



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

**Estudio de las funciones sexuales y la
autoincompatibilidad en *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.
(Solanaceae)**



Alumna: María Laura Bo

Director: Dra. Carolina Carrizo García

Co-director: Dra. María Teresa Cosa

Lugar de trabajo: Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)

Estudio de las funciones sexuales y la autoincompatibilidad en
Capsicum pubescens Ruiz & Pav. (Solanaceae)

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Calificación:

Fecha:

INDICE

Resumen	1
I.INTRODUCCIÓN	2
Objetivos.....	¡Error! Marcador no definido.
II.MATERIALES Y MÉTODOS	4
II. 1. Morfología	4
II.2. Estudio de las funciones sexuales	5
II.3. Nivel de autoincompatibilidad.....	7
II.4. Histoquímica de la fase progámica	7
II. 5. Análisis estadístico	7
III.RESULTADOS:	8
III.1. Estudio de las funciones sexuales	8
III.2. Nivel de autoincompatibilidad.....	13
III.3.Histoquímica de la fase progámica	14
IV.DISCUSION	20
V.CONCLUSIONES	23
VI.BIBLIOGRAFIA	24

Estudio de las funciones sexuales y la autoincompatibilidad en *Capsicum pubescens* Ruiz & Pav. (Solanaceae)

Resumen

Capsicum pubescens Ruiz & Pav. (Solanaceae) es un ají Sudamericano, conocido como 'rocoto' o 'locoto', que se encuentra sólo en formas cultivadas. Comúnmente es descripto como autocompatible, pero se han encontrado líneas autoincompatibles en la especie.

Con el objeto de caracterizar las funciones sexuales y determinar la existencia de autoincompatibilidad en genotipos argentinos de *C. pubescens*, se definieron las condiciones de fertilidad masculina y femenina, así como la condición de compatibilidad, en individuos de una población artificial (n=5) procedentes del NOA (Salta, Jujuy). Para los últimos, se realizaron autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas para determinar la formación de frutos y calcular el nivel de autoincompatibilidad.

Todos los individuos de *C. pubescens* resultaron fértiles, con altos porcentajes de polen viable y funcional ($85.09\% \pm 5.95$ y $46.28\% \pm 6.86$, viabilidad y germinabilidad respectivamente). Por su parte, el estigma es receptivo y capaz de sostener el crecimiento de tubos polínicos desde el momento de la apertura floral. A pesar de que ambos ciclos son fértiles, los tubos polínicos detienen su crecimiento en distintos tercios del estilo en los casos de autopolinización. De acuerdo al porcentaje de frutos formados por autopolinización y polinización cruzada se determinó que todos los individuos presentan diferentes niveles de autoincompatibilidad, i.e. ningún genotipo resultó autocompatible.

A nivel histológico, si bien no se obtuvo el mismo nivel de análisis que estudios anteriores realizados en el género, se observaron las mismas características y tendencias de cambio en la epidermis estigmática, el tejido de transmisión y el contenido de almidón en el estilo desde estadios pre-antesis hasta diferentes estadios post-antesis/post-polinización. En general no se observaron diferencias entre los tratamientos estudiados (pistilos no polinizados, autopolinizados y con polinización cruzada), excepto para el contenido de almidón, que disminuye en los casos de polinización.

La autoincompatibilidad no podría considerarse un fenómeno aislado en *C. pubescens*. Las características del polen y de la fase progámica indicarían que se trata de otro caso de autoincompatibilidad gametofítica en Solanaceae.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, viabilidad del polen, receptividad estigmática, autoincompatibilidad.

I. INTRODUCCIÓN

Capsicum L. (Solanaceae) es un género sudamericano compuesto por ca. 32 especies (Barboza et al. 2011) que comprende a los ajíes y pimientos, cultivares de gran relevancia económica mundial. Si bien las especies más importantes a escala global son las que integran el complejo *C. annuum* (*C. annuum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. frutescens* L.), existen otras 2 especies, *C. pubescens* Ruiz & Pav. y *C. baccatum* L., que son cultivadas en forma predominante en Latinoamérica (Bosland 1996).

Los frutos de los diversos miembros del género *Capsicum* son fuente de colorantes naturales, capsaicinas y compuestos secundarios como el ácido ascórbico, todos de gran interés para la elaboración de productos industriales tales como alimentos en conserva, cosméticos, productos farmacéuticos, nutracéuticos, etc. (Simón et al. 1984; Coe & Anderson 1996; Meléndez 1998). Los dos compuestos químicos más importantes presentes en los ajíes son los carotenoides (de alto valor nutricional) y los capsaicinoides (alcaloides que confieren pungencia); también se pueden encontrar aceites volátiles, aceites grasos, vitaminas, proteínas, fibras y elementos minerales (Bosland & Votava 2000; Krishna 2003).

Capsicum pubescens, conocido vulgarmente como 'locoto' o 'rocoto', es una especie que se cultiva principalmente en las tierras altas de Sudamérica, desde el NO argentino hasta México (Bosland 1996). Se sostiene que sólo se encuentran formas cultivadas de la especie (Heiser & Smith 1948), que habría sido domesticada hace unos 6000 años, convirtiéndose así en una de las plantas domesticadas más antigua de América (DeWitt & Bosland 2009).

Dentro del género, si bien se la ha relacionado anteriormente con el grupo formado por *C. cardenasii* Heiser & Smith, *C. eximium* Hunz. y *C. tovarii* Eshbaugh, Smith & Nickrent (Eshbaugh 1993), nuevos estudios filogenéticos muestran que formaría un clado independiente (Carrizo Garcia et al. en prep.). Se trata de hierbas con tallos y hojas densamente pubescentes, con flores de corola púrpura, con manchas blancas y/o amarillas en la base. Sus frutos son bayas rojas, naranjas o amarillas, carnosas y picantes, y sus semillas son de color negro. Existen diversos cultivares de *C. pubescens*, aunque no claramente delimitados, manifestando variaciones en el color y la forma de sus frutos (Rick 1950; DeWitt & Bosland 2009).

Dado que a nivel económico interesan los frutos como producto comercial (Pickersgill 1991; Eshbaugh 1979, 1993; Bosland & Votava 2000), resulta de gran interés conocer los diferentes procesos involucrados en la reproducción. La polinización efectiva es un requisito previo para el cuajado del fruto y el establecimiento de las semillas en la mayoría de las plantas, y es por esto que se requiere información sobre la biología del polen, incluyendo la viabilidad y el crecimiento del tubo polínico (Abdelgadir et al. 2012; Bolat & Pirlak 1999). De hecho, la evaluación de la viabilidad del polen es importante para el estudio de varios aspectos

biológicos de la polinización, tales como: interacciones polen-estigma, incompatibilidad y fertilidad, germinabilidad del polen, entre otras (Dafni & Firmage 2000).

A pesar de ello, los estudios de aspectos relacionados con la polinización, la fructificación y las funciones sexuales se han concentrado casi exclusivamente en *C. annuum* (p.e. Quagliotti 1979; De Ruijter et al. 1991; Kubišová & Háslbachová 1991; Marcelis & Baan Hofman-Eijer 1997; Aleemullah et al. 2000; Raw 2000; Ercan & Onus 2003; Luo et al. 2006; Roldán Serrano & Guerra-Sanz 2006), siendo mucho más escasa y dispersa la información referida a las demás especies del género, sean silvestres o domesticadas (p.e. Saborío & Da Costa 1992; Onus 2000; Carrizo García 2011).

La relación entre el polen y el estigma depende de la viabilidad del polen, la receptividad estigmática y de la interacción genética entre los parentales, según el sistema de incompatibilidad (SI) (Dafni et. al, 2005). Este sistema es uno de los mecanismos que permite la alogamia en plantas con flores (Newbiggin et al. 1993) y como consecuencia la variabilidad genética de la descendencia, evitando por lo tanto la endogamia. Según Nettancourt (1977) y Lundquist (1964), la autoincompatibilidad es considerada como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil de producir cigotos luego de ser autopolinizada.

La autoincompatibilidad gametofítica (determinada por el genotipo del polen) es la más común entre las familias de angiospermas y ha sido identificada en Solanáceas de importancia económica como *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon*, *Petunia* y *Capsicum* (p.e. Yaqub & Smith, 1971; Clarke et al. 1985; Webb & Williams, 1988; Saborío & Da Costa 1992).

Se sostiene que las especies de *Capsicum* son autocompatibles y autopolinizantes (Bosland & Votava 2000), con la excepción de *C. cardenasii* (Yaqub & Smith 1971; Onus & Pickersgill 2004). Sin embargo, si bien generalmente se ha considerado a *C. pubescens* como autocompatible (p.e. Onus & Pickersgill 2004), se han encontrado líneas autoincompatibles en la especie (Yaqub & Smith 1971; Saborío & Da Costa 1992; Bosland & Votava 2000), registrándose incluso diferentes grados de autoincompatibilidad (Saborío & Da Costa 1992). No obstante, no se ha analizado en detalle la fase progámica y nada se conoce aún sobre las funciones sexuales en los diferentes genotipos (p.e. fertilidad del polen), variables que afectan directamente a la formación de frutos.

De acuerdo a la evidencia existente para *C. pubescens*, y teniendo en mente que se ha reportado autoincompatibilidad gametofítica en otros géneros de Solanaceae (McClure & Franklin-Tong 2006), se plantean las siguientes hipótesis referidas a la reproducción de la especie:

1. Los individuos presentarían ambos ciclos sexuales fértiles.
2. La autoincompatibilidad en la especie sería una característica propia de algunos individuos/genotipos y no generalizada.
3. Como consecuencia de una reacción de autoincompatibilidad, los tubos polínicos

detendrían su desarrollo en el estilo.

Considerando que hasta la fecha no se han estudiado las características reproductivas de genotipos de *C. pubescens* cultivados en Argentina, con el objeto de testear las hipótesis planteadas se propone caracterizar las funciones sexuales, analizar la relación polen-tubos polínicos y pistilo, y definir el nivel de autoincompatibilidad en individuos de una población artificial de *C. pubescens* de Argentina.

Objetivo general:

Profundizar el conocimiento de las características reproductivas de *C. pubescens*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar las funciones sexuales de diferentes individuos separadamente en base a las siguientes variables: viabilidad-longevidad del polen, capacidad de germinación del polen, receptividad estigmática.
2. Determinar el nivel de autoincompatibilidad de cada individuo a partir de autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas controladas.
3. Identificar el momento en que se produciría la reacción de autoincompatibilidad.
4. Analizar estilo y estigma a nivel histológico en la fase progámica.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una población artificial (n= 5) de plantas de *C. pubescens*, con genotipos cultivados en el NOA (Salta, Jujuy), mantenida en cultivo en el invernadero del IMBIV, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ($31.29^\circ \pm 2$ y 28.13% , respectivamente).

II. 1. Morfología

La morfología del pistilo y las anteras se estudió en materiales sin tratamiento previo mediante el uso de los microscopios estereoscópico Olympus SZX16 (IMBIV) y confocal láser 3D Olympus LEXT OLS4000 (Lamarx, FaMAF, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). El polen fue analizado por medio de microscopía electrónica de barrido, utilizando un microscopio LEO 1450VP (Labmem, Universidad Nacional de San Luis, Argentina). Para ello, el polen deshidratado fue montado en discos de carbono y cubierto con un baño de oro-paladio. En todos los casos se tomaron fotomicrografías digitales.

II.2. Estudio de las funciones sexuales

Para determinar el nivel de fertilidad de cada ciclo sexual, en cada planta de la población en estudio se definieron las siguientes características:

- a. viabilidad y longevidad del polen,
- b. germinabilidad del polen *in vitro*,
- c. capacidad germinativa del polen en el estigma,
- d. receptividad estigmática / capacidad del pistilo de sostener el crecimiento de tubos polínicos.

Dado que el grado de apertura de las anteras y exposición del polen es variable en el primer día de la antesis, para estudiar las características de los puntos a, b y c se utilizó polen del segundo día de la antesis (D2), para así referirlas a un momento estandarizado. En el caso de la receptividad estigmática, se analizó en el primer día de la antesis (D1), utilizando polen del segundo día de la antesis para realizar las polinizaciones.

Viabilidad y longevidad del polen:

Para determinar la fertilidad del polen se aplicaron dos métodos complementarios. Por un lado se utilizó la coloración con Rojo Neutro (Dafni et al. 2005) para determinar el porcentaje de polen abortado. El colorante tiñe de rojo intenso los granos de polen que poseen citoplasma, mientras que aquéllos que carecen del mismo, i.e. abortados, adquieren sólo un color rosado traslúcido (Fig. 1 A).

Por otro lado, aplicando la reacción con MTT (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-yl]-2, 5-difeniltetrazolio bromuro 1 mg/ml en agua destilada; Dafni et al. 2005) se detectó el polen metabólicamente activo, que adquiere una coloración violeta-purpúrea, discriminándolo del polen con citoplasma no activo, que permanece ligeramente rosado (Fig. 1 B). Este método permitió determinar el porcentaje de polen viable desde en el momento en que queda disponible para polinizar (D2) y la longevidad del polen, testeando su viabilidad durante los días tres, siete y diez posteriores a la apertura floral (D3, D7, D10, respectivamente), o hasta que alcanzó valores cercanos a 0%.

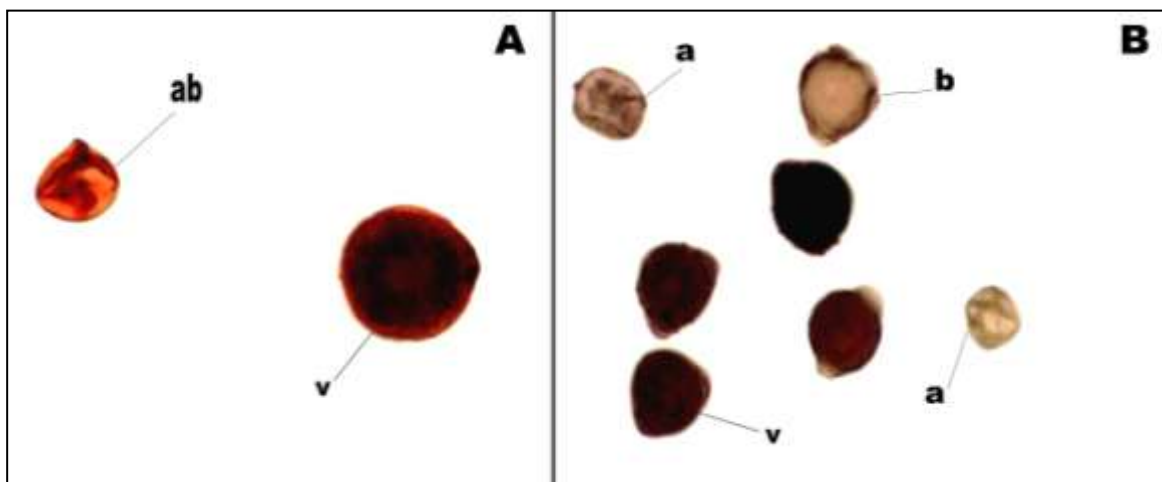


Fig. 1. Test de viabilidad del polen de *C. pubescens*. A) Coloración vital con Rojo neutro. B) Reacción con MTT. a) Polen no viable vacío; ab) polen abortado; b) polen no viable con citoplasma; v) polen viable/no abortado.

En todos los casos el porcentaje de polen viable se calculó sobre 100 granos de polen (alícuotas tomadas de una mezcla del polen de al menos tres flores por individuo), por triplicado, en cada uno de los 5 individuos.

Germinabilidad del polen *in vitro*:

La germinabilidad del polen se evaluó cultivándolo en el medio de cultivo líquido sugerido por Mercado et al. (1994). Según análisis previos, el tiempo estandarizado de germinación fue de 1:30 hs, momento en el que se realizó el recuento de polen germinado; se consideró al polen germinado cuando la extensión de los tubos polínicos formados alcanzó la medida del diámetro del polen hidratado.

El recuento se realizó sobre 200 granos de polen (alícuotas tomadas de una mezcla del polen de al menos tres flores por individuo) por triplicado en cada individuo en estudio.

Capacidad germinativa del polen en el estigma y receptividad estigmática:

Se realizaron autopolinizaciones manuales en flores recolectadas el día de la antesis y mantenidas en el laboratorio en viales con agua (test semi *in vivo*).

Los pistilos fueron fijados en FAA 6 hs post-polinización. Para determinar si hubo formación de tubos polínicos se utilizó la técnica de *style squash* y tinción con Azul de Anilina (Mori et al. 2006). Mediante el uso de microscopía de luz fluorescente se pudo observar si el polen fue capaz de germinar sobre el estigma y de esta forma determinar también si el estigma era receptivo y capaz de sostener la germinación del polen. Estas observaciones se realizaron en un n=10 flores para cada individuo, registrando la ausencia/presencia de tubos polínicos, y calculando el porcentaje de estigmas con tubos polínicos formados.

II.3. Nivel de autoincompatibilidad

Para determinar el nivel de autoincompatibilidad se realizaron polinizaciones manuales con polen propio (autopolinizaciones) y alopolen de origen conocido (polinizaciones cruzadas) en 20 flores para cada caso y en cada individuo, determinando el número de frutos formados en todos los casos.

El nivel de autoincompatibilidad de cada individuo se estableció en base a la capacidad de formación de frutos a partir de autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas, utilizando el índice (ISI) propuesto por Dafni (1992):

$$\text{ISI} = (\% \text{ frutos de autopolinización} / \% \text{ frutos de polinización cruzada})$$

En el caso particular de los pistilos autopolinizados, aquéllos que no formaron fruto fueron conservados y utilizados para definir el sector donde se habría producido la reacción de autoincompatibilidad. Para la detección de los tubos polínicos en el estilo se aplicó la técnica de *style squash* y tinción con Azul de Anilina (Mori et al. 2006).

II.4. Histoquímica de la fase progámica

La histoquímica de la fase progámica se analizó en forma comparada en los siguientes tratamientos:

1. Pistilos no polinizados (control),
2. Pistilos autopolinizados,
3. Pistilos de polinización cruzada.

En cada uno de los tratamientos se consideraron distintos estadios de desarrollo, a saber:

1. Preantesis (D-1) en pistilos no polinizados,
2. Momento de la completa apertura de la corola (D1) en pistilos no polinizados,
3. Diferentes períodos luego de la apertura total de la corola (D1+6hs, D1+24hs y D1+72 hs) en pistilos de todos los tratamientos.

Los pistilos fueron fijados en FAA y luego procesados para hacer cortes histológicos (longitudinales y transversales), siguiendo técnicas clásicas (D'Ambrogio de Argüeso 1986).

Se utilizó Azul de Toluidina 0,5 % como colorante general y los siguientes colorantes para sustancias específicas: Calcofluor White (0.01 % en KPO_4) para celulosa, Auramina O (solución saturada) para sustancias lipídicas, particularmente cutícula, y Lugol (KI 2%, I 0.2%) para almidón. Según los requerimientos de cada coloración se hicieron observaciones en microscopio en campo claro o utilizando epifluorescencia, y se tomaron microfotografías digitales. Las observaciones se realizaron en un microscopio automático Olympus BX61 (IMBIV).

La definición de los tratamientos permitió observar si se produjeron cambios en estilo y estigma una vez ocurrida la polinización (interacción polen-estigma), y si se manifestaron diferentes patrones histoquímicos en individuos autopolinizados o luego de polinizaciones cruzadas, contrastados a su vez con pistilos no polinizados (control).

Se definió el número de núcleos del polen en el momento de la dispersión mediante la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0.01 mg/ml en agua (Golf & Coleman 1984). Se testeó la presencia de almidón en el polen maduro del primer día de la antesis, utilizando la reacción con Lugol. Se realizó el recuento de polen con contenido de almidón sobre 100 granos de polen (alícuotas tomadas de una mezcla del polen de al menos tres flores por individuo), por triplicado, en cada individuo. De acuerdo al porcentaje de granos de polen con almidón, el mismo se denominó: sin almidón (0%), mayormente sin almidón (menos de 50%), mayormente con almidón (más del 50%).

II. 5. Análisis estadístico

Se calcularon valores medios para la viabilidad-longevidad y germinabilidad del polen. Los datos fueron analizados mediante ANOVA, siempre que tuvieran distribución normal, comparando las medias utilizando el test de Tukey ($P = 0.05$).

Mediante un análisis de correlación de Pearson ($P = 0.05$) se evaluó la relación entre el porcentaje de frutos formados por polinización cruzada y el nivel de autoincompatibilidad.

III. RESULTADOS

III.1. Estudio de las funciones sexuales

Capsicum pubescens presenta flores solitarias, actinomorfas, hipóginas y pentámeras, que viven al menos 2-3 días. Corola con 5-6 pétalos, de color púrpura con manchas blancas y /o amarillas en la base de sus pétalos (Fig. 2 A, C). Anteras 5-6 de color purpúreo, de dehiscencia longitudinal (Fig. 2 A, B); la apertura de las anteras es gradual a lo largo de la tarde del primer día de la antesis, quedando en general las anteras completamente abiertas (i.e. el polen disponible para polinizar) desde el segundo día de la apertura floral (Fig. 2 C, D).



Fig. 2. Períodos de la flor de *C. pubescens*. A-B) Primeras horas del primer día de antesis. A) Estigma receptivo y anteras cerradas. B) Detalle del estigma cubierto de exudado. C-D) Segundo día de la antesis. C) Estigma receptivo, anteras abiertas y polen expuesto; D) Detalle del estigma con exudado y polen expuesto para su dispersión.

El gineceo presenta un estigma papiloso húmedo (Figs. 2, 10). En las primeras horas del primer día de antesis el estigma ya se encuentra receptivo, cuando las anteras están aún cerradas (Fig. 2 A, B), coexistiendo posteriormente ambas funciones (Fig. 2 C, D). El estigma presenta una coloración verdosa, destacándose del estilo completamente púrpura (Fig. 2).

Los granos de polen son en promedio de diámetro pequeño en estado hidratado ($24.91 \mu\text{m} \pm 1.88$), tricolporados (Fig. 3 A-C), de ámbito circular en vista polar (Fig. 3 B), con ornamentación micro-equinada o micro-espinulada perforada (Fig. 3 D, E).

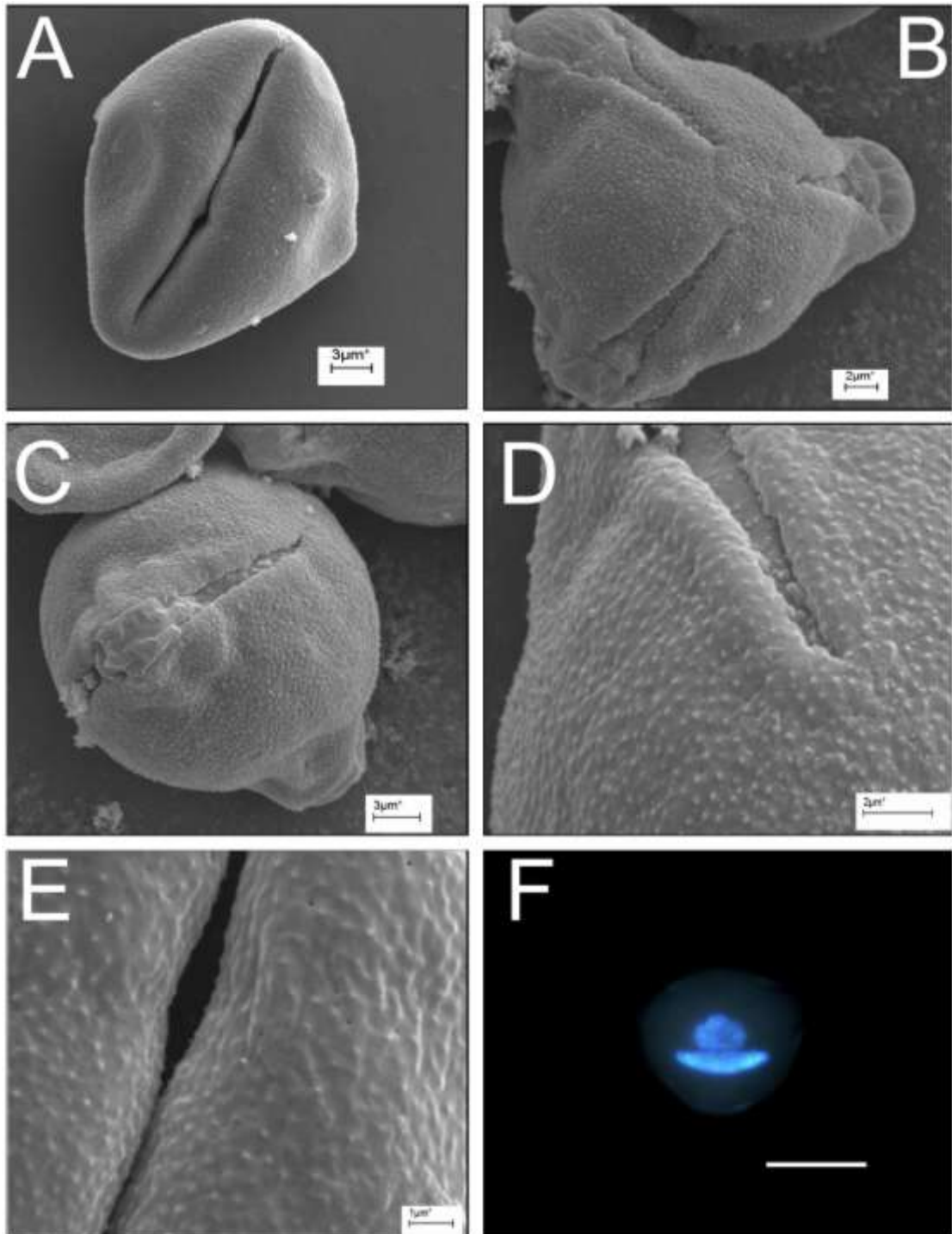


Fig. 3. Características del polen de *C. pubescens*: A) Polen en estado deshidratado. B-C) Polen en estado hidratado en vista polar (B) y ecuatorial; obsérvese la apertura compuesta. D-E) Detalle de la ornamentación. F) Polen binucleado (Tinción con Dapi; Escala: 100 μm).

A nivel citológico, el polen es binucleado en el momento de su dispersión (Fig. 2 F); los granos de polen se dispersan en mónades. El contenido de almidón del polen varía entre individuos, a saber: polen sin almidón en las plantas 1 y 4, polen mayormente sin almidón en la planta 2 (6.67% con almidón), y polen mayormente con almidón en las plantas 3 y 5 (72 y 75.67%, respectivamente; Fig. 4).

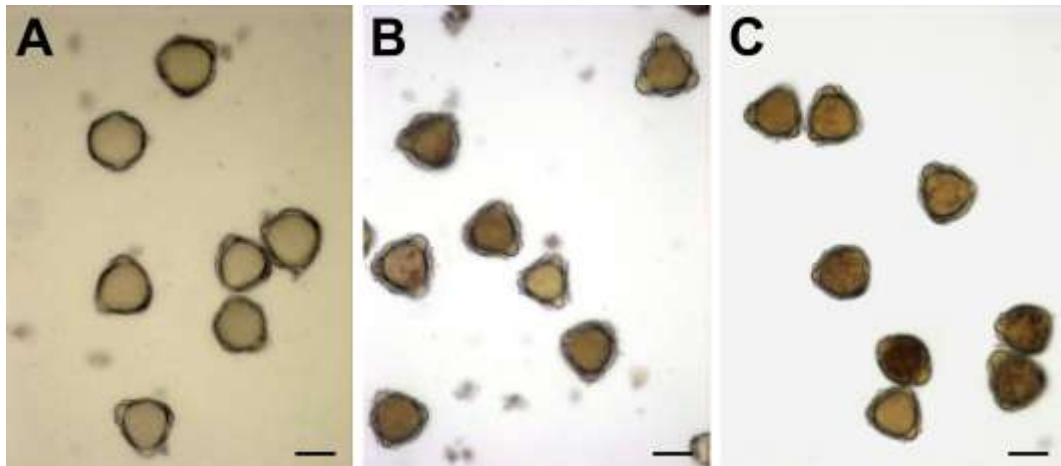


Fig. 4. Variación en el contenido de almidón en el polen de *C. pubescens*. A) Sin almidón (planta 4). B) Mayormente sin almidón (planta 2). C) Mayormente con almidón (planta 5). Escala: 20 μ m.

a. Viabilidad y longevidad del polen

El análisis del polen mediante la coloración con Rojo Neutro evidenció altos porcentajes de polen no abortado, siendo $92.87\% \pm 3.04$ el promedio entre los individuos (Fig. 5). Si bien se observó que uno de los individuos (planta 1) se diferencia del resto, todos los individuos presentan porcentajes de polen no abortado superiores al 80% (Fig. 5).

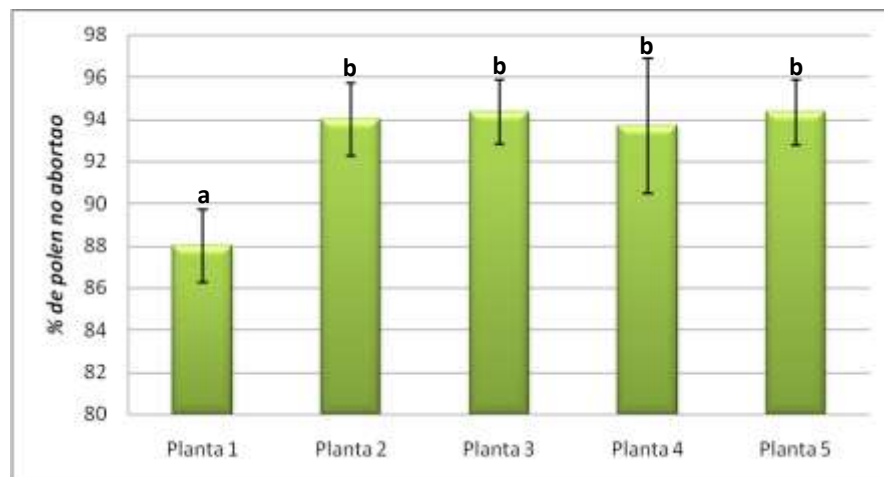


Fig. 5. Porcentaje de polen no abortado por individuo en *C. pubescens*. Letras diferentes representan diferencias significativas, $P < 0.05$.

En todos los individuos el polen es fértil, con alto porcentaje de viabilidad (Fig. 6). En el segundo día de la antesis, cuando el polen queda completamente expuesto para su dispersión, mediante la reacción vital con MTT se observó entre todos los individuos un promedio del $85.09\% \pm 5.95$ de viabilidad, encontrándose diferencias significativas entre algunos (Fig. 6). Mientras la flor está abierta, la viabilidad del polen se mantiene en valores altos.

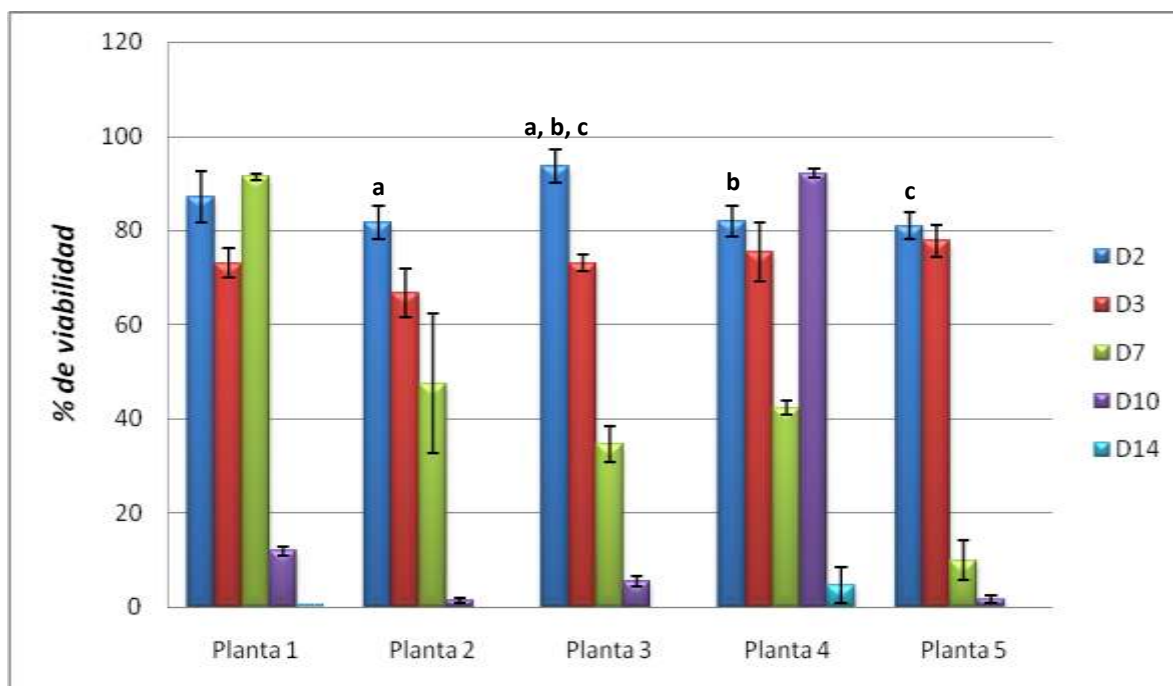


Fig. 6. Longevidad del polen según porcentajes de viabilidad (reacción con MTT) por individuo en *C. pubescens*. D) días de la antesis. Pares de individuos con la misma letra presentan diferencias significativas en D2, $P (<0.05)$.

El test de viabilidad con MTT a lo largo de los días mostró que la vitalidad del polen decae en el tiempo, a diferentes ritmos entre individuos (Fig. 6). La viabilidad del polen alcanza valores cercanos o menores al 5% aproximadamente 10 días post-antesis, excepto en un individuo (planta 4), en el que esta caída se produce alrededor del día 14 post-antesis (Fig. 6). En las plantas 1 y 4 se observaron llamativos aumentos en la viabilidad del polen en un momento particular post-antesis (días 7 y 10, respectivamente), para luego caer drásticamente.

b. Germinabilidad del polen *in vitro*

Entre los individuos estudiados se observó un porcentaje de germinación promedio del $46.28\% \pm 6.86$. Todas presentaron un poder germinativo superior al 40%, observándose diferencias significativas entre las plantas 1 y 3 (Fig. 7).

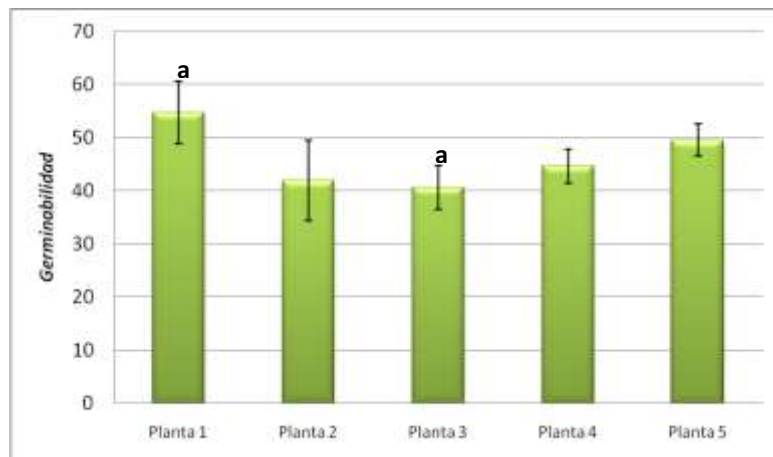


Fig. 7. Porcentaje de polen germinado por individuo en *C. pubescens*. Pares de individuos con la misma letra presentan diferencias significativas, $P (<0.05)$.

c. Capacidad germinativa del polen en el estigma y receptividad estigmática:

La observación de estilos polinizados con luz fluorescente para detectar la presencia de tubos polínicos permitió determinar que el estigma es receptivo en todos los individuos en el primer día de la antesis, y que el polen tiene la capacidad de germinar en el mismo (Fig. 8). La totalidad de los pistilos analizados presentaron polen germinado sobre el estigma y tubos polínicos desarrollados en el estilo.

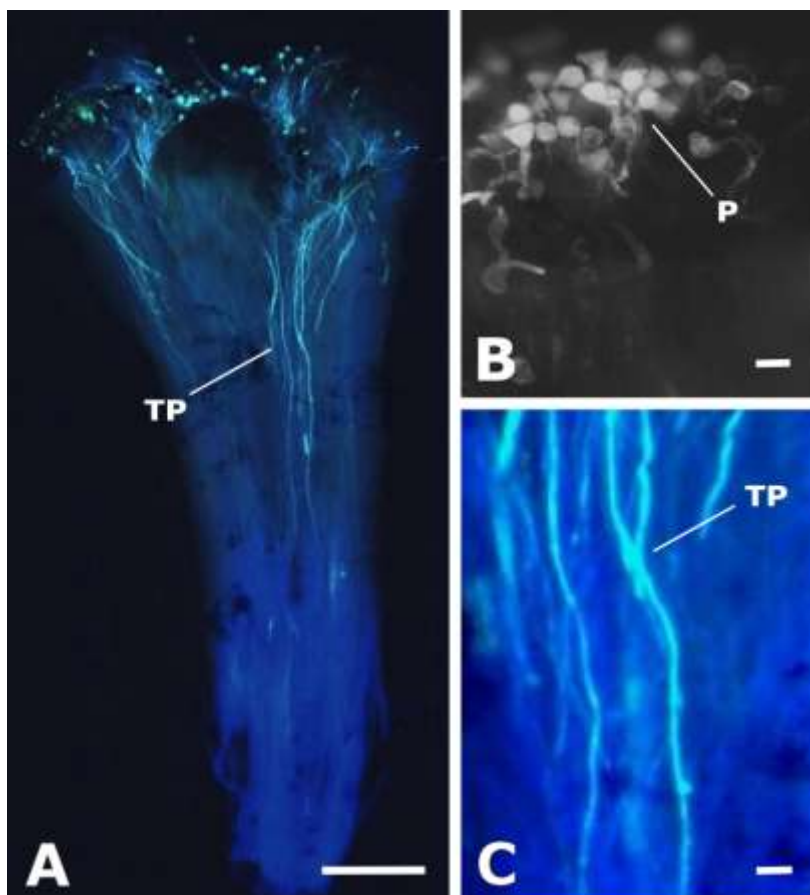


Fig. 8. Germinación del polen y crecimiento de los tubos polínicos en *C. pubescens*. A) Vista general del crecimiento de tubos polínicos (semi *in vivo*). B) detalle de estigma con granos de polen germinados. C) Detalle de tubos polínicos. P: Granos de polen, TP: Tubos polínicos. Escalas: 100 μm

III.2. Nivel de autoincompatibilidad

Ninguno de los individuos estudiados resultó autocompatible, registrándose diferentes niveles de autoincompatibilidad entre ellos, como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Índices de autoincompatibilidad en *C. pubescens* (índice según Dafni 1992).

Individuos	Porcentaje de frutos formados		ISI / Nivel de autoincompatibilidad	
	Auto-polinizaciones	Polinización cruzada		
1	4,54	16,67	0,273	<i>Parcialmente autoincompatible</i>
2	2,50	47,62	0,052	<i>Mayormente autoincompatible</i>
3	0	62,50	0	<i>Completamente autoincompatible</i>
4	0	10,00	0	<i>Completamente autoincompatible</i>
5	10,00	13,63	0,733	<i>Parcialmente autoincompatible</i>

El porcentaje de frutos formados por autopolinización fue $\leq 10\%$ o nulo (Tabla 1). El porcentaje de frutos formados luego de polinizaciones cruzadas fue dispar entre todos los individuos, variando entre el 10% hasta el 60% (Tabla 1). No se observó correlación entre estos valores y el nivel de autoincompatibilidad ($r = -0.47$, con un nivel de significancia del 95%).

El aborto de los tubos polínicos en pistilos autopolinizados ocurrió en todos los tercios del estilo, con frecuencias variables entre los individuos y sin tendencia definida. (Fig. 9).

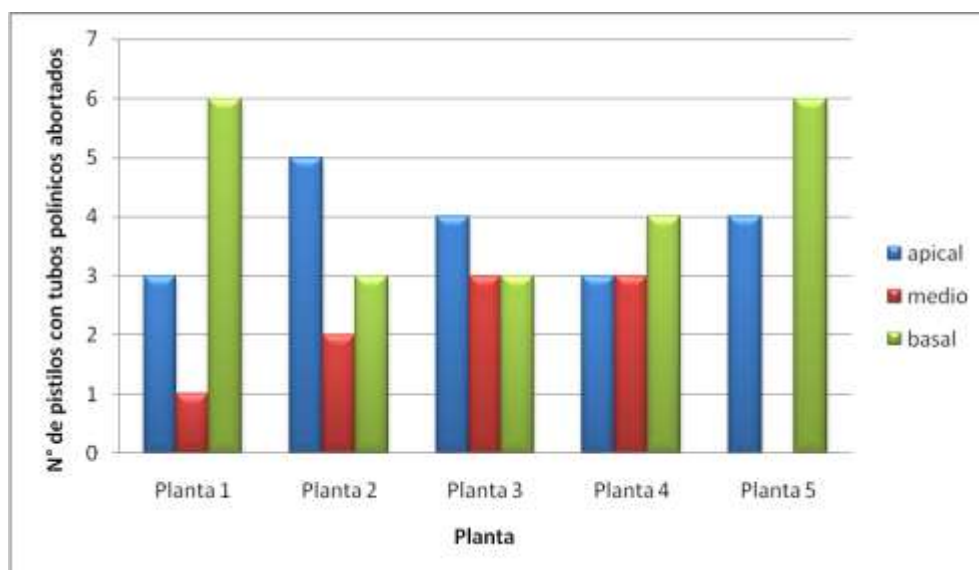


Fig. 9. Sector alcanzado por los tubos polínicos abortados en el estilo (dividido en tercios) en autopolinizaciones en *C. pubescens*.

III.3.Histoquímica de la fase progámica

Estigma

Capsicum pubescens presenta un estigma húmedo, cubierto de exudado estigmático desde estadios pre-antesis (Fig. 10). El estigma es unilobado, presentando en general irregularidades en su superficie, pero sin llegar a formar lóbulos definidos. (Fig. 10 A).

El estigma está formado por células epidérmicas papilosas (Fig. 10 B-E), de naturaleza secretora (Fig. 11 A). En individuos no polinizados, en el estadio D-1 las células epidérmicas poseen un citoplasma denso (Fig. 11 A) en contraste con estadios más avanzados, donde son más vacuoladas, pero siempre conservando características de un tejido secretor. En el estadio más avanzado estudiado (D1+72 hs) se observó que las células estigmáticas muestran signos de degeneración, apreciándose algo deformadas, contraídas, dando al estigma un aspecto rugoso (Fig. 10 F, G). No se encontraron diferencias en la estructura estigmática entre individuos polinizados y no polinizados a lo largo de los estadios analizados.

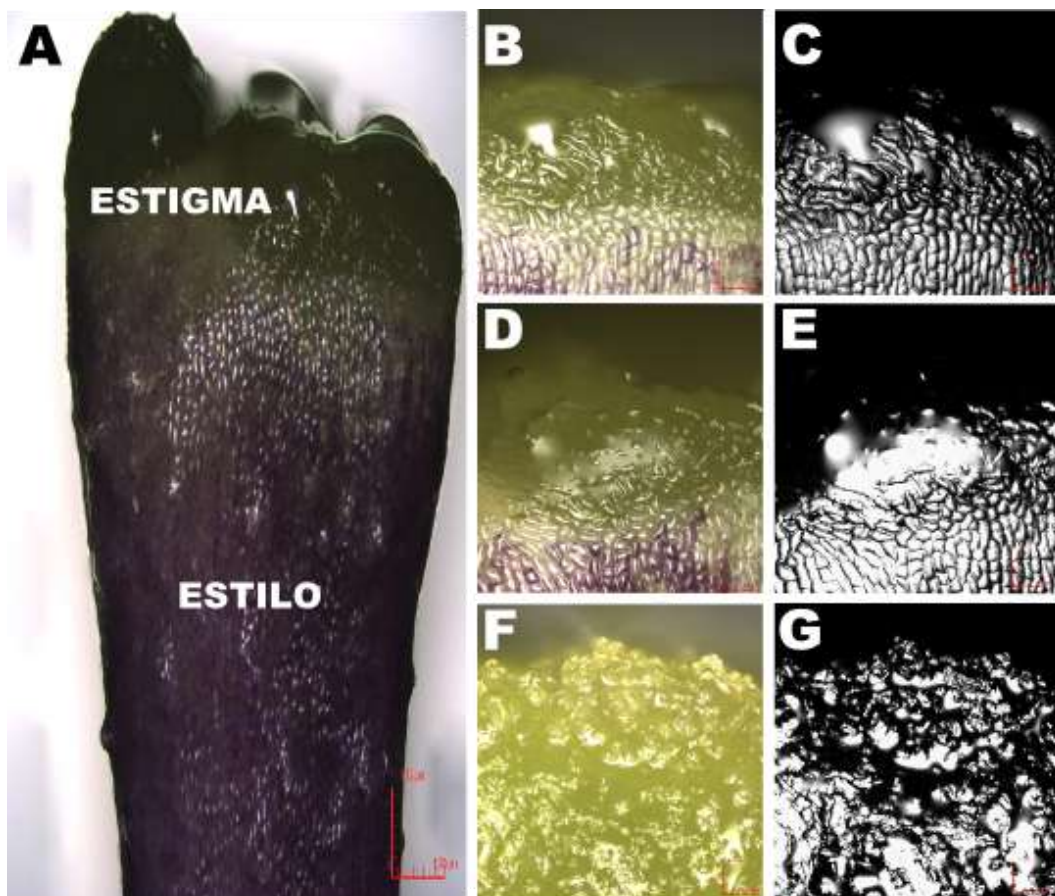


Fig. 10. Detalle del estigma en *C. pubescens*. A) Vista general de estigma, cubierto de exudado, y del ápice estilar. B-C) Pre-antesis (D-1). D-E) Estadio D1 sin polinizar. F-G) Estadio D1+24 hs polinizado.

Obsérvese en B-E la presencia de cantidades variables de exudado estigmático.

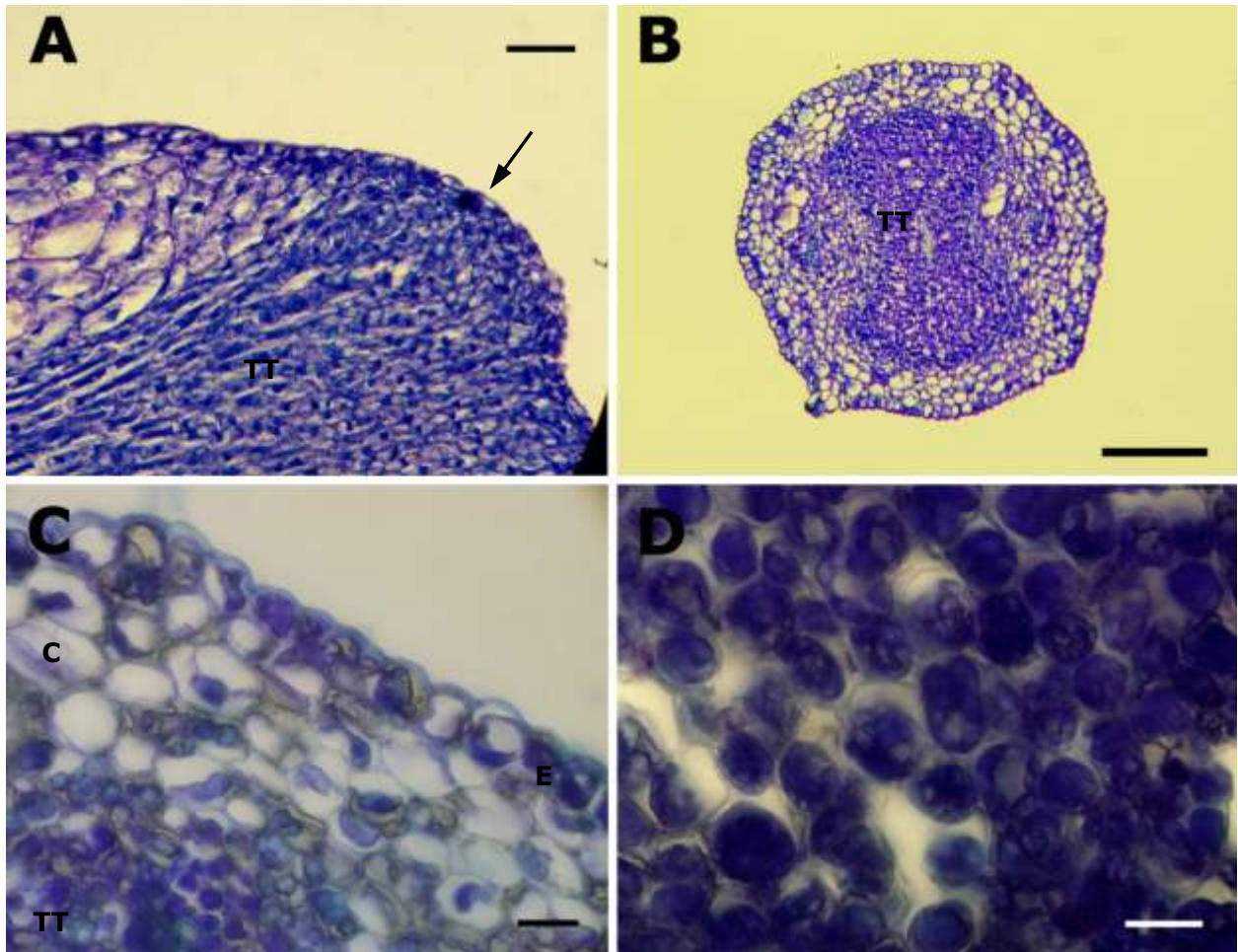


Fig. 11. Histología de estigma y estilo en *C. pubescens*. A) Detalle del estigma sin polinizar (flecha), en sección longitudinal, en el estadio D-1. B-D) Estilo autopolinizado (estadio D1+24 hs) en transcorte. B) Vista general. C) Detalle de epidermis, corteza y parte del tejido de transmisión. D) Detalle del tejido de transmisión; obsérvense las características secretoras de las células. E: epidermis; TT: tejido de transmisión, C: corteza. Escalas: A- 80 μ m, B- 90 μ m, C- 50 μ m, D- 25 μ m.

Por debajo de la epidermis receptiva se encuentra el tejido de transmisión (Fig. 11 A; ver detalles en Estilo).

Estilo

En un transcorte por el estilo se encuentra un estrato epidérmico, por debajo tres a varios estratos de tejido parenquimático (el número de estratos va aumentando hacia la base del estilo) que constituye la llamada corteza estilar o cortex (donde se encuentran los hacecillos vasculares), y en el centro se encuentra el tejido de transmisión (Fig. 11 B, C).

La epidermis posee una cutícula estriada (Fig. 12 B), que tiende a engrosarse y a perder el estriado hacia estadios más avanzados (Fig. 12 C-E). Las paredes periclinales externas de las células epidérmicas son más gruesas que las restantes y también tienden a engrosarse con el tiempo (Figs. 11 C, 13). Estas características se repiten en ambos tratamientos de polinización.

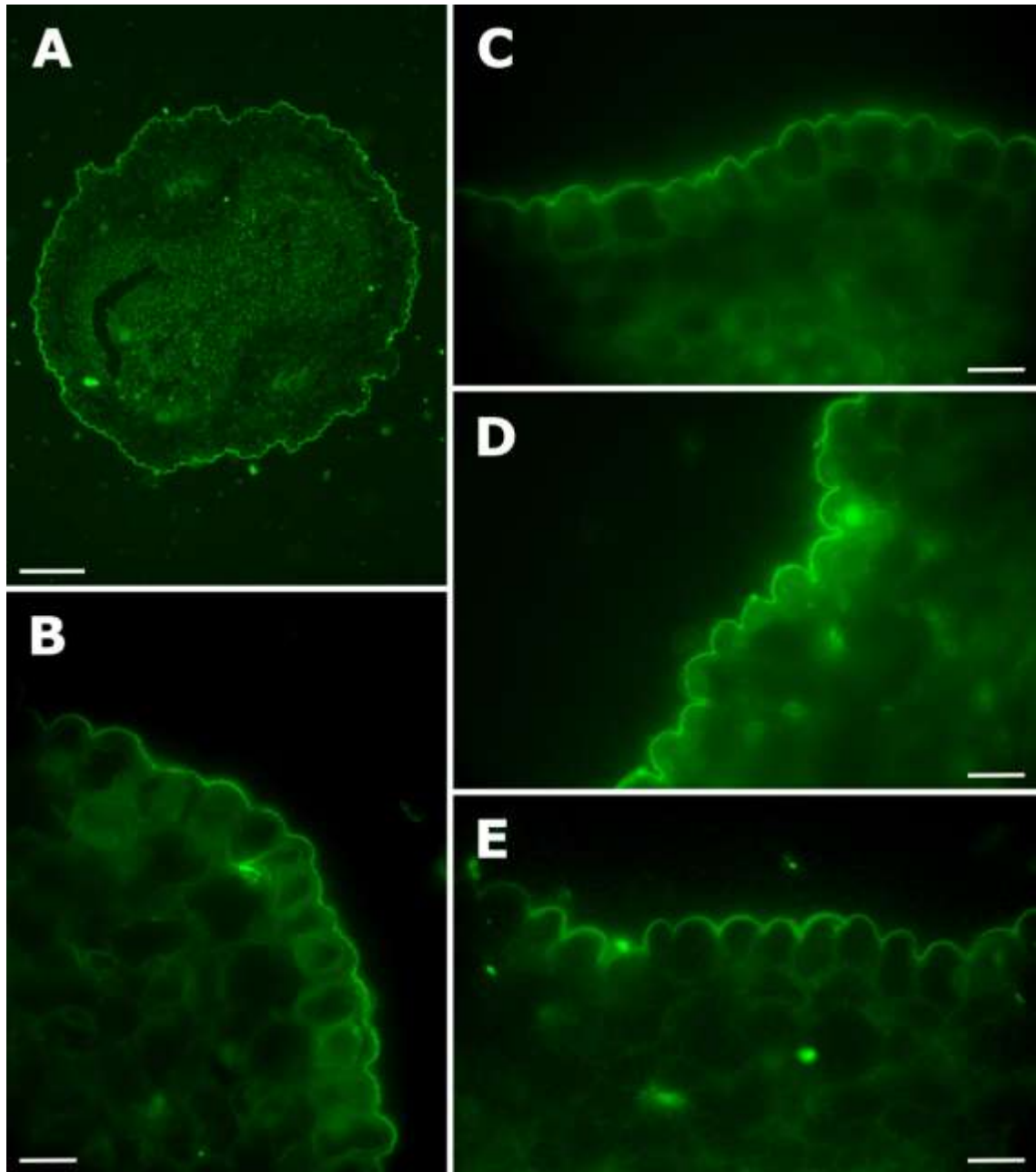


Fig. 12. Cutícula en la epidermis estilar en *C. pubescens*. A) Vista general del estilo en sección transversal. B-E) Detalle de la epidermis en el estilo sin polinizar en los estadios D-1 (B) y D1 (C) y en estilos polinizados en el estadio D1+72 hs (D- estilo autopolinizado, E- estilo de polinización cruzada). La cutícula fluoresce en color verde; obsérvese el ligero aumento de su espesor en estadios más avanzados. Tinción con Auramina O. Escalas: A- 100 μ m, B-E- 50 μ m.

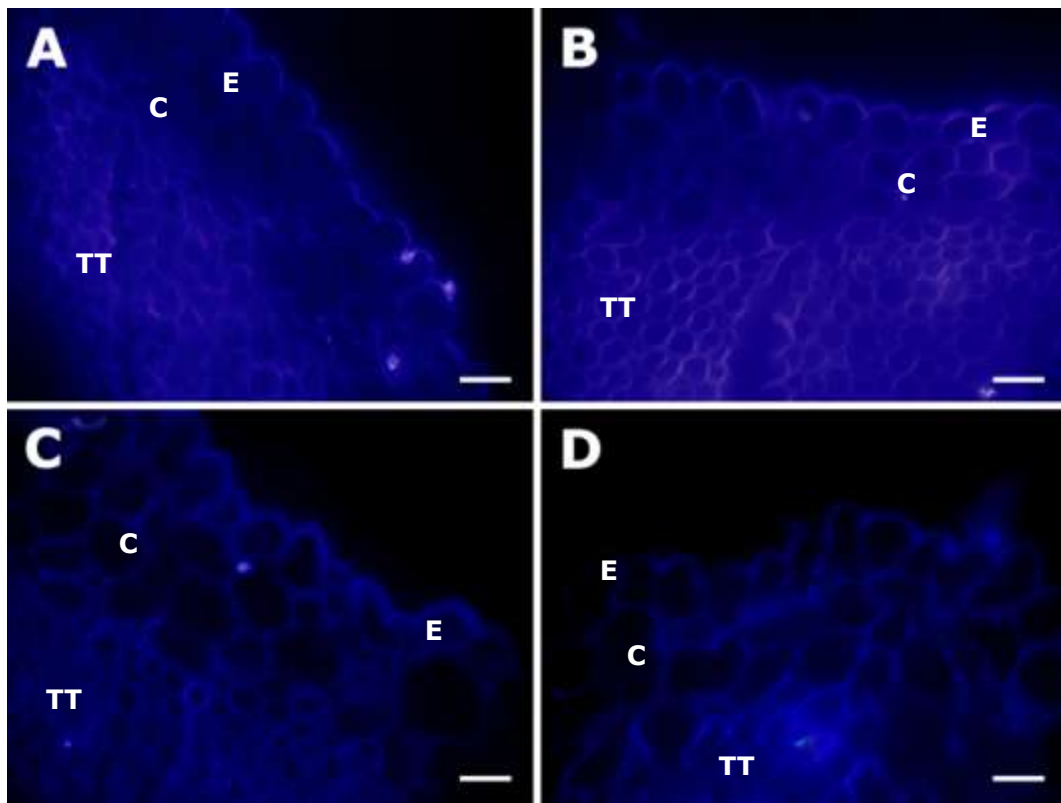


Fig. 13. Estructura del estilo en sección transversal en *C. pubescens*. Detalles de la epidermis, la corteza subyacente y parte del tejido de transmisión. A, B) Estilos sin polinizar en los estadios D-1 (A) y D1+72 hs (B). C, D) Estilos polinizados en el estadio D1+72 hs (C- estilo autopolinizado, D- estilo de polinización cruzada). Obsérvense las diferentes dimensiones de las células entre los tejidos y el ligero aumento de espesor de la pared periclinal externa de las células epidérmicas. Tinción con Calcofluor White (fluorescen las paredes celulósicas). E: epidermis, C: corteza, TT: tejido de transmisión. Escalas: 50 μ m.

En la epidermis se encontraron estomas, dispersos irregularmente y de diversos tipos, que se presentan elevados respecto a la superficie (Fig. 14).

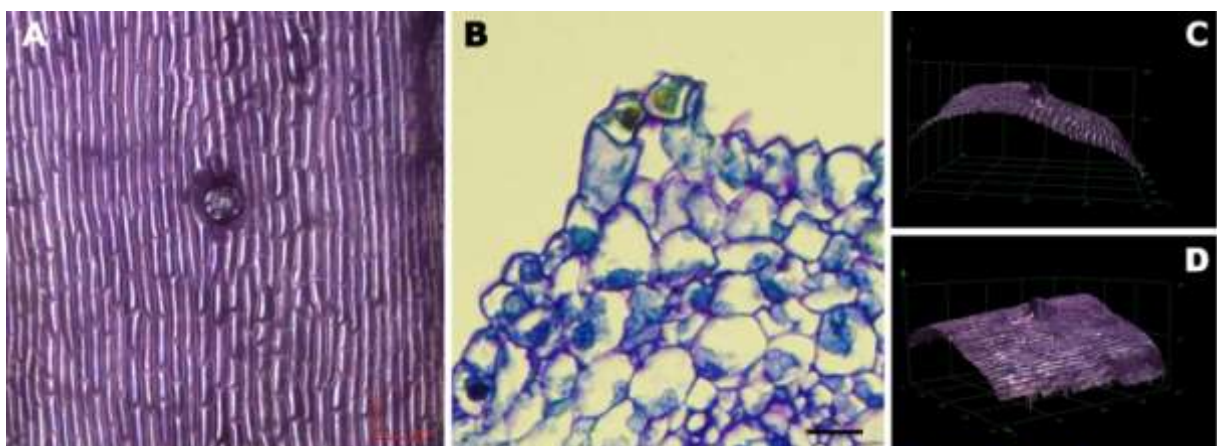


Fig. 14: Estomas en el estilo en *C. pubescens*. A) Estoma en vista superficial. B) Estoma en transcorte. C-D) Estoma en vista 3D; obsérvese su posición elevada respecto a la superficie. Escala: B- 50 μ m.

En cuanto a la corteza estilar, presenta siempre células vacuoladas, de diversos tamaños (Figs. 11 C, 13). El parénquima tiene aspecto compacto, sin apreciarse espacios intercelulares definidos. Es posible observar cristales en algunas células corticales, así como cantidades variables de granos de almidón (Fig. 15), particularmente en las células vecinas a los haces vasculares. En los estilos no polinizados generalmente la cantidad de almidón se mantiene estable a lo largo de los estadios (Fig. 15 A-D), encontrándose también en el tejido de transmisión en estadios más avanzados (D1+72 hs; Fig. 15 D). En los distintos tratamientos de polinización se observó, a diferencia de los individuos no polinizados, que la cantidad de almidón va disminuyendo a lo largo del tiempo (Fig. 15 E-H).

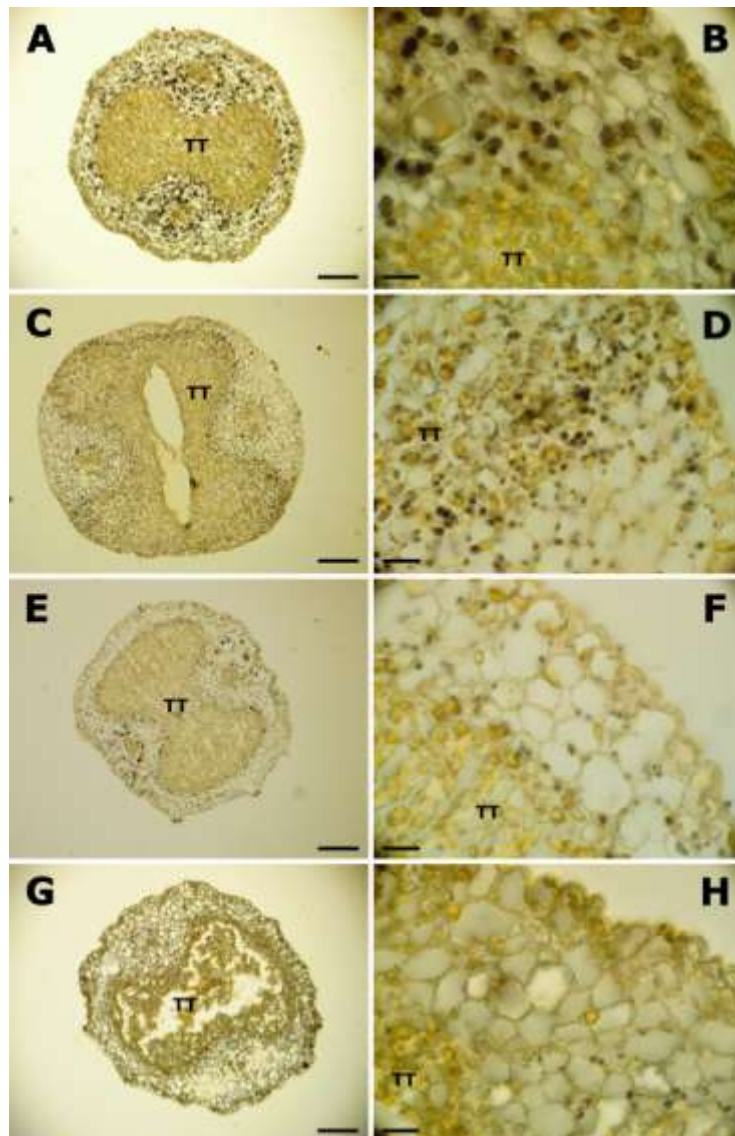


Fig. 15. Contenido de almidón en el estilo en *C. pubescens*. A-D) Estilos no polinizados en estadio D-1 (A, B) y D1+72 hs (C, D). E-G) Estilos polinizados en estadio D1+72 hs (E, F- autopolinización, G, H- polinización cruzada). A, C, E, G) Vista general del estilo en transcorte. B, D, F, H) Detalles de la sección del estilo. Obsérvese la disminución del contenido de almidón en los estadios avanzados en los estilos polinizados. Tinción con Lugol. TT: tejido de transmisión. Escalas: A, C, E, G- 100 μ m, B, D, F, H - 50 μ m.

En el tejido de transmisión se distinguen tres sectores, según su ubicación: estigmático, estilar y ovárico, presentando siempre las mismas características celulares. El mismo está formado por células pequeñas (generalmente de sección circular), poco vacuoladas, con grandes núcleos y citoplasma denso (Fig. 11 A, C, D). El tejido de transmisión no es compacto, encontrándose visibles espacios intercelulares ocupados por una densa matriz extracelular, presentes ya desde el estadio D-1 (Fig. 16). No se encontraron diferencias entre los tratamientos, ni entre los estadios estudiados, en la presencia y tamaño de estos espacios intercelulares (Fig. 16). No hubo reacción en la tinción con Auramina O en el tejido de transmisión (Fig. 12 A), por lo tanto no se encontrarían lípidos, al menos en una cantidad apreciable, en sus células o en la matriz extracelular.

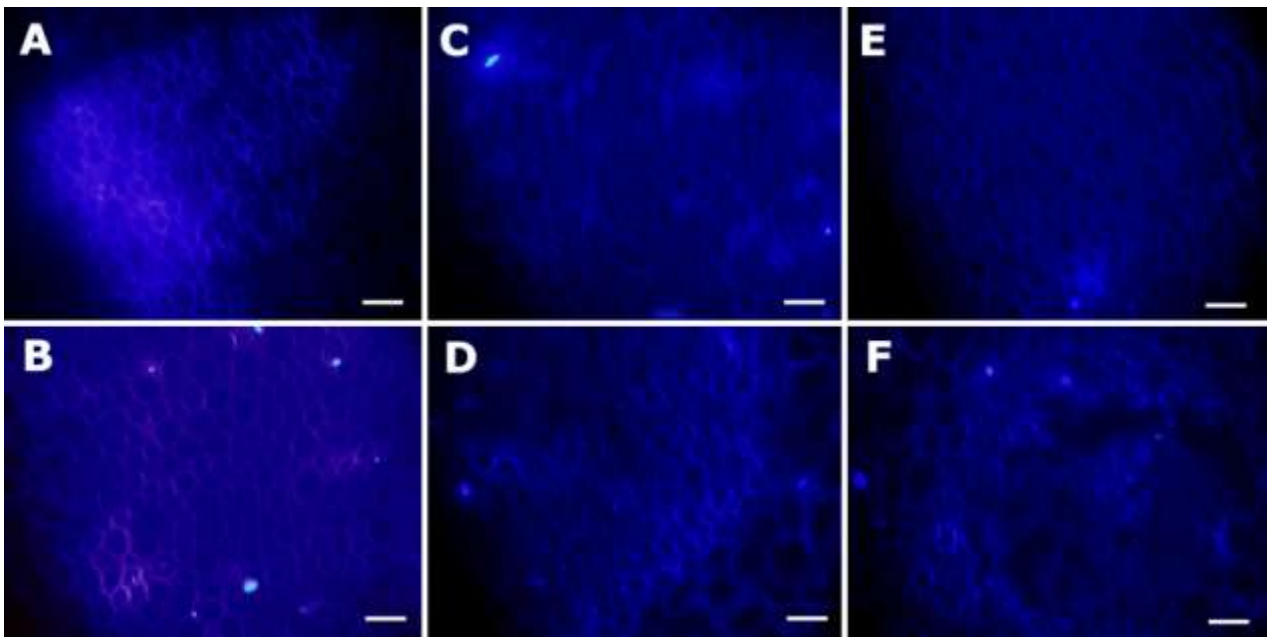


Fig. 16. Tejido de transmisión estilar en *C. pubescens*. A, B) Estilos no polinizados en estadios D-1 (A) y D1+72 hs (B). C-D) Estilos autopolinizados en estadios D1+6 hs (C) y D1+72 hs (D). E-F) Estilos de polinización cruzada en estadios D1+6 hs (E) y D1+72 hs (F). Obsérvese la presencia de espacios intercelulares ocupados por una matriz extracelular en todos los casos. Secciones transversales, tinción con Calcofluor White (fluorescen las paredes celulósicas). Escalas: 50 μ m.

En sección transversal se puede observar que el estilo es sólido, sin formar canales estilares definidos (Fig. 11 B, 15 A). Sin embargo, se observó que al avanzar los estadios este tejido se vuelve más frágil, pudiendo desgarrarse en la zona central del estilo (Figs. 15 C, G, 16 F).

IV. DISCUSION

Al momento de estudiar los factores que pueden afectar la formación de frutos en una especie, definir si los ciclos sexuales son fértiles resulta un análisis clave que no siempre es practicado. En este estudio de la biología reproductiva de *C. pubescens*, el análisis de la fertilidad fue el primer paso para poder interpretar luego las restantes observaciones realizadas.

Ambos ciclos sexuales fueron fértiles en todos los individuos estudiados. En cuanto a la función masculina, sólo un bajo porcentaje del polen (menor a 10%) ha abortado, lo que significa que el desarrollo del polen habría sido normal en todos los individuos. Asimismo, más del 80% del polen presenta el citoplasma activo, que para cada individuo representó una elevada proporción del polen no abortado. Además, también fue alto el porcentaje de granos de polen capaz de desarrollar tubos polínicos. Los niveles de germinabilidad del polen de *C. pubescens* son similares a los valores registrados en otras especies del género, por ejemplo en *C. frutescens* (Juntawong & Deepralad 1996) y *C. annuum* (Carrizo García 2010). Valores mayores fueron obtenidos por Reddy & Kakani (2007) para especies del complejo *C. annuum*, para *C. chacoense* y también *C. pubescens* (75%), pero utilizando un medio de cultivo sólido, en tanto que valores más bajos fueron obtenidos por Aloni et al. (2001) y Karni & Aloni (2002) para diferentes cultivares de *C. annuum* (20-30% aprox.).

La longevidad del polen superó en todos los casos el período de vida de la flor en *C. pubescens*, característica que podría favorecer la alogamia (Dafni & Firmage 2000).

El inicio de la polinización depende de la habilidad del grano de polen de adherirse a la superficie del estigma (Wheeler et al. 2001). Con respecto a la función femenina, el estigma de *C. pubescens* responde al tipo 'húmedo' (Heslop-Harrison & Shivanna 1977), como sucede con otras especies estudiadas de Solanaceae (Zinkl & Preuss 2000; Carrizo García 2002), incluyendo a *C. eximium* Hunz. (Onus 2000), promoviendo así la adhesión del grano de polen.

El estigma papiloso de *C. pubescens* está cubierto de un exudado evidente desde el momento mismo de la apertura de la corola, e incluso se observó que ya se encuentra presente en estadios inmaduros. La receptividad estigmática hace referencia a la habilidad del estigma de sostener la germinación de los granos de polen viables (Weiguang 2006). El período de receptividad estigmática varía entre unas pocas horas y varios días después de la antesis, dependiendo de la especie (Heslop-Harrison 2000; Weiguang 2006). Estigmas polinizados en las primeras horas de la antesis lograron sostener el crecimiento de tubos polínicos en *C. pubescens*, por lo que se puede afirmar que el estigma es receptivo y fértil una vez que se ha liberado el exudado y la corola abre. Cabe destacar que el estigma es receptivo antes de que el polen se encuentre disponible en la misma flor, esto es antes de que las anteras comiencen a abrirse. Este desfasaje temporal podría evidenciar alguna estrategia para favorecer la alogamia

(dicogamia incompleta, protoginia; Endress 1994). Sin embargo, Quagliotti (1979) menciona como una característica general de *Capsicum* la falta de perfecta sincronización entre la maduración de gineceo y androceo, siendo el gineceo el primero en madurar, si bien no menciona el lapso de separación temporal. Al respecto, se deduce de lo reportado por otros autores que la separación temporal en otras especies de *Capsicum* sería inferior a la observada en *C. pubescens* (p.e. Aleemullah et al. 2000; Oliveira Cruz & de Oliveira Campos 2007).

La presencia de esterilidad espontánea, tanto masculina como femenina, no es un fenómeno frecuente en *Capsicum*, por lo tanto *C. pubescens* se ajusta a los antecedentes del género.

Siendo ambos ciclos sexuales fértiles, la falta de formación de frutos por autopolinización podría deberse a la existencia de autoincompatibilidad. Como se mencionara anteriormente, se han registrado líneas de *C. pubescens* que presentan diferentes niveles de autoincompatibilidad, por lo tanto los genotipos de origen argentino analizados en esta oportunidad se encontrarían dentro del rango de variabilidad encontrada. Sin embargo, al menos en el conjunto de individuos analizados, no se detectó ninguno completamente autocompatible (esto incluye otros 3 individuos analizados pero no incorporados a este estudio, obs. pers.).

En los casos de autoincompatibilidad registrados previamente en *C. pubescens*, así como en *C. cardenasii* (la única especie del género con autoincompatibilidad completa probada hasta la fecha; Yacub & Smith 1971), se sugirió que se trataría del tipo de autoincompatibilidad gametofítica, principalmente según el comportamiento de los tubos polínicos en el estilo. La misma conclusión puede extraerse de acuerdo al comportamiento de los tubos polínicos en los casos de autopolinización que no concluyeron en la formación de frutos en los individuos analizados en esta oportunidad. Además, se ha sugerido que el número de núcleos del polen se relaciona con el tipo de reacción de autoincompatibilidad, cuando se manifiesta este fenómeno (Dafni et al. 2005). En el caso de *C. pubescens*, la presencia de polen binucleado se condice con la presencia de autoincompatibilidad de tipo gametofítica. No obstante, debe destacarse que se encontró una gran variación en el sector del estilo donde se produciría el aborto de los tubos polínicos, característica que también fue observada por Saborío & Da Costa (1992) en la especie. Esta particularidad podría indicar que la reacción de autoincompatibilidad podría ocurrir en diferentes momentos post-polinización. No obstante, Saborío & Da Costa (1992) sugieren que los diferentes sitios de inhibición podrían también relacionarse con las reservas del polen y el vigor de los tubos polínicos. Al respecto, si bien no fueron cuantificadas las reservas del polen, existen diferencias en su contenido de almidón entre los individuos analizados en esta oportunidad, pero las mismas no se correlacionan con la frecuencia de tubos polínicos que alcanzaron los diferentes tercios del estilo. Restaría

analizar el vigor de los tubos polínicos, su relación con el tipo y cantidad de reservas, y el genotipo de la planta en cuestión, para testear completamente la hipótesis de Saborío & Da Costa (1992).

En cuanto a la producción de frutos obtenidos por polinización cruzada, el porcentaje en la especie fue muy variable, tal como reportaron Saborío & Da Costa (1992). La producción de frutos en otros cultivares del género alcanza variados niveles, registrándose algunos con solo ca. 10% de fructificación (Quagliotti 1979), otros con porcentajes de fructificación cercanos al 80% (Aleemullah et al. 2000; Oliveira Cruz et al. 2005; Oliveira Cruz & de Oliveira Campos 2007), así como otros casos en los que también es posible encontrar el mismo rango de variación registrado en *C. pubescens* dentro de un único cultivar (Wubs et al. 2009).

A nivel histológico, los cambios más importantes en el estigma y el estilo desde estadios inmaduros hasta su senescencia o durante la fase progámica, se refieren a tres aspectos: 1. las características de la epidermis estigmática y la secreción de exudado, 2. la formación de espacios intercelulares en el tejido de transmisión y la secreción de matriz extracelular que los ocupan, y 3. la movilización de reservas de almidón en el estilo. Si bien en esta ocasión no se alcanzó el mismo nivel de detalle respecto a otros estudios realizados en Solanaceae con microscopía electrónica de transmisión (p.e. Cresti et al. 1976; Herrero & Dickinson 1979; Kandasamy & Kristen 1990; Hudák et al. 1993; Onus 2000), se observaron las mismas características y tendencias de cambios en los tres aspectos mencionados. Tal es el caso de la disminución de las reservas de almidón en estilos polinizados, característica que estaría relacionada a este evento. Sobre este aspecto, la importancia de las reservas de almidón ha sido destacada en otras especies, ya que es una fuente de nutrientes para los tubos polínicos durante la fase progámica (Rodrigo & Herrero 1998; Rodrigo et al. 2000; Alcaraz et al. 2010). Sin embargo, a diferencia de lo que se ha observado en otras especies (p.e. olivo; Suarez et al. 2012), en *C. pubescens* solo se encuentra almidón en forma predominante en las células parenquimáticas de la corteza estilar, en tanto que aparece en el tejido de transmisión solo en ausencia de polinización.

En cuanto a los espacios intercelulares formados en el tejido de transmisión, en *C. pubescens* no manifestaron cambios a lo largo de los estadios ni diferencias entre tratamientos, denotando que sus características son independientes de la polinización. Cabe destacar que en *C. pubescens* se observó que la secreción de exudado estigmático y la formación de espacios intercelulares en el tejido de transmisión son fenómenos tempranos, que se pueden observar desde estadios inmaduros, a diferencia de lo registrado en *C. eximium* (Onus 2000). Estas características podrían evidenciar que estigma y estilo podrían ser receptivos aún dentro de los botones florales. Al respecto, en *C. annuum* se registró que el estigma es receptivo desde cinco días antes a la antesis y que la flor es capaz de producir frutos desde entonces (Aleemullah et al. 2000). La polinización de pimpollos es una técnica utilizada para superar la

autoincompatibilidad (Singh & Chauhan 2003; Cabin et al. 2011) y fue probada sin éxito en *C. pubescens* por Saborío & Da Costa (1992). Dado que los genotipos argentinos no han sido aún testeados, se podría ampliar el estudio realizado para determinar la extensión total del período en que el estigma es capaz de sostener el crecimiento de tubos polínicos, y así evaluar si es posible favorecer la autofecundación en algún momento.

V. CONCLUSIONES

Todos los individuos analizados de *C. pubescens*, representantes del germoplasma de la especie cultivado en Argentina, fueron fértiles. No obstante, la formación de frutos por autopolinización fue baja o nula. Se observó cierto grado de asincronía temporal entre las funciones sexuales que podría favorecer la alogamia. Tratamientos de polinización revelaron que existen diferentes niveles de autoincompatibilidad entre individuos y que ningún genotipo resultó autocompatible, es decir que efectivamente se favorece el cruzamiento. Se puede afirmar que la autoincompatibilidad no sería una propiedad de individuos aislados en la especie. Las características del polen y de la fase progámica indicarían que se trata de otro caso de autoincompatibilidad gametofítica en Solanaceae.

A nivel práctico, al menos entre los genotipos cultivados en el NOA, sería recomendable favorecer la coexistencia de individuos genéticamente diferentes y la presencia de polinizadores, de manera de facilitar las polinizaciones cruzadas que permitan obtener una mayor producción de frutos.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Abdelgadir HA., Johnson SD, Van Staden J. 2012. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *S. Afr. J. Bot.* 79: 132-139.
- Alcaraz ML, Hormaza JI, Rodrigo J. 2010. Ovary starch reserves and pistil development in avocado (*Persea americana*). *Physiol. Plant.* 140: 395-404.
- Aleemullah M, Haigh AM, Holford P. 2000. Anthesis, anther dehiscence, pistil receptivity and fruit development in the Longum group of *Capsicum annum*. *Aust. J. Exp. Agr.* 40: 755-762.
- Barboza GE, Agra MF, Romero MV, Scaldaferrero MA, Moscone EA. 2011. The *Capsicum* species from the Caatinga (Brazil): *C. parvifolium* and its closest relatives. *Syst. Bot.* 36: 768-781.
- Bolat I, Pirlak L. 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Turk. J. Agric. For.* 23: 383-388.
- Bosland PW, Votava EJ. 2000. Peppers: vegetable and spice capsicums. CABI Publishing, Oxon.
- Bosland PW. 1996. Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. En: Janick J (ed.), Progress in new crops, pp. 479-487. ASHS Press, Arlington.
- Carrizo García C. 2002. Estudios morfológicos del androceo y el gineceo en Solanaceae. Derivaciones taxonómicas y filogenéticas. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Carrizo García C. 2010. Metabolization of carbohydrates and invertases activities during *in vitro* pollen tube growth in a chili pepper. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction, Bristol (Inglaterra).
- Carrizo García C. 2011. Fruit characteristics, seed production and pollen tube growth in the wild chilli pepper *Capsicum flexuosum*. *Flora* 206: 334-340.
- Clarke AE, Anderson MA, Baoc T, Harrias PM, Mau SL. 1985. Cell-cell recognition in plants with special reference to the pollen-stigma interactions. *J. Cell Sci.*, Supplement 2: 261-285.
- Coe FG, Anderson GL. 1996. Ethnobotany of the Garifuna of Eastern Nicaragua. *Econ. Bot.* 50: 71-107.
- Cresti M, van Went JL, Pacini E, Willemse MTM. 1976. Ultrastructure of transmitting tissue of *Lycopersicon peruvianum* style: development and histochemistry. *Planta* 132: 305-312.
- D'Ambrogio de Argüeso A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Editorial Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires.
- Dafni A. 1992. Pollination ecology. A practical approach. Oxford University Press, New York.
- Dafni, a., & Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1-4), 113–132.
- Dafni A, Pacini E, Nepi M. 2005. Pollen and stigma biology. En: Dafni A, Kevan P, Husband B (eds.), Practical Pollination Biology, pp. 83-146. Enviroquest Ltd., Ontario.
- de Nettancourt D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin.
- De Ruijter A, van den Eijnde J, van der Steen J. 1991. Pollination of sweet pepper (*Capsicum annum* L.) in greenhouses by honeybees. *Acta Hortic.* 288: 623-636.
- DeWitt D, Bosland PW. 2009. The complete chile pepper book. Timber Press, London.
- Ercan N, Onus AN. 2003. The effects of bumblebees (*Bombus terrestris* L.) on fruit quality and yield of pepper (*Capsicum annum* L.) grown in an unheated greenhouse. *Isr. J. Plant Sci.* 51: 275-283.
- Eshbaugh WH. 1979. Biosystematic and evolutionary study of the *Capsicum pubescens* complex. *Nat*

- Geogr. Soc. Res. Rep.* 1970: 143-162.
- Eshbaugh WH. 1993. Peppers: history and exploitation of a serendipitous new crop discovery. En: Janick J, Simon JE. (eds.). *New crops*, pp.132-139. Wiley, New York.
- Heiser CB, Smith PG. 1948. Observations on another species of cultivated pepper, *Capsicum pubescens* R. and P. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 52: 331-335.
- Heslop-Harrison Y. 2000. Control gates and micro-ecology: the pollen–stigma interaction in perspective. *Ann. Bot.* 85, Suppl. A: 5-13.
- Hudák J, Walles V, Venniherholz F. 1993. The transmitting tissue in *Brugmansia suaveolens* L.: ultrastructure of the stylar tissue. *Ann. Bot.* 71: 177-186.
- Kandasamy MK., Kristen U. 1990. Developmental aspects of ultrastructure and histochemistry of the stylar transmitting tissue of *Nicotiana glauca*. *Bot. Acta* 103: 384-391.
- Krishna A. 2003. *Capsicum*: The Genus *Capsicum*. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles Vol. 33. Taylor & Francis, London and New York.
- Kubišová S, Háslbachová H. 1991. Pollination of male-sterile green pepper line (*Capsicum annuum* L.) by honeybees. *Acta Hort.* 288: 364-370.
- Kumar Bhowmik P, Matsui T, Kawada K, Suzuki H. 2001. Seasonal changes of asparagus spears in relation to enzyme activities and carbohydrate content. *Sci. Hort.* 88: 1-9.
- Lundqvist A. 1964. The nature of the two-loci incompatibility system in grasses. IV. Interaction between the loci in relation to pseudo-compatibility in *Festuca pratensis* Huds. *Hereditas* 52: 221-234.
- Luo XD, Dai LF, Wang SB, Wolukau JN, Jahn M, Chen JF. 2006. Male gamete development and early tapetal degeneration in cytoplasmic male-sterile pepper investigated by meiotic, anatomical and ultrastructural analyses. *Pl. Breed.* 125: 395-399.
- Marcelis LFM, Baan Hofman-Eijer LR. 1997. Effect of seed number on competition and dominance among fruits in *Capsicum annuum* L. *Ann. Bot.* 79: 687-693.
- McClure BA, Franklin-Tong V. 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-245.
- Melendez G R. 1998. Estudio de los componentes químicos en tres variedades mexicanas de *Capsicum annuum* (guajillo, ancho y mulato). Tesis de Licenciatura (QFB). Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza.
- Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T. 2006. *GENERATIVE CELL SPECIFIC1* is essential for angiosperm fertilization. *Nat. Cell Biol.* 8: 64-71.
- Newbiggin E, Anderson MA, Clarke AE. 1993. Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *Pl. Cell* 5: 1315–1324.
- Oliveira Cruz D, Oliveira Campos LA. 2007. Biología floral e polinização de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L., Solanaceae): um estudo de caso. *Maringá* 29: 375-379.
- Oliveira Cruz D, Magalhães Freitas B, da Silva LA, Sarmento da Silva EM, Bomfim IGA. 2005. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 1197-1201.
- Onus AN, Pickersgill B. 2004. Unilateral incompatibility in *Capsicum* (Solanaceae): occurrence and taxonomic distribution. *Ann. Bot.* 94: 289-295.

- Onus AN. 2000. Structure of the stigma and style in *Capsicum eximium* and the effects of pollination. *Turk. J. Bot.* 24: 337-346.
- Pickersgill B. 1991. Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L. En: Tsuchiya T, Gupta PK (eds.). Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution, part B, pp. 139-160. Elsevier, Amsterdam.
- Quagliotti L. 1979. Floral ecology of *Capsicum* and *Solanum melongena*. *Linn Soc* 7: 399-419.
- Raw A. 2000. Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Ann. Bot.* 85: 487-492.
- Cabin RJ, Evans AS, Jennings DL, Marshall DL, Mitchell RJ, Sher AA. 2011. Using bud pollinations to avoid self-incompatibility: implications from studies of three mustards. *Canad. J. Bot.* 74: 285-289.
- Rodrigo J, Herrero M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex. Plant Reprod.* 11: 86-93.
- Rodrigo J, Hormaza JI, Herrero M. 2000. Ovary starch reserves and flower development in apricot (*Prunus armeniaca*). *Physiol. Plant.* 108: 35-41.
- Roldán Serrano A, Guerra-Sanz JM. 2006. Quality fruit improvement in sweet pepper culture by bumblebee pollination. *Sci. Hort.* 110: 160-166.
- Saborío M, Da Costa CP. 1992. Autoincompatibilidad en *Capsicum pubescens*. *Agron. Costarricense* 16: 279-286.
- Simon JE, Chadewick AF, Craker LE. 1984. Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, Hamden.
- Singh V, Chauhan SVS. 2003. Bud pollination and hybrid seed production in detergent-induced male sterile plants of *Brassica juncea*. *Pl. Breed.* 122: 421-425.
- Suárez C, Castro AJ, Rapoport HF, Rodríguez-García MI. 2012. Morphological, histological and ultrastructural changes in the olive pistil during flowering. *Sex. Plant Reprod.* 25:133-146.
- Webb MC, Williams EG. 1988. Effects of temperature, light, nutrients and carbon dioxide on the strength of the self- incompatibility response in detached flowers of *Lycopersicon peruvianum*. *Ann. Bot.* 61: 395-404.
- Wheeler M. 2001. The molecular genetic basis of pollen-pistil interactions. *New Phytol.* 128: 565-584.
- Wubs AM, Ma Y, Hemerik L, Heuvelink E. 2009. Fruit set and yield patterns in six *Capsicum* cultivars. *HortScience* 44: 1296-1301.
- Yaqub CM, Smith PG. 1971. Nature and inheritance of self-incompatibility in *Capsicum pubescens* and *C. cardenasii*. *Hilgardia* 40: 459-470.
- Weiguang Yi, Law SE, McCoy D, Wetzstein HY. 2006. Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). *Ann. Bot.* 97: 57-63.
- Zinkl GM, Preuss D. 2000. Dissecting *Arabidopsis* pollen-stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity. *Ann. Bot.* 85: 15-21.