad de dichos genotipos tienen un número de óvulos mayor que el esperado y la otra mitad un número menor, no observándose una tendencia clara hacia un exceso o falta de óvulos (figura 3.8).

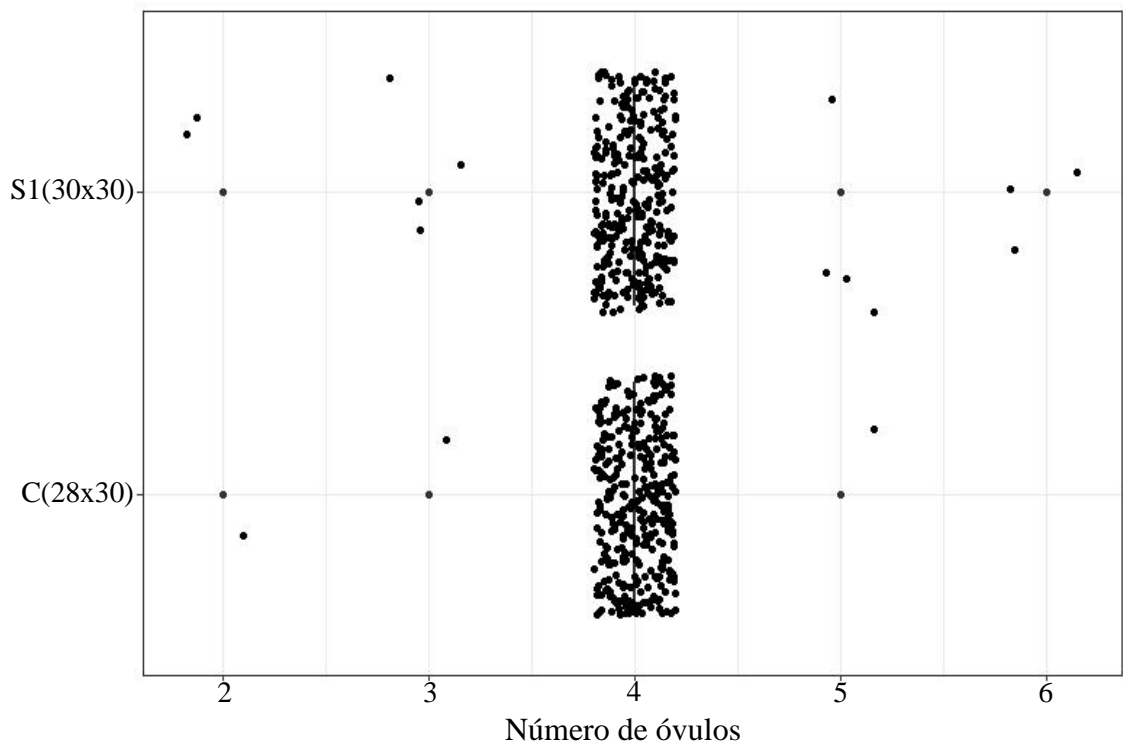


Figura 3.8 Numero de óvulos por ovario en flores de ambas progenies.

3.3.3 Número de semillas en autocruzamientos y cruzamientos dirigidos

Se llevó a cabo el conteo de semillas por fruto en cada tipo de cruzamiento evaluado, considerando que esta variable está también relacionada a problemas de esterilidad y no vinculada directamente al SIE. Se estimó el mínimo, máximo y promedio de semillas por fruto (tabla 3.3).

Tabla 3.3

Cruzamiento	mín. sem./fruto	máx. sem./fruto	x sem./fruto	χ^2
P28 ♀ x P30 ♂	1	2	1,22	$\chi^2= 0,06$; gl= 1; $p= 0,81$
P30 ♀ x P28 ♂	1	3	1,62	
Autopolinización P30	1	3	1,37	$\chi^2= 0,07$; gl= 2; $p= 0,97$
Autopolinización C(28x30)	1	2	1,1	
Autopolinización S1(30x30)	1	1	1	
P28 ♀ x C(28x30) ♂	1	4	1,27	$\chi^2= 0,01$; gl= 1; $p= 0,93$
C(28x30) ♀ x P28 ♂	1	4	1,42	
P30 ♀ x C(28x30) ♂	1	3	1,29	$\chi^2= 0$; gl= 1; $p= 1$
C(28x30) ♀ x P30 ♂	1	3	1,32	
P30 ♀ x S1(30x30) ♂	1	1	1	$\chi^2= 0,02$; gl= 1; $p= 0,88$
S1 ♀(30x30) x P30 ♂	1	3	1,23	

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al realizar las pruebas de χ^2 comparando el número de semillas en frutos obtenidos en los cruzamientos dirigidos recíprocos y en frutos provenientes de autopollinización (tabla 3.3). Tampoco se observaron diferencias significativas al evaluar la variable mediante estadística no paramétrica contemplando todos los tipos de cruzamiento entre sí ($H=51,42$; $gl=90$; $p=0,46$), todos los tipos de cruzamiento dirigidos entre sí ($H=45,24$; $gl=79$; $p=0,49$), y todas las autopollinizaciónes entre sí ($H=5,61$; $gl=10$; $p=0,41$).

Los 238 frutos obtenidos se distribuyeron de la siguiente manera: 2 frutos de 4 semillas, 7 frutos de 3 semillas, 43 frutos de 2 semillas y 186 frutos de 1 semilla, dando un promedio total de 1,26 (Figura 3.9). Este valor coincide con la bibliografía consultada de la especie (Martin y Cabanillas, 1966; Wang, 1968; Mont et al., 1993; Murata y Matsuda 2003).

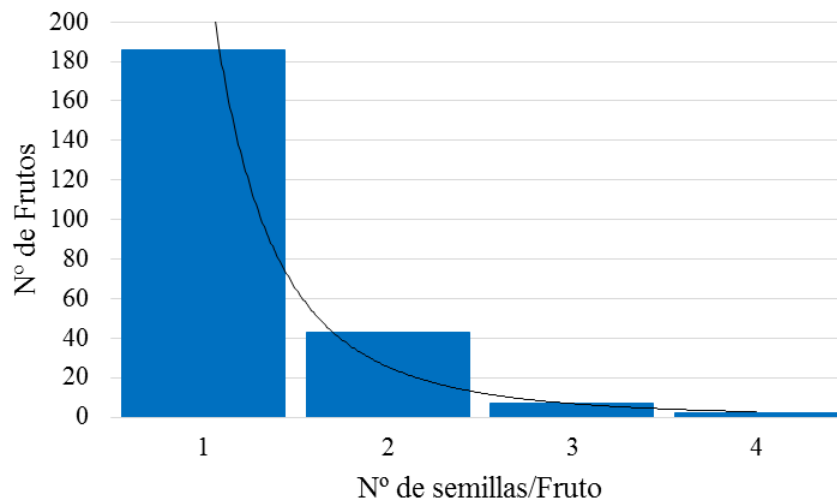


Figura 3.9 Distribución del número de semillas/ fruto contabilizado en el total de los frutos obtenidos en la totalidad de los cruzamientos.

Martin y Cabanillas (1966) observaron en tres tipos de cruzamientos mayor frecuencia de frutos con una y dos semillas. En cruzamientos positivos, 3 o 4 días luego de la polinización, pudieron observar como 1 o 2 óvulos continuaban su crecimiento, mientras los restantes comenzaban a secarse hasta quedar, al momento de madurez del fruto, reducidos a pequeñas escamas que obviamente no constituyen semillas viables. Adjudicaron esta falla al complejo de esterilidad – incompatibilidad.

Wang (1968) observó en cruzamientos entre la variedad Goldrush y otros tres genotipos, valores medios de semillas por fruto de entre 1,06 y 1,33.

Mont et al. (1993) analizando embriones de tres genotipos de batata en diferentes estados de desarrollo, determinaron la existencia de barreras fisio-embriológicas que limitan la obtención de semillas viables: el aborto de frutos y el aborto temprano y/o tardío

de embriones; sugiriendo el rescate de embriones como una técnica posible para evitar la ocurrencia tardía de abortos.

Por otro lado, Murata y Matsuda (2003) corroboraron en sus trabajos que la formación de sacos embrionarios defectuosos es uno de los principales causantes de la baja formación de semillas en batata. En un experimento llevado a cabo en *Torenia fournieri* (Linden) en el que fueron extirpadas las sinérgidas, los tubos polínicos no eran atraídos por el saco embrionario, impidiendo la formación de semillas. Incluso en genotipos con elevada viabilidad y germinación del polen, asegurando la llegada de numerosos tubos polínicos hasta la zona del ovario, se observó una formación de semillas menor a la esperada. Analizando los sacos embrionarios no penetrados, corroboraron que la mayoría de estos eran defectuosos.

A pesar de que la baja producción de semilla botánica en batata es considerada un cuello de botella para el mejoramiento genético, esta realidad no parece ser ajena al comportamiento general de las especies del reino vegetal. Charlesworth (1989) en una muestra de 196 especies vegetales norteamericanas creciendo en condiciones naturales, estableció que la relación semilla/óvulo (óvulos que se convierten en semillas) fue en promedio de 0,85 para especies anuales, siendo menor en especies perennes herbáceas (0,57) y más aún en perennes leñosas (0,33). Entre las especies perennes, aquellas de polinización cruzada presentan valores menores que aquellas caracterizadas como autógamias.

Capítulo 4 - Evaluación del crecimiento del tubo polínico

4.1 Introducción

Las estructuras reproductoras de las angiospermas son las flores. Cuando son perfectas están constituidas por cuatro ciclos florales: sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Estos últimos constituyen uno de los ciclos fértiles conformando en su conjunto el gineceo. Cada gineceo comprende un estigma (superficie receptiva del grano de polen), un estilo (sección media que conecta el estigma con el ovario) y un ovario compuesto por uno o más óvulos. Cada ovulo contiene el gametofito femenino, formado generalmente por siete células. Un grano de polen depositado en el estigma germina para producir un tubo polínico que crece en sentido descendente a través del estilo hasta alcanzar al óvulo en el ovario, descargando dos gametas masculinas en el gametófito femenino. Tras una doble fecundación, el óvulo se convierte en una semilla (Nabors, 2006; Curtis et al, 2007).

En *Ipomoea batatas* el estigma está formado por dos cuerpos o lóbulos esféricos adyacentes de un milímetro de diámetro, montados sobre un estilo delgado (0,4 a 1,2 mm de diámetro y 10 a 25 mm de largo) (Figura 4.1). Del centro de cada lóbulo surgen de 50 a 75 ramificaciones cubiertas por células que exudan una sustancia viscosa. El cuerpo principal del estigma está compuesto por células grandes, aproximadamente esféricas, dispuestas en columnas que irradian desde la unión del estigma con el estilo hacia las ramas, parecen ser continuas con las filas del cuerpo del estigma, y éstas a su vez son continuas con las filas de las células del núcleo central del estilo. El estilo es de tipo sólido, presenta un tejido transmisor central que se distingue claramente del parénquima periférico porque sus células poseen menor tamaño y citoplasma más denso. Cada óvulo está unido a la placenta por una corta tira funicular, que también delimita el micrópilo (Martín y Ortiz, 1967).

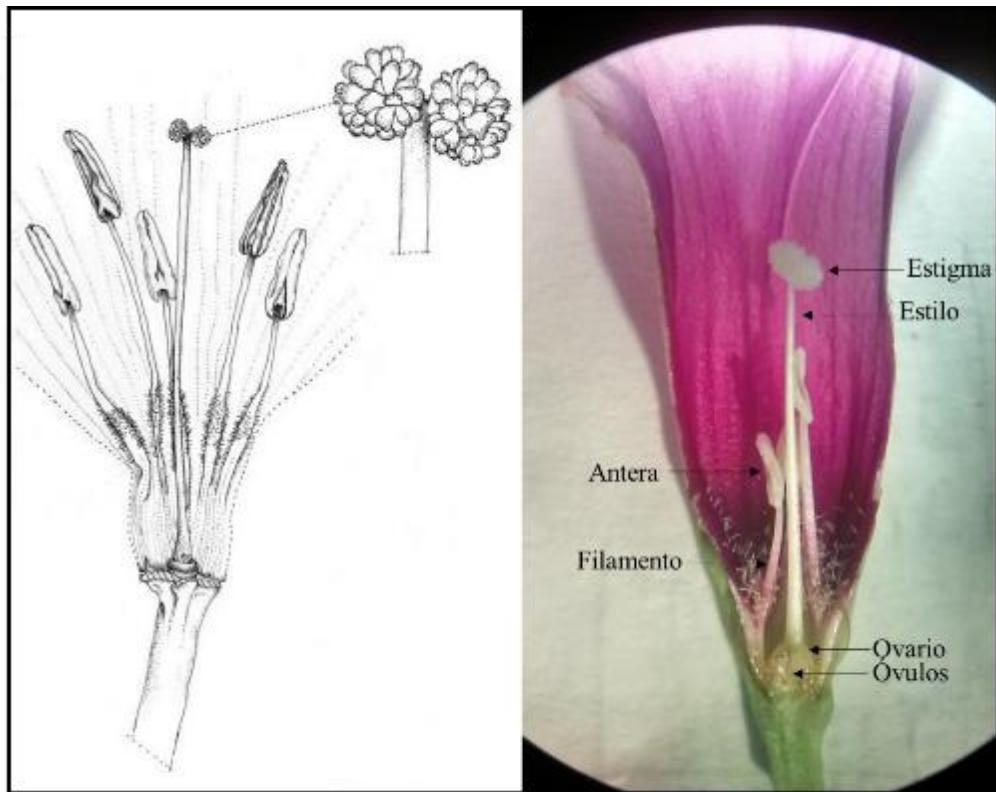


Figura 4.1 a) Gineceo típico de *Ipomoea* (Moura y Morim ,2015). b) Flor de *Ipomoea batatas*.

Los granos de polen se adhieren a la superficie del estigma de manera mecánica entre las ramas del mismo y por la tensión superficial del exudado viscoso (Figura 4.2). Aproximadamente 1 hora después de la polinización, solo los granos de polen de cruzamientos compatibles germinan sobre el estigma. Los tubos polínicos atraviesan la cutícula y crecen intercelularmente, aplastando las células hacia los lados a su paso. Luego alcanzan el tejido transmisor del estilo. El paso de más de 5 tubos a través de este tejido resulta en una degradación celular, posiblemente por la ruptura enzimática de las paredes celulares y también por la presión lateral de los tubos. Los tubos polínicos no son necesariamente circulares en sección transversal. Evidentemente, los primeros tubos que pasan por el estilo son aplastados o distorsionados por el paso de los tubos posteriores. Después de 4 horas desde la polinización, se pueden encontrar tubos polínicos ingresando

por la micrópila del óvulo y alcanzando el gametofito femenino (Martin, 1967; Martin y Ortiz, 1966, Kokubu et al., 1982, Murata y Matsuna, 2003).

Martin y Ortiz (1966) definen tres zonas críticas en el recorrido del tubo polínico hacia el óvulo. La primera es la superficie del estigma, donde muchos granos de polen fracasan en atravesarlo. La segunda es la unión del estigma con el estilo donde los conductos se reducen repentina y drásticamente. Y el tercer obstáculo es la unión del estilo con el ovario donde los senderos por los que tiene que atravesar el tubo polínico se hacen irregulares y menos definidos.

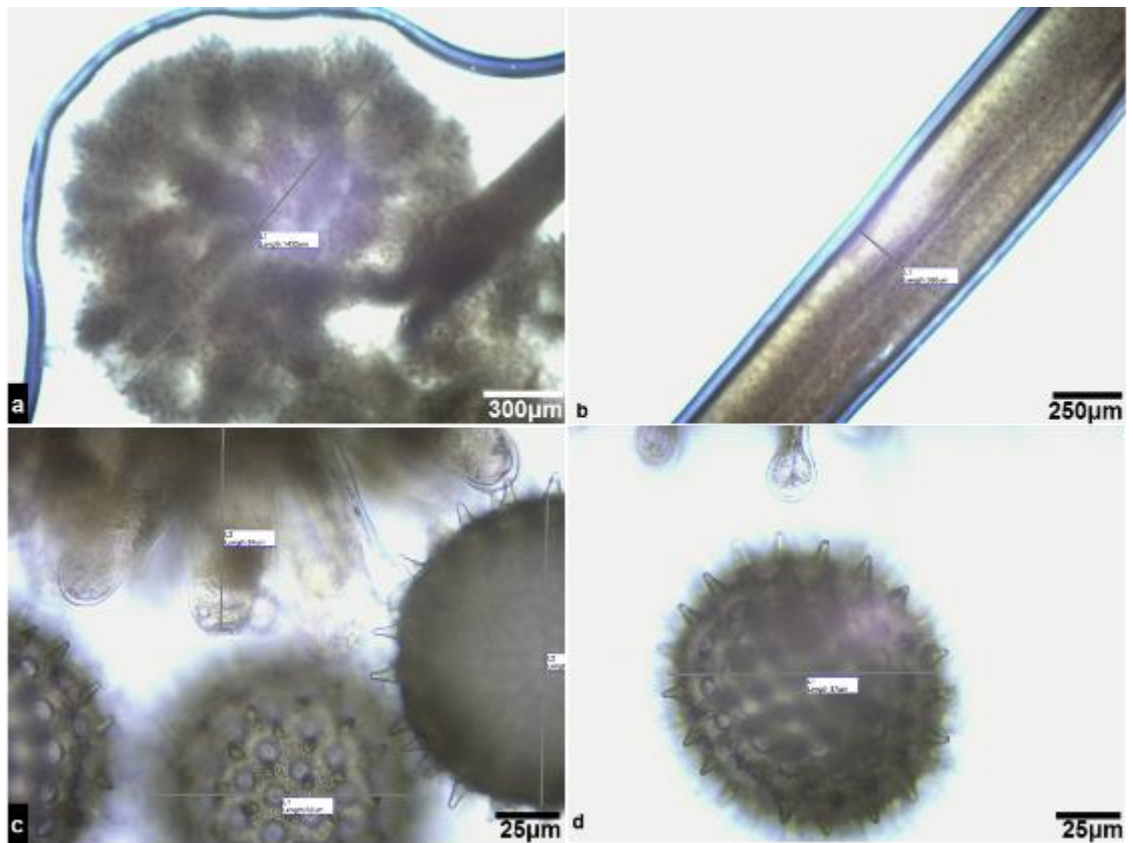


Figura 4.2 Anatomía del gineceo y grano de polen de batata a) Estigma. b) Estilo. c-d) Papilas del estigma con granos de polen adheridos.

La evaluación del crecimiento del tubo polínico se torna necesaria para comprender de manera más detallada el proceso de auto(in)compatibilidad esporofítica. Varios autores evalúan este carácter debido a que, en los estudios referidos al comportamiento

reproductivo, podemos tener mezclados diversos procesos generando efectos finales similares. Cuando se evalúa el carácter autocompatibilidad a partir de la variable Producción de frutos o semillas, se lo podría estar subestimando, al contabilizar como incompatible, cruzamientos que no dan frutos o semillas por problemas de esterilidad, condiciones sanitarias o medioambientales. La evaluación del tubo polínico, permite además, aproximarse al análisis del bajo número de semillas, situación típica que se da en cruzamientos compatibles.

Los tubos polínicos de las angiospermas contienen en sus paredes celulares tres polisacáridos: pectina, celulosa y calosa, siendo este último el principal componente. Los tubos polínicos en crecimiento forman periódicamente tapones de calosa que se cree, bloquean las partes más antiguas del tubo y mantienen el citoplasma vivo cerca de la punta en crecimiento. Los tapones de calosa son comunes en los tubos polínicos de las plantas con flor, aunque la morfología y el patrón de deposición de los mismos varía entre las especies (Qin et al., 2012). En el estudio del crecimiento del tubo polínico se emplean técnicas que permiten teñir de manera diferencial la calosa respecto de otros tejidos. Está probado que la calosa, tanto en tejido vivo como muerto puede ser teñida selectivamente por azul de anilina u otros colorantes que fluorescen en presencia de luz ultravioleta (Martin, 1959).

En este capítulo, se propuso determinar los eventos post-polinización en autocruzamientos y en cruzamientos entre genotipos a nivel de desarrollo del tubo polínico (objetivo específico 6) abordando la tercer hipótesis (La evaluación del crecimiento del tubo polínico permite diferenciar entre genotipos autocompatibles y autoincompatibles).

4.2 Materiales y métodos

Mediante la técnica de epifluorescencia puede observarse el crecimiento del tubo polínico a través del gineceo, permitiendo visualizar la germinación de granos de polen sobre las papilas del estigma y el avance de los tubos hacia el ovario por una tinción diferencial de la calosa. Se observó el crecimiento del tubo polínico a través del gineceo en autocruzamientos y cruzamientos realizados sobre genotipos seleccionados.

Los cruzamientos se realizaron durante marzo y abril de 2021 en invernáculo localizado en la EEA San Pedro, provincia de Buenos Aires. Se realizaron un mínimo de 20 repeticiones por genotipo. La tarde anterior a la antesis, las flores fueron protegidas con bolsas de papel quedando aisladas de insectos polinizadores. En la mañana de la antesis fueron efectuadas las autopolinizaciones entre las 8:00 y las 10:00 hs extrayendo las anteras con pinzas esterilizadas y frotándolas contra el estigma de la misma flor. Luego de realizados los cruzamientos, las flores fueron nuevamente protegidas con bolsas de papel. Ocho horas después de realizadas las autopolinizaciones, los gineceos fueron extirpados en su totalidad y fijados en FAA (formaldehído, alcohol, acético), considerando que el máximo crecimiento del tubo polínico se alcanza entre las 6 y 8 horas (Martin y Cabanillas, 1966; Kokubu et al, 1982). Se conservaron en FAA hasta el momento de su procesamiento para la evaluación en microscopio de epifluorescencia en el Laboratorio de Anatomía Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA). Las muestras fueron procesadas utilizando el protocolo desarrollado por Martín (1959) modificado para este trabajo debido a la fragilidad de los gineceos (Figura 4.3).

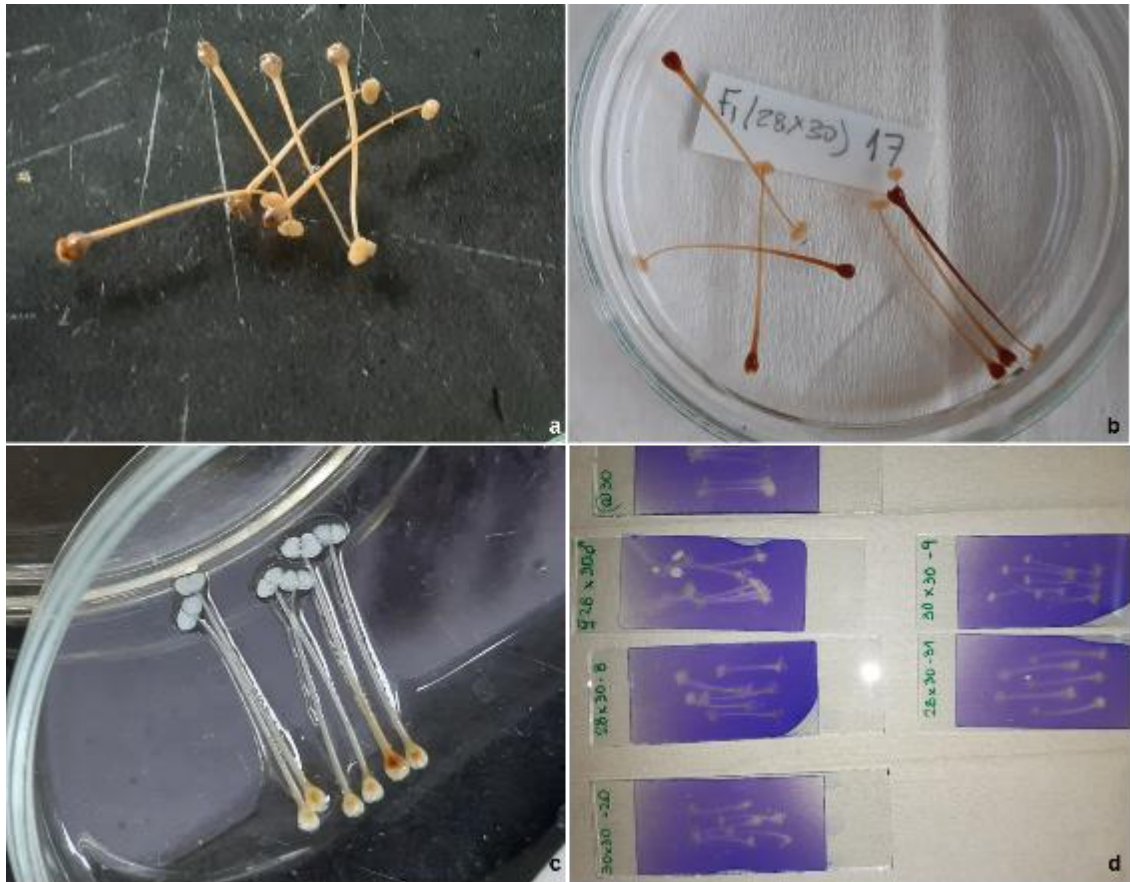


Figura 4.3 a) Gineceos en FAA. b) Gineceos en hidróxido de sodio. c) Gineceos en proceso de blanqueamiento. d) Portaobjetos con gineceos en azul de anilina.

Técnica modificada del protocolo de tinción: Los estigmas fijados en FAA, luego de ser enjuagados con agua, deben pasar un periodo de entre 8 y 24 hs sumergidos en una solución de hidróxido de sodio (NaOH). Se probaron dos concentraciones de NaOH (5% y 10%) con dos condiciones de almacenamiento (en estufa a 42°C y a temperatura ambiente) y dos alternativas luego de ser removido el NaOH: almacenamiento a 4°C por 6 días antes de proceder con la clarificación o clarificación inmediata de los gineceos con hipoclorito de sodio al 5% (NaClO). Posteriormente las muestras blanqueadas luego de 5 enjuagues fueron montadas sobre un portaobjetos y teñidas con una solución 0,1% de azul de anilina. El NaOH ablanda los tejidos para permitir una adecuada penetración del colorante. La concentración al 10% generó una mayor escisión de los estigmas al momento del montaje. Sin embargo, la concentración al 5% no ablandó lo suficiente el

- C(28x30) AC: D3, D6, D27, D28, D30 y D31
AI: D4, D8, D14, D17, D19, D34
- Parental AC: P30
- Parental AI: P28

4.2.2 Análisis estadístico

Se evaluó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los genotipos seleccionados, entre el número granos de polen adheridos sobre el estigma y el número de tubos polínicos creciendo en cada región del gineceo. Se planteó un modelo lineal generalizado con distribución distribución Conway–Maxwell–Poisson para corregir sobre y subdispersión. Se utilizó el software RStudio® para realizar el análisis.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Evaluación del tubo polínico en 5 posiciones del gineceo

La evaluación permitió observar el número total de granos de polen adheridos en el estigma (sin germinar) para todos los genotipos evaluados y el crecimiento del tubo polínico en diferentes posiciones dentro del gineceo de genotipos autocompatibles. Se encontraron diferencias significativas ($Chisq= 216,55$; $gl=22$; $Pr(>Chisq)= < 2.2e-16$) entre los genotipos respecto al número de granos de polen adheridos al estigma. En la figura 4.4 se observa el número medio de granos de polen sin germinar adheridos sobre la superficie del estigma (p0).

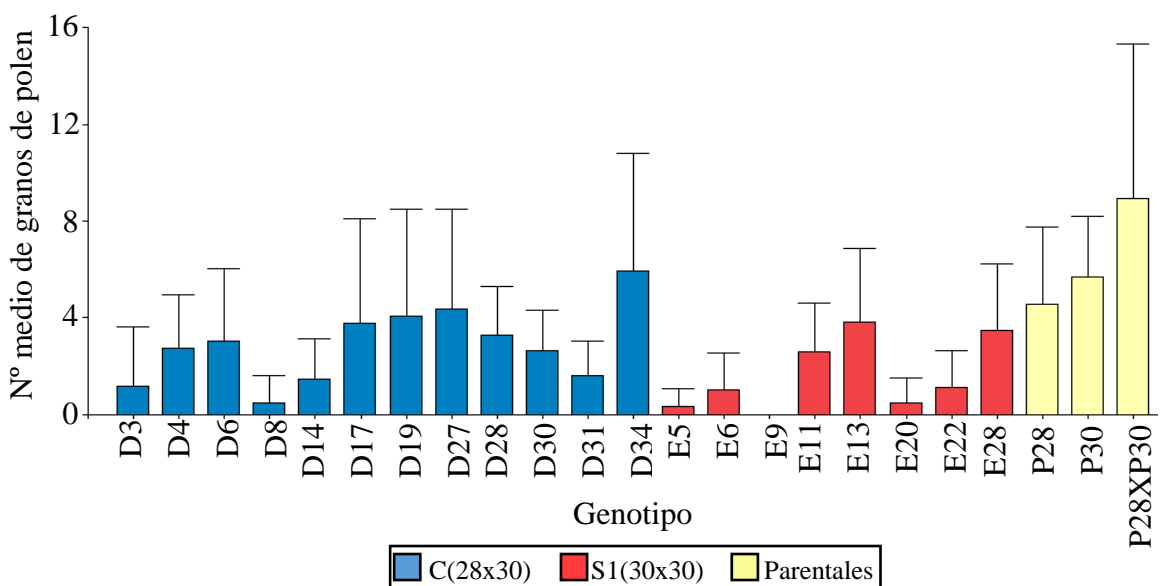


Figura 4.4 Número medio de granos de polen sin germinar adheridos sobre la superficie del estigma (p0).

En la figura 4.5 se observa el número medio de tubos polínicos creciendo a lo largo de distintas secciones del gineceo evaluadas (p1, p2, p3 y p4).

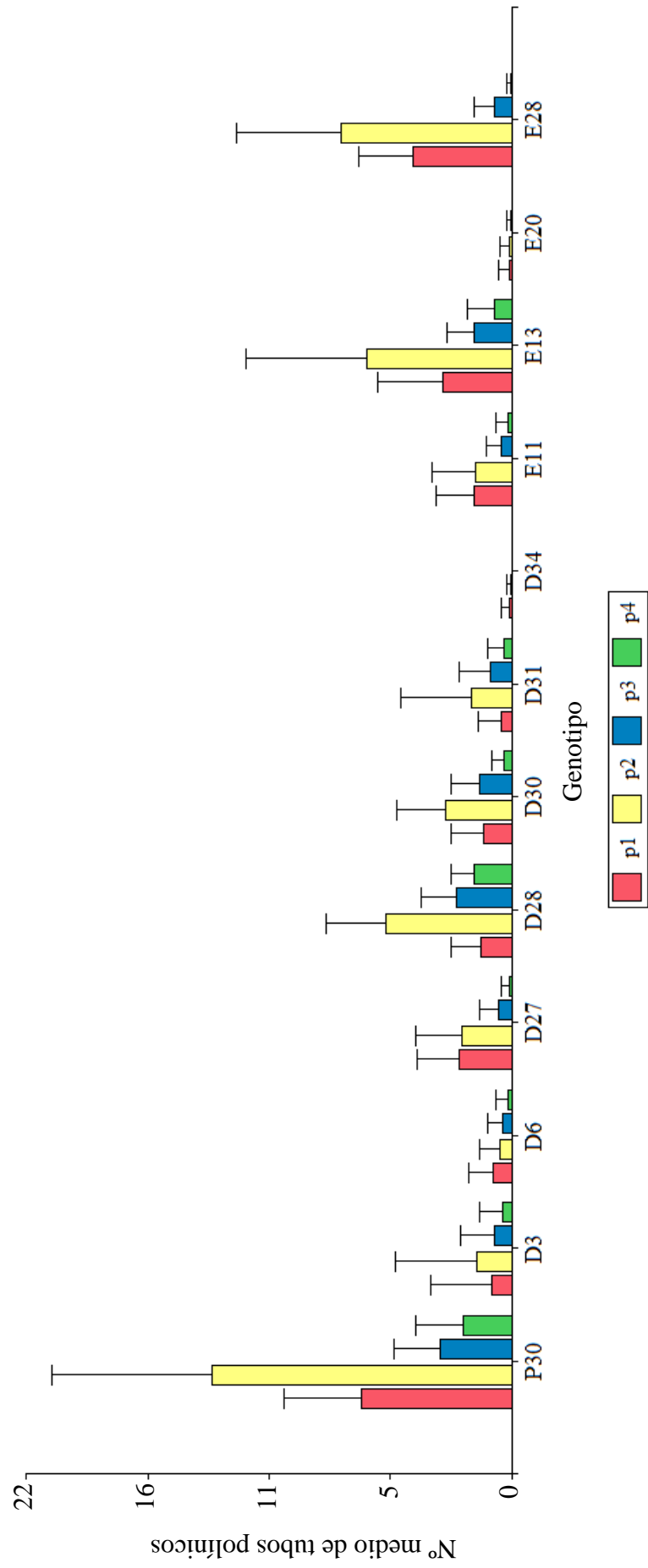


Figura 4.5 Crecimiento de tubos polínicos en cuatro posiciones (p1, p2, p3 y p4) de genotipos autocompatibles.

La mayor disminución del número de tubos polínicos se observa cuando los mismos atraviesan la unión entre el estigma y el estilo, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía (Martín y Cabanillas, 1966; Murata y Matsuda, 2003).

Al analizar las diferencias encontradas entre genotipos autocompatibles para cada zona evaluada se observó mayor heterogeneidad entre los genotipos en las posiciones p0, p1, p2 respecto a p3 y p4. Los genotipos que presentaron mayor número de tubos polínicos en cada posición no fueron siempre los mismos, a excepción de P30 que se ubicó dentro del grupo con mayor media en cada una de las posiciones evaluadas. No se observó una relación directa entre el número de granos de polen en la superficie del estigma y el de tubos polínicos que llegan al ovario.

Granos de polen sobre el estigma (p0): Se encontraron diferencias significativas ($Chisq= 83,882$; $gl=11$; $Pr(>Chisq)= 2,607e-13$) entre los genotipos en el número de granos de polen sin germinar sobre el estigma. Los genotipos D34 y P30 presentaron las mayores medias (5,68 y 5,95), y los genotipos D31, D3 y E20, las menores (1,63; 1,20 y 0,50) (Figura 4.6).

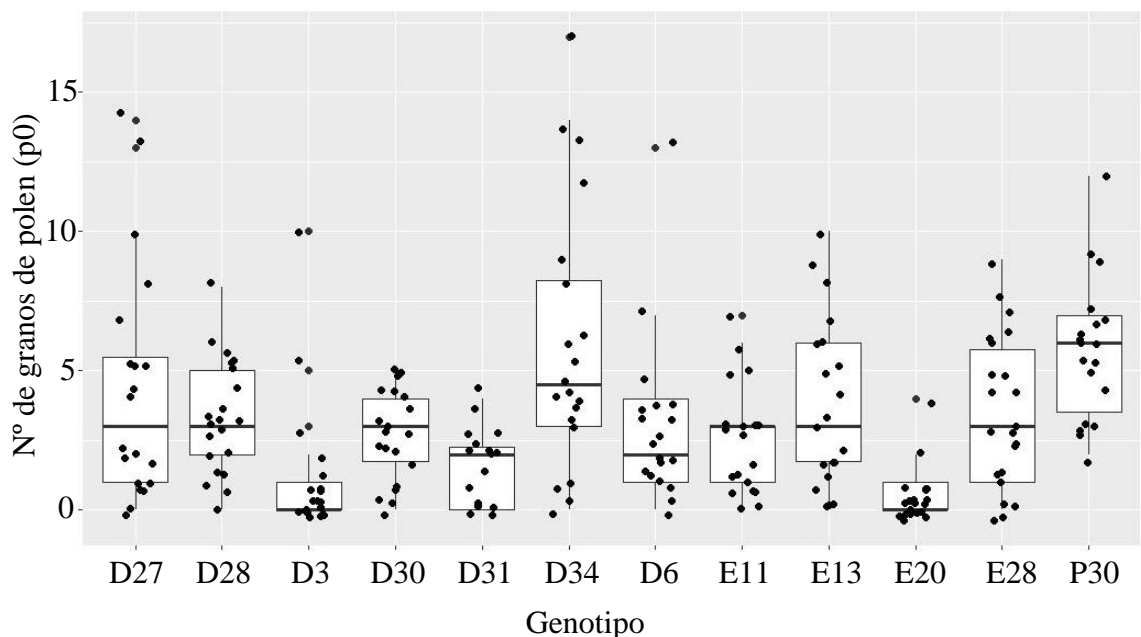


Figura 4.6 Número medio de granos de polen sin germinar contabilizados sobre el estigma de genotipos autocompatibles (p0).

Tubos polínicos que inician y detienen su crecimiento sobre el estigma (p1): Se encontraron diferencias significativas ($Chisq=166,47$; $gl=11$; $Pr(>Chisq)= < 2,2e-16$) entre los genotipos en el número de tubos que crecen y detienen su crecimiento dentro del estigma. Los genotipos P30 y E28 presentaron las mayores medias (6,79 y 4,50) y los genotipos D3 y E20, D34, las menores (0,90; 0,15 y 0,15) (Figura 4.7).

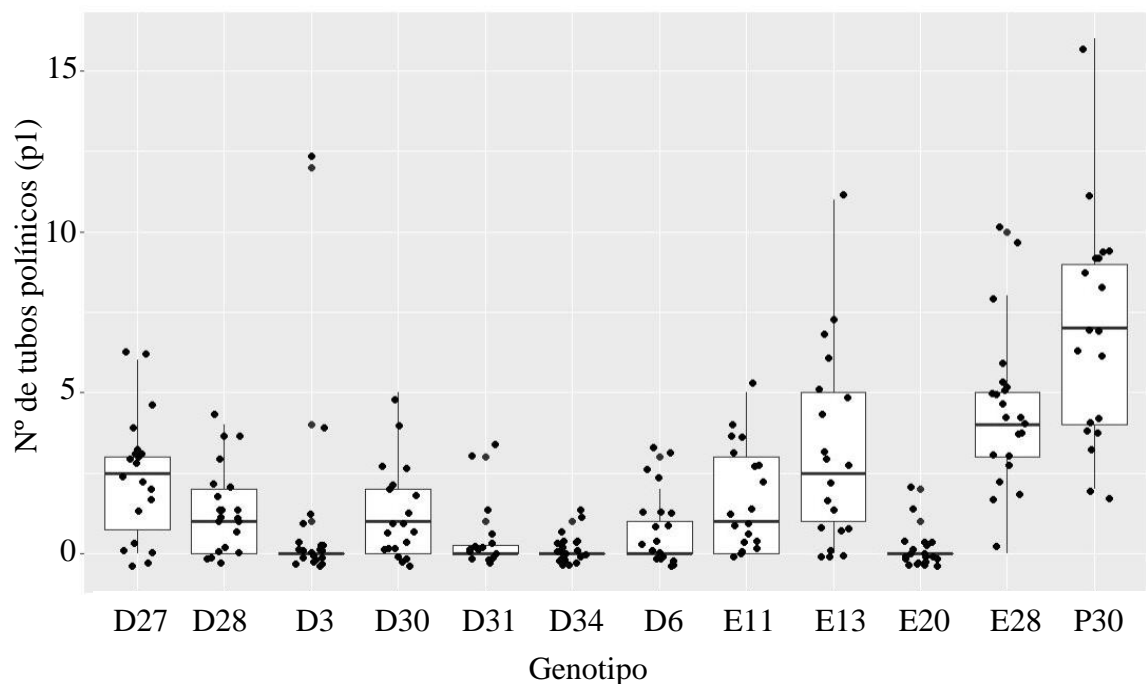


Figura 4.7 Número medio de tubos polínicos contabilizados germinando y deteniendo su crecimiento en la superficie del estigma de genotipos autocompatibles (p1).

Tubos polínicos que atraviesan todo el estigma (p2): Se encontraron diferencias significativas ($Chisq= 227,35$; $gl=11$; $Pr(>Chisq)= < 2,2e-16$) entre los genotipos en el número de tubos que atraviesan completamente el estigma. Los genotipos P30, E28, E13 y D28 presentaron las mayores medias (13,58; 7,73; 6,55 y 5,71) y los genotipos E20 y D34, las menores (0,10 y 0,05) (Figura 4.8).

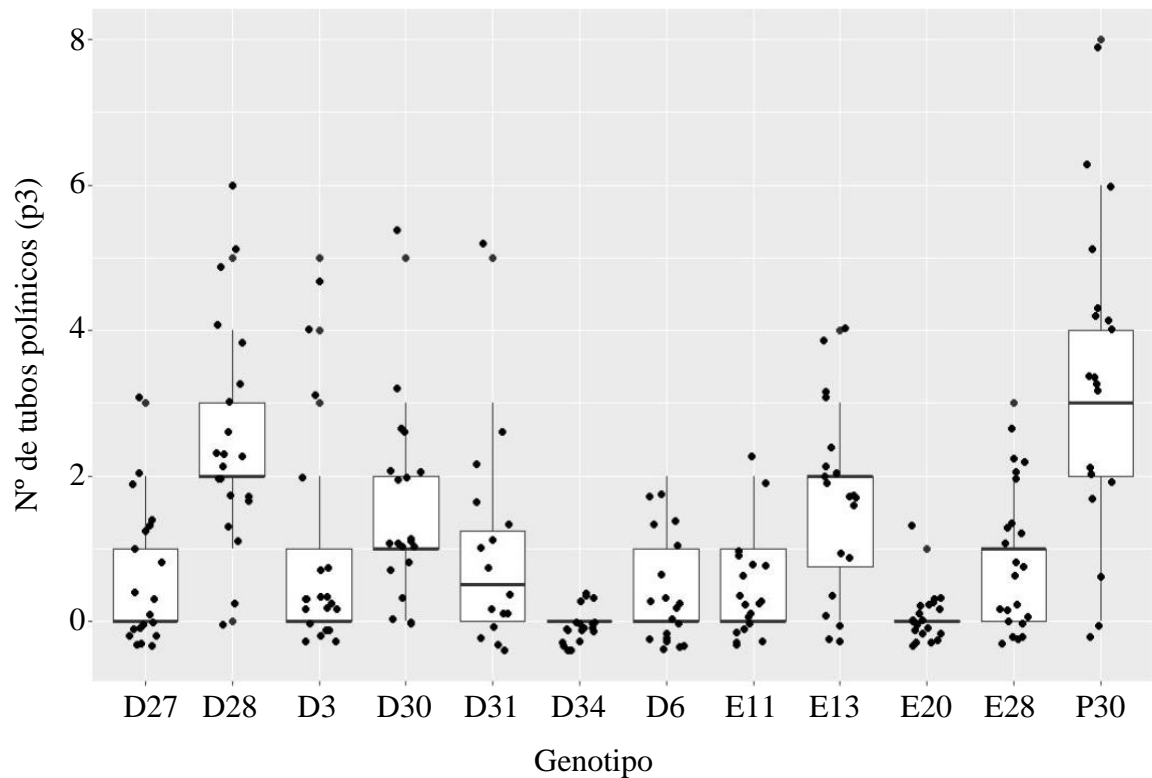


Figura 4.9 Número medio de tubos polínicos contabilizados creciendo en la zona media del estilo de genotipos autocompatibles (p3).

Tubos polínicos en la zona del ovario (p4): Se encontraron diferencias significativas ($Chisq= 75,278$; $gl=11$; $Pr(>Chisq)= 1,199e-11$) entre los genotipos en el número de tubos polínicos que alcanzaron la zona del ovario. Los genotipos D28, P30 y E13 presentaron las mayores medias (2,21; 1,71 y 0,80) y los genotipos D27 y E28, las menores (0,15 y 0,05). Los genotipos E20 y D34 no presentaron tubos en esta zona (Figura 4.10)

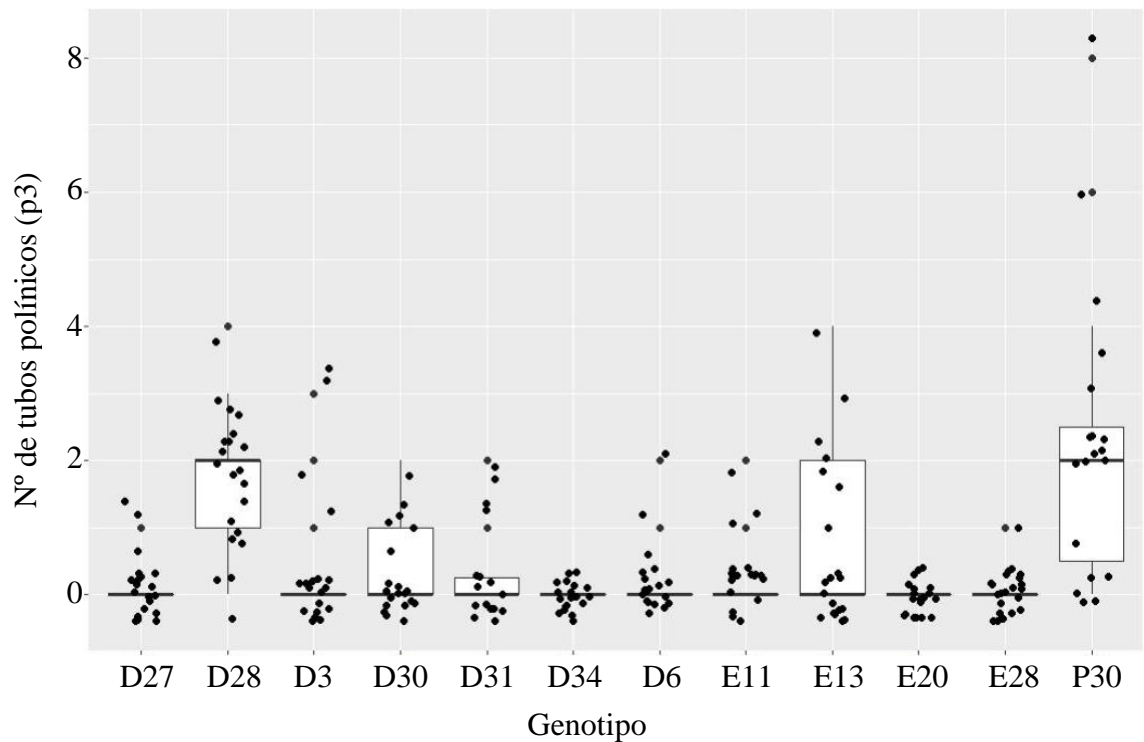


Figura 4.10 Número medio de tubos polínicos contabilizados creciendo en la zona del ovario de genotipos autocompatibles (p4).

En los genotipos autocompatibles, la presencia de tubos polínicos disminuyó desde el estigma hasta el ovario, donde un reducido número de tubos lograron contabilizarse. Se encontró que entre el 27,6 y un 89,4% de los tubos presentes en el estigma no lograba llegar al estilo y entre el 32 y 94,5% de los tubos creciendo en el estilo no llegaban a la zona del ovario. La tasa de reducción calculada para los genotipos de ambas progenies y los cruzamientos entre parentales se presenta en la tabla 4.1.

Tabla 4.1

	Tasa de reducción (%) p2 a p3	Tasa de reducción (%) p3 a p4
C(28x30)	27,59 a 73,91*	31,97 a 76,67*
S1(30x30)	50 a 89,38*	52,94 a 94,46*
P30xP30	75,98	32,19
P28xP30	79,44	65,92

*Corresponden a valores mínimos y máximos encontrados en genotipos de dichas progenies.

Las tasas de reducción encontradas se corresponden con las descritas en la especie. Martin (1967) observó una marcada disminución entre el número de tubos polínicos en el estigma respecto al estilo, un número de tubos polínicos estable a lo largo del estilo y una diferencia importante entre los tubos polínicos encontrados en el estilo respecto al ovario, sugiriendo esta disminución, como una de las posibles causas del bajo potencial reproductivo de la especie. Murata y Matsuda (2003) encontraron que en promedio el 50% de los tubos polínicos que crecían en el estigma no conseguía penetrar en la zona superior del estilo, mientras que la disminución de tubos que conseguían pasar del estilo al ovario variaba considerablemente entre los genotipos cruzados (de un 10 a un 60%). Dichos autores sin embargo sugieren que el número de tubos polínicos encontrado en la mayoría de los ovarios analizados debería ser suficiente para generar el cuaje de los frutos, proponiendo que otras causas como el elevado número de sacos embrionarios anormales y el bajo número de tubos polínicos penetrando los mismos serían el motivo de la reducida fertilidad en batata.

En la tabla 4.2 se observa el número de granos de polen sin germinar sobre el estigma y el número de tubos polínicos encontrados creciendo en las distintas zonas del gineceo. Los valores corresponden a un promedio de todas las repeticiones realizadas en cada genotipo. Los desvíos de las medias dan cuenta de la elevada variabilidad de los datos.

Tabla 4.2 Número de granos de polen sin germinar, y crecimiento del tubo polínico en las cinco posiciones evaluadas (p0, p1, p3, p4 y p5)

Progenie	Genotipo	N° de autopolinizaciones / cruzamientos	Promedio y desvíos de tubos polínicos					
			Granos de polen sin germinar	Estigma (germinan y se detienen)	Atravesando el estigma	Mitad del Estilo	Ovario	
	P28	18	4,55+/-3,16	0,27+/-0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
	P30	19	5,68+/-2,51	6,79+/-3,50	13,57+/-7,23	3,26+/-2,05	2,21+/-2,12	
	P28 x P30	19	8,89+/-6,38	8,05+/-6,07	13,52+/-5,44	2,78+/-1,90	0,95+/-0,97	
C(28x30)	D3	20	1,20+/-2,49	0,90+/-2,83	1,60+/-3,74	0,80+/-1,53	0,45+/-1,02	
C(28x30)	D4	20	2,75+/-2,19	0,05+/-0,22	0,00	0,00	0,00	
C(28x30)	D6	19	3,05+/-2,99	0,84+/-1,11	0,58+/-0,90	0,42+/-0,69	0,21+/-0,54	
C(28x30)	D8	20	0,50+/-1,08	0,00	0,00	0,00	0,00	
C(28x30)	D14	19	1,47+/-1,68	0,00	0,00	0,00	0,00	
C(28x30)	D17	20	3,75+/-4,33	0,00	0,00	0,00	0,00	
C(28x30)	D19	20	4,05+/-4,43	0,00	0,00	0,00	0,00	
C(28x30)	D27	20	4,35+/-4,26	2,40+/-1,87	2,30+/-1,98	0,60+/-0,84	0,15+/-0,37	
C(28x30)	D28	21	3,29+/-2,11	1,38+/-1,34	5,71+/-2,83	2,52+/-1,53	1,71+/-1,06	
C(28x30)	D30	20	2,65+/-1,70	1,30+/-1,24	3,00+/-2,17	1,50+/-1,31	0,35+/-0,58	
C(28x30)	D31	16	1,63+/-4,89	0,50+/-0,26	1,81+/-3,02	1,00+/-1,34	0,38+/-0,67	
C(28x30)	D34	20	5,95+/-4,80	0,15+/-0,37	0,05+/-0,23	0,00	0,00	
S1(30x30)	E5	17	0,35+/-0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	
S1(30x30)	E6	20	1,05+/-1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	
S1(30x30)	E9	19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
S1(30x30)	E11	19	2,58+/-2,00	1,74+/-1,69	1,63+/-2,01	0,47+/-0,70	0,21+/-0,54	
S1(30x30)	E13	20	3,80+/-3,15	3,10+/-3,02	6,55+/-5,64	1,7+/-1,29	0,8+/-1,27	
S1(30x30)	E20	20	0,50+/-1,00	0,15+/-0,49	0,10+/-0,45	0,05+/-0,22	0,00	
S1(30x30)	E22	20	1,15+/-1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	
S1(30x30)	E28	22	3,45+/-2,85	4,50+/-2,51	7,72+/-5,08	0,82+/-0,96	0,05+/-0,23	

En la figura 4.11 se observa la disminución encontrada de los tubos polínicos atravesando el estigma (p2), creciendo en el estilo (p3) y llegando a la zona del ovario (p4).

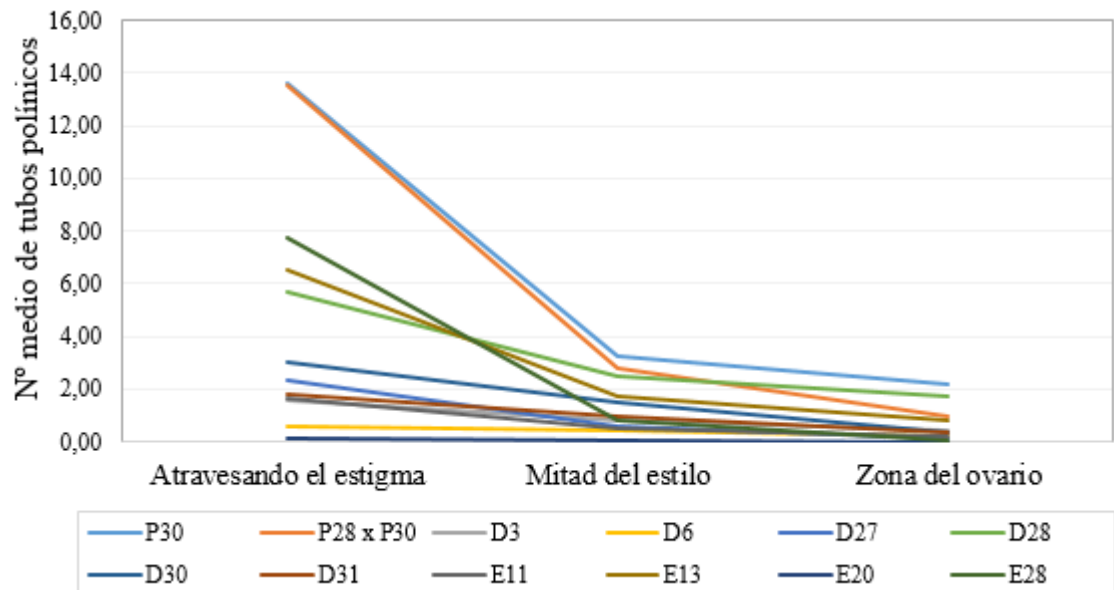


Figura 4.11 Crecimiento del tubo polínico desde la superficie del estigma hasta la zona del ovario en genotipos caracterizados como autocompatibles.

4.3.2 Descripción del crecimiento del tubo polínico

Las evaluaciones de crecimiento del tubo polínico fueron realizadas sobre tres tipos de cruzamientos: cruzamiento dirigido P28xP30, autopolinizaciones de los genotipos autocompatibles y autopolinizaciones de los genotipos autoincompatibles. En la descripción de los resultados del cruzamiento dirigido P28xP30, se incluye además una explicación general del crecimiento del tubo polínico. Esta descripción se corresponde a lo observado en los autocruzamientos de genotipos autocompatibles.

Crecimiento del tubo polínico en cruzamiento dirigido P28 x P30

- Estigma: Se observaron granos de polen germinando sobre la superficie del estigma. Se contabilizaron en promedio 13,52 tubos polínicos bien definidos, que

se caracterizaron por tener una importante cantidad de calosa, completando toda la extensión de los mismos. Los tubos se orientan hacia el estilo buscando penetrarlo.

- **Estilo:** Una vez atravesado el obstáculo que genera la conexión del estigma con el estilo, los pocos tubos polínicos que consiguen avanzar en dirección hacia el gametofito femenino, pueden ser observados como tapones de calosa que se van depositando espaciados a lo largo de su recorrido. El número promedio de tubos que se pudo observar es considerablemente menor al presente en el estigma (2,78).
- **Ovario:** En pocas repeticiones se observaron tubos polínicos en la zona del ovario. Se contabilizaron en promedio 0,95 tubos en la zona del ovario en un total de 19 cruzamientos. En esta región los tubos se caracterizaron por presentarse en forma de ovillos y por tener una deposición de calosa en casi toda su extensión. En escasas repeticiones se los observó ingresando por la micrópila. Tampoco se registró la existencia de chalazogamia (tubo polínico penetrando por la chalaza y no por la micrópila).

Crecimiento del tubo polínico en genotipos autocompatibles

La presencia de tubos polínicos en los gineceos de genotipos autocompatibles presentó diferencias entre los mismos. Los genotipos autocompatibles E5 y D6, fueron los únicos en los que fue difícil encontrar granos de polen germinados sobre los estigmas. En los genotipos autocompatibles restantes, se encontraron granos de polen germinados o tubos polínicos en alguna posición a lo largo del gineceo (Figura 4.12).

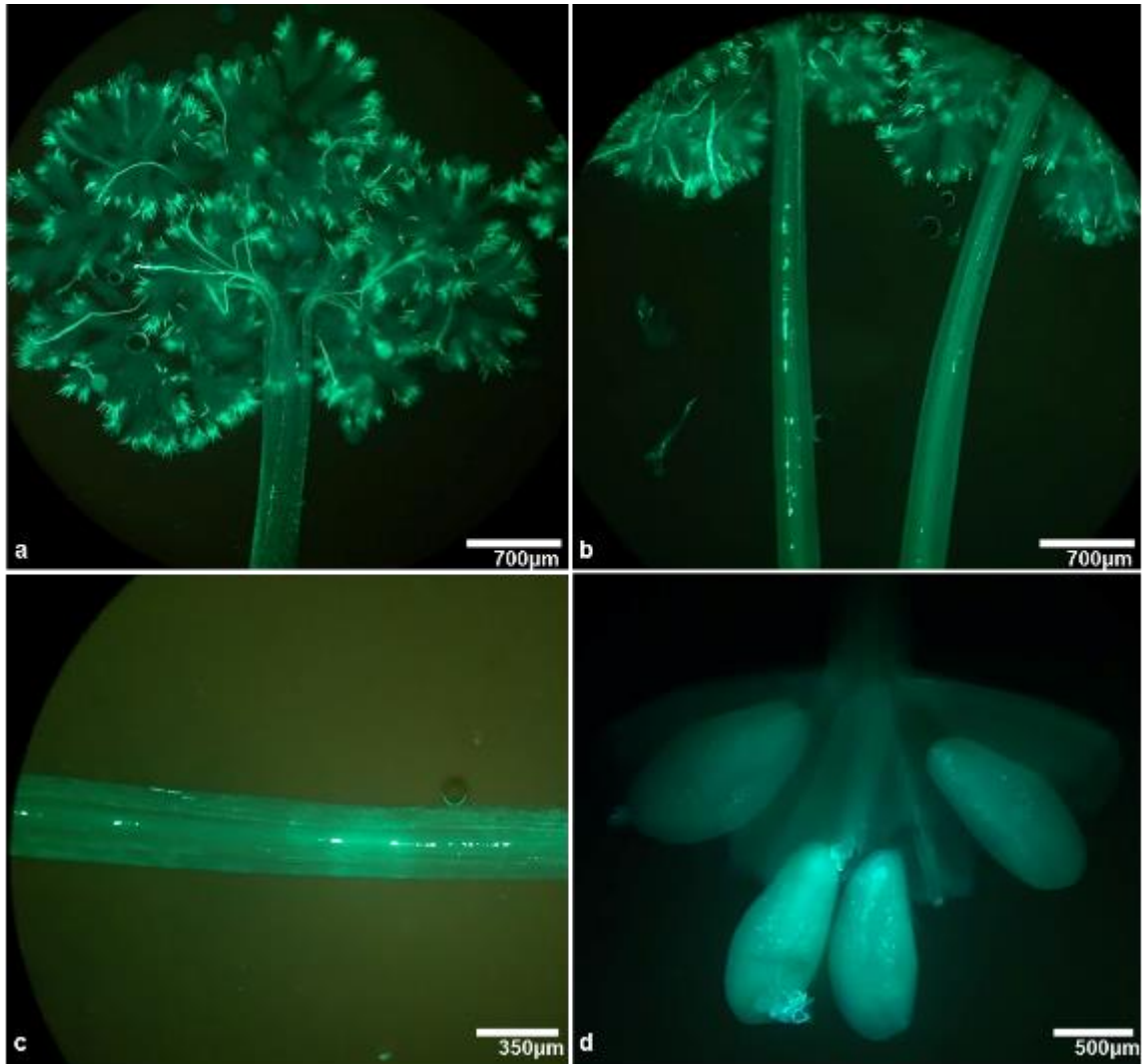


Figura 4.12 a) Crecimiento de tubos polínicos sobre el estigma del genotipo D3. b) Estilo y estigma del genotipo autocompatible P30. c) Tubos polínicos atravesando el estilo del genotipo D31. d) Tubo polínico penetrando en el óvulo del genotipo D28.

Crecimiento del tubo polínico en genotipos autoincompatibles

La ausencia de tubos polínicos dentro del gineceo fue corroborada en las distintas repeticiones de cada genotipo caracterizado a campo como autoincompatible (Figura 4.13). Se presentaron como excepciones los genotipos E13 y E20 de la progenie S1(30x30) y el genotipo D34 de la progenie C(28x30). En estos últimos se encontró, en al menos una repetición, granos de polen germinados y/o tubos polínicos creciendo a lo largo del gineceo. Estas observaciones manifiestan la necesidad de evaluar el crecimiento del tubo polínico para poder determinar el estatus de autoincompatibilidad, más allá de

las evaluaciones y autopolinizaciones que se puedan llevar a campo, dejando a la vez en evidencia la posible falla en el proceso de fecundación o en el desarrollo del embrión una vez que el tubo alcanza el gametofito femenino.

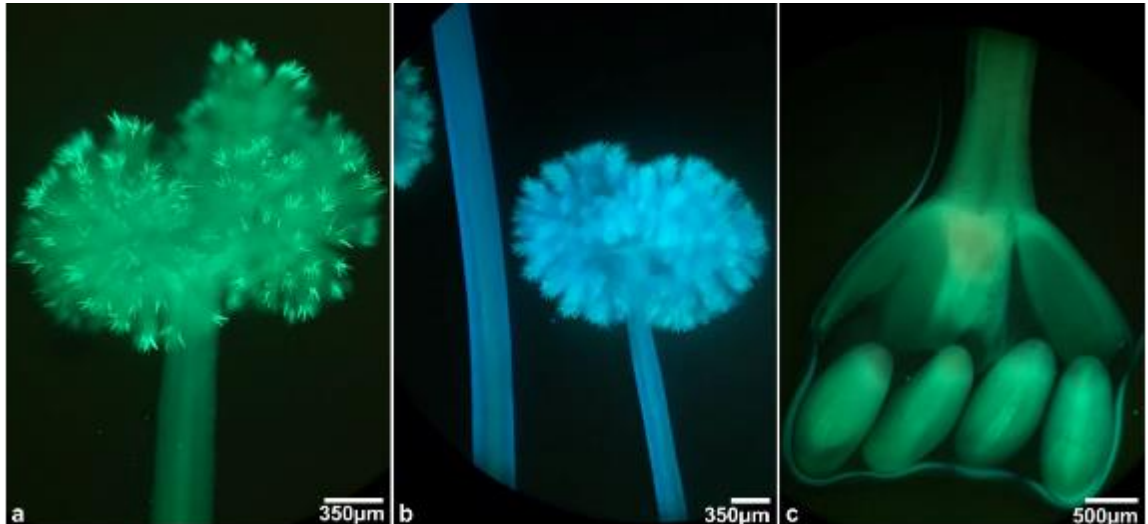


Figura 4.13 a) Estigma del genotipo D8. b) Estilo y estigma del genotipo D19. c) Óvulos del genotipo E22.

4.3.3 La microscopía de fluorescencia en la detección del SIE

El gineceo de *Ipomoea batatas* presenta sitios que ocasionan obstáculos para el crecimiento del tubo polínico hacia el óvulo. El empleo de esta técnica permitió no solo confirmar este fenómeno en todos los genotipos (excepto E5), sino también observar una variación en la deposición de calosa, la cual se caracteriza por ser continua a lo largo de todo el tubo polínico creciendo dentro del estigma, reduciéndose a sólo tapones espaciados dentro del estilo y volviendo a ser continua en el ovario.

La heterogeneidad en la morfología de los gineceos, respecto a tamaño y fragilidad es una característica a tener en cuenta para poder llevar adelante esta técnica, que no presenta más dificultad que el trato con delicadeza de las partes a ser observadas.

Esta metodología también permitió observar que existió un genotipo que a pesar de haber dado frutos luego de su autocruzamiento en invernáculo, no presentó tubos

polínicos creciendo en su gineceo. Podría considerarse para este caso la ocurrencia de apomixis, pero no se encontraron reportes de este fenómeno en *Ipomoea batatas*. A pesar de no haberse encontrado una relación directa en todos los genotipos entre la viabilidad de granos de polen y el desarrollo de tubos polínicos (Figura 4.14), la baja viabilidad del polen detectada en el genotipo E5 podría explicar el comportamiento observado.

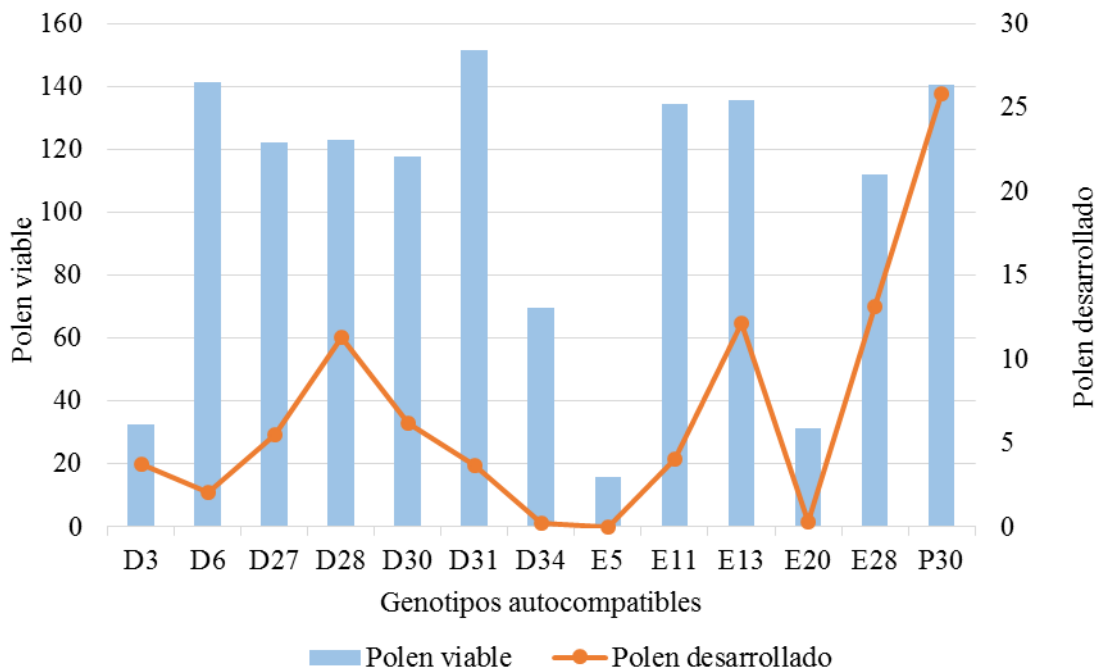


Figura 4.14 Relación entre la viabilidad del polen y el polen desarrollado (total del polen contabilizado que desarrolló tubos polínicos) en genotipos autocompatibles.

A partir de este trabajo se puede considerar la técnica de evaluación de crecimiento del tubo polínico bajo el microscopio de fluorescencia, como una técnica complementaria, necesaria y fundamental para determinar la presencia del carácter autocompatibilidad en *Ipomoea batatas*.

Capítulo 5 – Discusión general, conclusiones y perspectivas

5.1 Discusión general

Como cierre de esta tesis, este capítulo aborda una discusión general, donde se retoman resumidamente los resultados obtenidos y se contrastan con la bibliografía existente, también se discute la metodología utilizada así como sus alcances y limitaciones, verificando si las hipótesis planteadas fueron corroboradas o rechazadas y finalmente se presentan las proyecciones de este trabajo.

Si bien fueron reportados en la bibliografía genotipos AC de *I. batatas* (Wang, 1963; Van Rheenen, 1964; Martin, 1965; Young-Sup et al., 2004; Arizio, 2011), no se cuenta con registros de estudios genéticos donde se verifique la existencia de progenies AC obtenidas mediante la autopolinización de un genotipo AC o del cruzamiento de un AC con uno AI, ni la evaluación de la segregación del carácter. Mediante la estrategia utilizada se consiguió obtener progenies para evaluar el carácter de interés, encontrando 7 genotipos AC en la progenie C(28x30) y 6 genotipos AC en la progenie S1(30x30). Los cruzamientos diseñados y la evaluación del carácter de interés, permitió corroborar la primer hipótesis que se planteó: la existencia de genotipos autocompatibles en las progenies obtenidas debido a las relaciones de dominancia del locus *S*. Pudo observarse además, una reducción de la AC (%) en ambas progenies con respecto al valor medio observado en el parental AC, siendo la misma más marcada en la progenie S1(30x30). A pesar de la esperada heterocigosidad que podría presentar el parental P30, en un solo ciclo de endocría se apreció una marcada reducción de los caracteres reproductivos, lo que puede estar asociado a un posible aumento de alelos recesivos letales y una disminución de loci en estado heterocigota (Alcántar Vázquez, 2015; Busch, 2005).

En ambas progenies se encontraron valores de Fertilidad masculina (%) similares a los reportados por diversos autores en la especie (Jones, 1965; Van Marrewijk, 1973; Susanto et al., 2013). Sin embargo se detectaron genotipos que presentaron valores

inferiores de Fertilidad masculina (%) respecto a los encontrados en la bibliografía y a los valores medios observados en sus progenitores. Esta disminución fue aún mayor en la progenie S1(30x30), posiblemente relacionado con el fenómeno de depresión por endocría. Los valores estimados de Fertilidad masculina (%) no pudieron asociarse a los valores del carácter AC (%) medidos en las progenies. Se identificaron genotipos con elevada Fertilidad masculina y bajo % de AC, baja Fertilidad masculina y elevado % de AC no pudiéndose establecer una relación directa entre el polen viable y el número de frutos obtenido por autopolinización realizada.

La evaluación del crecimiento del tubo polínico no sustenta lo propuesto en la hipótesis tres: La evaluación del crecimiento del tubo polínico permite diferenciar entre genotipos autocompatibles y autoincompatibles. Si bien la mayoría de los genotipos AC presentaron tubos polínicos en las regiones evaluadas, fue escaso o nulo el número de tubos polínicos encontrados en algunos genotipos AC. Sin embargo esta técnica detectó presencia de tubos polínicos en genotipos que previamente habían sido caracterizados como AI debido a la ausencia de cápsulas en la evaluación en invernáculo. No fue posible establecer una relación absoluta entre la presencia de tubos polínicos y el carácter AC. Estos resultados sugieren la necesidad de implementar al menos dos técnicas para obtener una caracterización más aproximada de la presencia del carácter autocompatibilidad.

La reducción en el número de tubos polínicos creciendo a lo largo del gineceo coincidió con lo descrito por diversos autores (Martin y Cabanillas, 1966; Murata y Matsuda, 2003) y se corresponde con lo esperado respecto a la anatomía del estilo (Martin y Ortiz, 1967). El parental AC (P30) presentó los mayores valores medios para cada posición, y las tasas de reducción en las progenies AC fueron marcadamente mayores respecto a las experimentadas por dicho parental. El número de tubos polínicos encontrado en la zona del ovario es reducido, pero en muchos casos, mayor al número

medio de semillas observado en autocruzamientos. De esta manera, como explican Murata y Matsuda (2003) esta variable no consigue explicar el bajo número de semillas por fruto observado en todos los genotipos, siendo siempre cercano al reportado por distintos autores (Martin y Cabanillas, 1966; Wang, 1968; Mont et al., 1993; Murata y Matsuda 2003).

Resultó relevante incorporar la evaluación del crecimiento del tubo polínico para determinar el carácter AC, a pesar de no existir una relación estricta entre los caracteres, pues permitió identificar 3 genotipos autocompatibles, que en invernáculo no habían podido ser determinados como tales. También la técnica ajustada permitió esbozar una descripción completa del desarrollo del tubo a lo largo del gineceo y obtener imágenes de calidad del mismo, ausentes en la bibliografía referida al tema en batata. Además, esta técnica permitió considerar la existencia de otros procesos que generan una disminución de la fertilidad en batata e interfieren en la evaluación del carácter AC. Considerando los resultados obtenidos en el capítulo 3 y en el capítulo 4 se corrobora la segunda hipótesis que propone la existencia de procesos que generan esterilidad e interfieren con la evaluación de la incompatibilidad.

La evaluación de la variable Fertilidad femenina (%), coincidió con los datos presentados por Burham (1967) y Wang (1968). No se observó relación entre esta variable, el bajo número de cruzamientos positivos y el reducido número de semillas por fruto. De 70 genotipos evaluados, 64 contuvieron en su ovario el número esperado para la especie, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas progenies. Los 6 genotipos que difirieron en el número de óvulos por ovario, fueron caracterizados como AI. No se descarta que esta variable pudiera estar afectada por eventos anteriores o posteriores a la fertilización, como la formación de gametófitos femeninos anormales dentro del óvulo o a la ocurrencia de eventos pre- o post- cigóticos que podrían interferir

en el proceso de fertilización y formación de semillas (Mont et al., 1993; Murata y Matsuda, 2003). Resulta relevante detallar que de estos 6 genotipos, 5 pertenecieron a la progenie endocriada (S1(30x30)), y solo 1 a la segregante (C(28x30)). Esta variabilidad en el número de óvulos en aproximadamente un 15% de los genotipos endocriados se suma a la reducción del *fitness* observado en esta progenie, y podría también estar asociada a un proceso de depresión por endogamia.

Al analizar el carácter AC en las autopolinizaciones de las progenies y en las retrocruzas contra sus parentales, se observaron cruzamientos positivos bilaterales y cruzamientos unilaterales indicativos de la existencia de diferentes relaciones de dominancia para la determinante masculina y femenina del locus *S* (Martin, 1965; Gurmú et al., 2013). Esta información también sustenta la primera hipótesis que plantea que las relaciones de dominancia entre los diferentes haplotipos del locus de AI podrían explicar la autocompatibilidad de genotipo parental. La heterocigosidad de los parentales, sumado a la ploidía de la especie, generan limitaciones para identificar haplotipos y deducir sus relaciones de dominancia. Kakeda et al. (2000) encontraron un genotipo AC de *I. trifida* que presentaba un haplotipo *S* con comportamiento dominante (3:1), cuando se analizaba la progenie de un cruzamiento AC con un AI. El comportamiento observado en *I. batatas* fue diferente, y si bien, no fue posible proponer un modelo de segregación esperada, lo observado en ambas progenies muestra una segregación para el carácter AC en una proporción 4:1, comportándose como un carácter recesivo.

Para interpretar el funcionamiento del SIE en batata se esbozó un modelo considerando un haplotipo *S* con distintas relaciones de dominancia para la determinante femenina y masculina que permite la autopolinización. Se propuso también, un modelo de ruptura del haplotipo *S*, basado en la aparición de una mutación en la determinante femenina, masculina o ambas, que genera la pérdida de funcionalidad del sistema de

reconocimiento del polen propio o relacionado. Como ocurre en *I. trifida* (Kakeda et al., 2000; Kakeda et al., 2010) dicho haplotipo *S* mutado podría presentar nuevas relaciones de dominancia con los demás haplotipos *S* del genotipo en cuestión. Ambas propuestas se consideran posibles alternativas para explicar el funcionamiento del SIE en el genotipo parental P30 y las progenies autocompatibles generadas.

5.2 Conclusiones

En la presente tesis se evaluó el comportamiento del SIE de batata a partir de un genotipo AC. Se obtuvo información del comportamiento del carácter y de su segregación, evaluado a partir de las progenies generadas. La genética compleja de la especie, sumado a los problemas de fertilidad y AI complejizan el análisis, disminuyendo las conclusiones a las que se pueden llegar con las herramientas y tiempos de esta tesis. Distinto a lo observado en *I. trifida* y en consonancia con algunas especies del género *Brassica*, en las progenies evaluadas el carácter se comportó como recesivo. La información obtenida respecto a la segregación del haplotipo *S* de AI, sumado al comportamiento fenotípico observado en la progenie S1(30x30) luego de un ciclo de endocría, aportan información relevante al conocimiento de la especie.

Los métodos y técnicas empleadas en este trabajo resultan interesantes a incorporar en los programas de mejoramiento de la especie, pues permiten interpretar procesos que afectan el principal inconveniente que es la baja producción de semillas. La detección de depresión por endocría añade un nuevo desafío para la fijación de caracteres o la generación de líneas puras. El análisis del crecimiento del tubo polínico resulta un procedimiento simple que podría incorporarse para la detección temprana de incompatibilidades, optimizando la identificación de los distintos grupos de compatibilidad cruzada.

5.3 Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos se considera que podría ser relevante el análisis del comportamiento del carácter en una progenie generada a partir del cruzamiento recíproco entre los parentales ($P30_{\text{♀}} \times P28_{\text{♂}}$), para observar si la segregación del haplotipo *S* de AC en dicha progenie presenta el mismo comportamiento que el observado en la progenie segregante evaluada ($P28_{\text{♀}} \times P30_{\text{♂}}$).

Estudiar el comportamiento del haplotipo *S* en una progenie *S2* (aumentando el nivel de endocría) y medir el fenómeno de depresión endogámica en caracteres reproductivos y vegetativos de la especie, permitiría conocer la posibilidad de realizar mejoramiento genético con esquemas que involucren el aumento del nivel de endogamia. Para conseguir dicho objetivo sería necesario plantear un esquema con un elevado número de autocruzas para obtener una progenie representativa. Sin embargo, la búsqueda de genotipos con mayor homocigosis se vería limitada, considerando la depresión observada en los caracteres reproductivos en una primera generación de endocría. Como alternativa se pueden incorporar otras estrategias de retrocruza para aumentar la homocigosis del haplotipo *S* que no depriman tan abruptamente los caracteres reproductivos y vegetativos (retrocruzamientos de genotipos *S1* contra sus parentales, cruzamientos entre hermanos o entre medios hermanos).

Por último, el desarrollo de marcadores moleculares que permitan reconocer genotipos que posean el haplotipo de AC, evitaría tener la necesidad de llevar a cabo numerosos autocruzamientos para determinar la ocurrencia del carácter.

Bibliografía

- Acquaah, G. (2012). Principles of Plant Genetics and Breeding (2nd edition). John Wiley y Sons, Ltd.
- Alcántar Vázquez, J. P. (2015). La poliploidía y sus consecuencias genéticas. Temas de Ciencia y Tecnología. Vol. 19 número 57 : 3-13.
- Allen, A., Thorogood, C., Hegarty, M., Lexer, C., Hiscock, S. (2011). Pollen–pistil interactions and self-incompatibility in the Asteraceae: new insights from studies of *Senecio squalidus*. Annals of Botany. 108 : 687–698.
- Arizio, C. M. (2011). Marcadores funcionales relacionados con la síntesis de pigmentos y su localización en un mapa de ligamiento en *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Austerlitz, F., Gleiser, G., Teixeira, S. and Bernasconi, G. (2012). The effects of inbreeding, genetic dissimilarity and phenotype on male reproductive success in a dioecious plant. The Royal Society. 279 : 91-100.
- Austin, D.F. (1988). The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweet potato and related wild species. In: Exploration, Maintenance, and Utilization of Sweet Potato Genetic Resources. International Potato Center. 27–60.
- Bateman, A. J. (1955). Self-incompatibility systems in Angiosperms. III. Cruciferae. Heredity. 9 : 53-68.
- Budar, F., and Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie. 324(6) : 543-550.
- Burnham, M. (1967). Ovule number as a factor in low seed set of certain sweet potato clones. The Royal Society. 9U : 313-315.

- Busch, J. (2005). Inbreeding depression in self-incompatible and self-compatible populations of *Leavenworthia alabamica*. *Heredity*. 94 : 159–165
- Cervantes-Flores, J.C., Yenchó, G.C., Kriegner, A., Pecota, K., Faulk, M.A., Mwangi, O.M and Sosinski, B. (2007). Development of a genetic linkage map and identification of homologous linkage group in sweetpotato using multiple-dose AFLP markers. *Molecular Breeding*. 21 : 511-532.
- Chang K., Hsiao-Feng L., Yung-Chang L., Po-Jen Y., Kuan-Hung L., Shih-Ying H. (2009). Identification of quantitative trait loci associated with yield-related traits in sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Botanical Studies*. 50 : 43-55.
- Charles, W. B., Hoskin, D. G. and Cave, P. J. (1973). Overcoming self and cross incompatibilities in *Ipomoea batatas* (L.) Lam and *Ipomoea trichocarpa* Elliot. 3rd International Symposium on Tropical Root Crops, Ibadan, Nigeria. IITA. p. 17.
- Charlesworth, D. (1989). Evolution of Low Female Fertility in Plants: Pollen Limitation, Resource Allocation and Genetic Load. Elsevier Science Publishers Ltd.
- Cravero, V., Lopez Anido, F., Cointy, E. (2002). Efecto de una generación de endocria sobre caracteres vegetativos y productivos en dos estructuras familiares de alcaucil. *Horticultura Brasileira*. Vol. 20, número 3 : 459-464
- Curtis, H. S., Barnes, A., Schnek, A. y Massarini, A. (2007). *Biología* (7ma edición). Capítulo 44. Editorial Médica Panamericana.
- Cusumano, C., Zamudio, N. (2013). Manual técnico para el cultivo de batata (camote o boniato) en la provincia de Tucumán (Argentina). 1-7. Ediciones INTA.

- Dafni, A. y Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*. 222 : 113-132.
- Del Valle Di Feo, L. (2015). Producción, multiplicación y manejo de propágulos de batata de sanidad controlada. Capítulo 1. La batata: generalidades e importancia. Las virosis como principal limitante de su cultivo. 1-19. Ediciones INTA.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. R. C. W., y Robledo, C. W. (2008). InfoStat, versión 2008. Grupo infostat, fca, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2022). FAOSTAT Producción agrícola [online]. Disponible en: <https://www.fao.org>.
- Ferrero, V. (2014). Heterostilia, ¿qué sabemos hasta el momento? *Ecosistemas*. 23(3) : 23-30.
- Frost, H. B. and Soost, R. K. (1968). Seed reproduction: Development of gametes and embryos. *The Citrus Industry*. Vol 2. : 290-324.
- Gao, M., Soriano, S.F., Cao, Q., Yang, X., Lu, G. (2020). Hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) may not be a true type to either auto- or allopolyploid. *Plos One*. 15(3) : e0229624.
- Gibbs, P. (2014). Late-acting self-incompatibility - the pariah breeding system in flowering plants. *New phytologist - Tansley Reviews*. 203 : 717–734.
- Grattapaglia, D. and Sederoff, R. (1994). Genetic Linkage Maps of *Eucalyptus Grandis* and *Eucalyptus Urophylla* Using a Pseudo-Testcross: Mapping Strategy and Rapd Markers. *Genetics Society of America*. 137(4) : 1121-37.

- Greulach V.A. (1941) Sterility in plants. University of Houston. School science and mathematics. 747-758.
- Grüneberg, W. J., Ma, D., Mwanga, R.O.M., Carey, E. E., Huamani, K., Diaz, F., Eyzaguirre, R., Guaf, E., Jusuf, M., Karuniawan, A., Tjintokohadi, K., Song, Y. S., Anil, S.R., Hossain, M., Rahaman, E., Attaluri, S.I., Somé, K., Afuape, S. O., Adofo, K., Lukonge, E., Karanja, L., Ndirigwe, J., Ssemakula, G., Agili, S., Randrianaivoarivony, J. M., Chiona, M., Chipungu, F., Laurie, S. M., Ricardo, J., Andrade, M., Rausch Fernandes, F., Mello, A. S., Khan, M. A., Labonte, D. R. and Yencho, G. C. (2015). Advances in Sweet Potato Breeding from 1992 to 2012. Potato and Sweetpotato in Africa: Transforming the Value Chains for Food and Nutrition Security. Capítulo 1 : 3-68. CAB International.
- Gurmu, F., Hussein, S., Laing, M. (2013). Self- and cross-incompabilities in sweetpotato and their implications on breeding. Australian Journal of Crop Science. 7(13) : 2074-2078.
- Harder, L., Hobbhahn, N. and Richard, J. (2011). How depressed? Estimates of inbreeding effects during seed development depend on reproductive conditions. Evolution. 66-5 : 1375–1386.
- Hatakeyama, K., Watanabe, M., Takasaki, T., Ojima, K. y Hinata K. (1998). Dominance relationships between S-alleles in self-incompatible *Brassica campestris* (L.). Heredity. 80 : 241–247.
- Hernandez, T. P. and Miller, J. C. (1962). Self- and cross-incompatibilities in the sweetpotato. The Royal Society. 81 : 428-433.
- Hiscock, S. J. (2002). Pollen recognition during the self-incompatibility response in plants. Genome Biology. 3(2) : 1004.1–1004.6.

- Hiscock, S. J. and Tabah, D. A. (2003). The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. *The Royal Society*. 358 : 1037–1045.
- Hu, J., Nakatani, M., Lalusin, A.G., Kuranouchi, T., Fujimura, T. (2003). Genetic analysis of sweetpotato and wild relatives using inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Breeding Science*. 53 : 297–304.
- Huamán, Z. (1992). Botánica Sistemática y Morfología de la Planta de Batata o Camote. *Boletín de información técnica del CIP (TIBs)*. 25 : 2-20.
- Huamán, Z. (1999). Sweetpotato Germplasm Management. Training Manual - International Potato Center (CIP). 1-25.
- Huang, J.C., Sun, M. (2000). Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*. 100 : 1050–1060.
- Huang, J., Harold, C., and Mei, S. (2002). Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 49 : 541–550
- Hull-Sanders, H., Eubanks, M., Carr, D. (2005). Inbreeding Depression and Selfing Rate of *Ipomoea Hederacea* Var. *Integriscula* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany*. 92(11) : 1871–77.
- Jackson, L. K. (1997). Seed development in citrus. *Indian River Research and Education Center*. 33-42.
- Jarret, R.L., Austin, D.F. (1994). Genetic diversity and systematic relationship in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 41 : 165-173.

- Jiménez Durán, K. y Cruz García, F. (2011). Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (1): 1 – 9, 2011.
- Jones, A. (1965). Cytological observations and fertility measurements of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 86 : 527–537.
- Jones, A. (1967). Theoretical segregation ratios of qualitatively inherited characters for hexaploid sweetpotato (*Ipomoea batatas*). *Bul N°1368 USDA tech.*
- Jones, A., Dukes, P. D., Schalk, J. M. (1986). *Breeding vegetable crops*. Capítulo: Sweet potato breeding. AVI Publishing Co. University of Florida.
- Kakeda, K., Tsukada, H. and Kowyama, Y. (2000). A self-compatible mutant *S* allele conferring a dominant negative effect on the functional *S* allele in *Ipomoea trifida*. *Sexual Plant Reproduction*. 13 : 119–125.
- Kakeda K., Tsutsumi M., Kowyama Y. (2010). Deletion Mutations of the Self-incompatibility (*S*) Locus Induced by Gamma Irradiation in a Wild Diploid Species of Sweet Potato, *Ipomoea trifida*. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*. 44 : 127-131.
- Kokobu, T., Murata, T. and Endo, F. (1982). Anatomical observations on the fertilization and embryogenesis in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Japanese Journal of Breeding*. 32(3) : 239-246.
- Kowyama, Y., Shimano, N. and Kawase, T. (1980). Genetic Analysis of Incompatibility in the Diploid *Ipomoea* Species Closely Related to the Sweet Potato. *Theoretical and applied genetics*. 58 : 149-155.

- Kowyama, Y., Takahashi, H., Muraoka, K., Tani, T., Hara, K. and Shiotani I. (1994). Number, frequency and dominance relationships of S-alleles in diploid *Ipomoea trifida*. *Heredity*. 73 : 275-283.
- Kowyama, Y., Tsuchiya, T. and Kakeda, K. (2000). Sporophytic self-incompatibility in *Ipomoea trifida*, a close relative of sweetpotato. *Annals of Botany*. 85 : 191-196.
- Kriegner, A., Cervantes, J., Burg, K., Mwangi, R., Zhang, D. (2003). A genetic linkage map of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] based on AFLP markers. *Molecular Breeding*. 11: 169–185.
- Kumagai, T., Umemura, Y., Baba, T., Iwanaga, M. (1990). The inheritance of beta-amylase null in storage roots of sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Theoretical and Applied Genetics*. 79 : 369–376.
- Lincoln R. J., Boxshall G. A., Clark P. F. (1982). *A dictionary of ecology, evolution and systematics*. Cambridge University Press.
- Magoon, M.L., Krishnar, R., Vijaya Bai, K. (1970). Cytological evidences on the origin of sweetpotato. *Theoretical and Applied Genetics*. 40 : 360–366.
- Martí, H. (2018). *Producción de batata*. Capítulo 1: Generalidades. 8-12. Ediciones INTA.
- Martin, F. W. (1959). Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. *Stain Technology*. 34 : 125-128.
- Martin, F. W. (1965). Incompatibility in sweetpotato: a review. *Economic Botany*. 19 : 406-415.
- Martin, F. W. (1967). The sterility-incompatibility complex of the sweetpotato. *Proceedings of International Symposium on Tropical Root Crops*, St. Augustine, Trinidad. 3-15.

- Martin, F. W. and Cabanillas, E. (1966). Post-pollen-germination barriers to seed set in sweet-potato. *Euphytica*. 15 : 404-411.
- Martin, F.W. and Ortiz, S. (1966). Germination of sweetpotato pollen in relation to incompatibility and sterility. *The Royal Society*. 88: 491-497.
- Mason, C., Christopher, D., Rea, A., Eserman, L., Pilote, A., Batora, N., Chang, S. (2015). Low Inbreeding Depression and High Plasticity under Abiotic Stress in the Tall Morningglory (*Ipomoea purpurea*). *Weed Science*. 63(4) : 864-876.
- McCormick, S. (1998). Self-incompatibility and other pollen-pistil interactions. *Plant Biology*. 1(1):18-25.
- Mollinari, M., Olukolu, B.A., Pereira, G.D.S., Khan, A., Gemenet, D., Yencho, G.C., Zeng, Z.B. (2020). Unraveling the Hexaploid Sweetpotato Inheritance Using Ultra-Dense Multilocus Mapping. *G3, Genes, Genomes, Genetics*. 10(1) : 281-292.
- Mont, J., Iwanaga M., Orjeda, G., Watanabe K. (1993). Abortion and determination of stages for embryo rescue in crosses between sweet-potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam ($2n=6x=90$) and its wild relative, *L. trifida* (H. B. K.) G. Don. ($2n=2x=30$). *Sexual Plant Reproduction*. 6 : 176-182.
- Moura, A. and Morim, M. (2015). Convolvulaceae in Dense Ombrophilous Forest remnants in Rio de Janeiro, Brazil. *Rodriguésia*. 66(3) : 779-805.
- Muhammad, H. A., Muhammad, J. R., Jianbing, H., Qiang, X., Chenchen, L., Zonghong, C., Robert M. L., Xiuxin, D., Maurice, B. and Lijun, C. (2022). Systems and breakdown of self-incompatibility. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 41(3) : 1-31.

- Murata, T. and Matsuda, Y. (2003). Histological studies on the relationship between the process from fertilization to embryogenesis and the low seed set of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Breeding science*. 53: 41-49.
- Mwanga, R., Kriegner, A., Cervantes-Flores, J., Zhang, D., Moyer, J., Yencho, G. (2002). Resistance to sweetpotato chlorotic stunt virus and sweetpotato feathery mottle virus is mediated by two separate recessive genes in sweetpotato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 127 : 798-806
- Nasrallah, J. B. and Nasrallah, N. E. (1993). Pollen stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *The Plant Cell*. 5 : 1325–1335.
- Nasrallah, J., Rundle, S., and Nasrallah, M. (1994). Genetic evidence for the requirement of the *Brassica Slocus* receptor kinase gene in the self-incompatibility response. *The Plant Journal*. 5(3) : 373 - 384.
- Nabors, M. W. (2006). *Introducción a la botánica*. Capítulo 6: 147-157. Pearson Educación.
- Okamoto, S., Odashima, M., Fujimoto, R., Sato, Y., Kitashiba, H. and Nishio, T. (2007). Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in S-locus genes. *The Plant Journal*. 50(3):391-400.
- Qin, P., Ting, D. and Shieh, A. (2012). Callose plug deposition patterns vary in pollen tubes of *Arabidopsis thaliana* ecotypes and tomato species. *BMC Plant Biology*. 12 : 178.
- Rahman, M.H., Uchiyama, M., Kuno, M., Hirashima N., Suwabe K., Tsuchiya T., Kagaya Y, Kobayashi I., Kakeda K. y Kowiyama Y. (2007). Expression of stigma- and anther-specific genes located in the S locus region of *Ipomoea trifida*. *Sexual Plant Reproduction*. 20 : 73–85.

- Reynoso, D., Huamán, Z. and Aguilar, C. (1999a). Methods to determine the fertility and compatibility of sweetpotato. Sweetpotato Germplasm Management: Training Manual. 133-169. International Potato Center.
- Reynoso, D., Huamán, Z. and Aguilar, C. (1999b). Methods to induce flowering in sweetpotato. In: Huaman, Z (ed) Sweetpotato Germplasm Management: Training Manual. 133-169. International Potato Center.
- Schierup, M., Vekemans, X., and Christiansen, F. (1997). Evolutionary Dynamics of Sporophytic Self-Incompatibility Alleles in Plants. Genetics Society of America. 147(2) : 835–846.
- Schoen, D. J. and Busch, J. W. (2009). The evolution of dominance in sporophytic self-incompatibility systems. II. Mate availability and recombination. Evolution. 63(8) : 2099-113.
- Shiotani, I. and Kawase, T. (1989). Genomic structure of the sweetpotato and hexaploids in *Ipomoea trifida* (HBK) DON. Japan Journal Breeding. 39 : 57-66.
- Sleper, D. A. and Poehlman, J. M. (2006) Breeding Field Crops. Cap. 7. Blackwell Publishing Professional.
- Srisuwan, S., Darasinh, S., Sonja, S. (2006). The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. Plant Science. 171 : 424-433.
- Stephenson, A. G., Hayes, C. N., Jóhannsson, M. H. (2001). The performance of microgametophytes is affected by inbreeding depression and hybrid vigor in the sporophytic generation. Sexual Plant Reproduction. 14 : 77–83.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>

- Susanto, F. A., Sulasmi, E. S., Rahayuningish, S. A. (2013). Pollen Morphology and Sucrose Giving on Stigma Relation with Incompatibility of Sweetpotato *Ipomoea batatas* (L.). The Journal of Tropical Life Science. 3 : 207-211.
- Takayama, S. and Isogai, A. (2005). Self-Incompatibility in Plants. Annual Review of Plant Biology. 56 : 467-489.
- Theisen, K. (2020). World sweet potato atlas. Disponible en: <https://www.worldsweetpotatoatlas.com>.
- Ting, Y.C., Kehr, A. E. (1953). Meiotic studies in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Heredity. 44 : 207–211.
- Tomita, R. N., Suzuki, G., Yoshida, K., Yano, K., Tsuchiya, T., Kakeda K., Mukai, Y. and Kowyama, Y. (2004). Molecular characterization of a 313-kb genomic region containing the self-incompatibility locus of *Ipomoea trifida*, a diploid relative of sweet potato. Breeding Science. 54 : 165-175.
- Tsuchimatsu, T., Kaiser, P., Yew, C.L., Bachelier, J.B., Shimizu, K.K. (2012). Recent Loss of Self-Incompatibility by Degradation of the Male Component in Allotetraploid *Arabidopsis kamchatica*. PLOS Genetics. 8(7) : e1002838.
- Ukoskit, K., Thompson, P.G. (1997). Autopolyploidy versus allopolyploidy and low-density randomly amplified polymorphic DNA linkage maps of sweetpotato. Journal of the American Society for Horticultural Science. 122 : 822–828.
- Van Marrewijk, G.A.M. (1973). The sterility-incompatibility complex in sweet potato.
- Van Rheenen, H. A. (1964). Breeding research in sweet potato, *Ipomoea batatas* Poir. Euphytica. 13 : 94-99.

- Vimala, B. and Hariprakash, B. (2011). Variability of morphological characters and dry matter content in the hybrid progenies of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Gene Conserve*. 10 : 65-86.
- Vogler, D., Filmore, K, Stephenson, A. (1999). Inbreeding depression in *Campanula rapunculoides* (L.) I. A comparison of inbreeding depression in plants derived from strong and weak self-incompatibility phenotypes. *Journal of Evolutionary Biology*. 12 : 483-494.
- Wang, H. (1963). A study on the self and cross incompatibilities in the sweetpotato in Taiwan. *The Royal Society*. 84 : 424-430.
- Wang, H. (1968). A study of fruit and seed setting ability and female sterility in the sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 9 : 139-153.
- Woolfe, J. A. (1992). Sweet potato, an untapped food resource. *Sweet potato, past and present*. 15-38. Cambridge University Press.
- Young-Sup, A., Song, Y. S., Jeong, B. C. and Min, K. S. (2004). Cross-Incompatible Groups and Genetic Variation by RAPD of Korean Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] Varieties. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*. 681-685. Fischer RA (ed).