

Caracterización de la autoincompatibilidad en material autóctono de cerezo

A.M. Cachi, A. Wunsch

Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Crta. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

Palabras clave: germoplasma, locus *S*, microscopia, tubos polínicos, autocompatibilidad, PCR.

Resumen

El cerezo presenta incompatibilidad polen-pistilo, por lo que es necesario el uso de árboles polinizadores para obtener cuajado de frutos. Así, en esta especie, la autoincompatibilidad resulta en un incremento de los costes y en una producción más errática y menos uniforme. Estos problemas pueden ser minimizados mediante el uso de variedades autocompatibles, por lo que la autocompatibilidad es un objetivo prioritario en la mejora del cerezo. En este trabajo, se ha iniciado la caracterización de la incompatibilidad polen-pistilo en accesiones locales de cerezo con el fin de identificar nuevas fuentes de autocompatibilidad. Para ello, se ha determinado el genotipo *S* mediante la amplificación por PCR y detección mediante electroforesis capilar de ambos genes del locus *S*, *S-RNasa* y *SFB*, de varias accesiones locales y se ha fenotipado la autoincompatibilidad en este material mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio. El trabajo ha permitido determinar el genotipo *S* de las variedades analizadas e identificar variedades locales autocompatibles no descritas previamente.

INTRODUCCIÓN

El cerezo (*Prunus avium* L.) es una especie autoincompatible (De Nettancourt, 1977). Este mecanismo está genéticamente controlado por un locus multi-alélico, *S*, que codifica dos genes, *S-RNasa* y *SFB* que determinan la especificidad alélica de la reacción de autoincompatibilidad (Tao e Iezzoni, 2010). En especies autoincompatibles como el cerezo, es necesario el uso de polinizadores compatibles para obtener un cuajado de frutos, lo que puede ocasionar problemas de producción y un aumento en los costes. Estos problemas pueden ser minimizados mediante el uso de variedades autocompatibles que permiten establecer plantaciones monovarietales. En cerezo, la mayor parte de las variedades autocompatibles cultivadas provienen de una única variedad, 'Stella'. El uso de un único progenitor autocompatible y un número muy limitado de parentales en la mejora de la especie, ha llevado a que la base genética del cerezo cultivado sea muy reducida (Dirlewanger et al., 2007). Por tanto la autocompatibilidad floral en cerezo es uno de los principales objetivos de la mejora del cultivo (Dirlewanger et al., 2007).

En estudios previos realizados en variedades locales de cerezo en España se ha observado que existe material vegetal genéticamente y morfológicamente bien diferenciado del material cultivado (Wunsch y Hormaza, 2004b; Pérez-Sánchez et al., 2008). Además en España se ha descrito y estudiado la autoincompatibilidad en material vegetal local, habiéndose identificado un cultivar autocompatible, 'Cristobalina', que proviene de Castellón (Herrero, 1964), en el cual se ha observado que la autocompatibilidad se debe a una mutación en la función del polen y que este carácter no

esta ligado al locus *S* (Wünsch y Hormaza, 2004a; Wünsch et al., 2010; Cachi y Wünsch, 2011).

Con el fin de identificar y caracterizar nuevas fuentes de autocompatibilidad que puedan ser incorporadas en programas de mejora de cerezo, en este trabajo se ha iniciado la caracterización de la autoincompatibilidad en accesiones locales de cerezo de las que existen indicios de autocompatibilidad (J. Orero; T. Martorell, M. Pons; comunicación personal). Para ello, se ha determinado su genotipo *S* mediante PCR y se ha fenotipado la autoincompatibilidad mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se han analizado siete variedades de cerezo locales (Tabla 1) de las cuales ‘Cristobalina’ fue incorporada como testigo autocompatible. El análisis del locus *S* fue realizado mediante PCR y detección mediante electroforesis capilar (Fig. 1) siguiendo el protocolo descrito por Cachi y Wünsch (2009). La separación de los fragmentos amplificados fue realizada con el analizador genético ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) y analizada con el estándar de tamaño 500-GeneScan LIZ (Applied Biosystems) y el software PeakScanner V1.0 (Applied Biosystems).

La autocompatibilidad de las variedades analizadas fue determinada mediante la autopolinización en el laboratorio de flores de cada uno de los individuos y la observación del crecimiento de los tubos polínicos mediante microscopía (Fig. 2) siguiendo el protocolo descrito por Hormaza y Herrero (1996). Los parámetros estudiados para cada variedad fueron el porcentaje de la longitud del estilo recorrido por el tubo polínico más largo, el porcentaje de pistilos con tubos polínicos en el ovario y el número de tubos polínicos en el ovario por flor (Cachi y Wünsch, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la incompatibilidad polen-pistilo de 6 variedades locales de cerezo mediante el análisis por PCR de ambos genes del locus *S*, *S-RNasa* y *SFB*, y mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos mediante microscopía.

‘Cristobalina’ es una variedad autocompatible con genotipo S_3S_6 , al igual que ‘Temprana de Sot’ (Wünsch y Hormaza, 2004a; Cachi y Wünsch, 2009). El análisis de PCR ha permitido determinar el genotipo *S* de las 7 variedades estudiadas, en las que se han identificado 4 alelos *S* diferentes (S_3 , S_6 , S_{16} , S_{22} , Tabla 1). Las variedades Cristobalina y Temprana de Sot pertenecen al grupo de incompatibilidad VI (Cachi y Wünsch, 2009) y en este trabajo el genotipo *S* de ambos cultivares ha sido confirmado mediante el análisis de los dos genes del locus *S*. Las 5 variedades locales restantes fueron asignados a 4 grupos de incompatibilidad (Tabla 1).

Para estudiar la autocompatibilidad de estas variedades se ha analizado el crecimiento de los tubos polínicos en el estilo después de la autopolinización. En ‘Cristobalina’, utilizada como testigo autocompatible, todas las flores presentaban tubos polínicos en el ovario, por lo que el tubo polínico más largo recorrió el 100% del estilo en todas las flores y el promedio de tubos polínicos en el ovario por flor fue de 3 (Tabla 1). Las observaciones del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio en el resto de variedades revelaron que ‘Son Llobet’, ‘Son Miró’, ‘Son Perot Manera’, ‘Talegal Ahim’ y ‘Temprana de Sot’ se comportaron como ‘Cristobalina’, lo que indica que también son autocompatibles (Tabla 1). En cambio, en ‘Talegal Almedijar’ la longitud del estilo

recorrida por el tubo polínico más largo fue del 70%, y no hubo flores con tubos polínicos en el ovario, por lo que esta variedad parece autoincompatible (Tabla 1).

El estudio de la autoincompatibilidad de las accesiones locales mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio reveló la existencia de 4 variedades autocompatibles ('Son Llobet', 'Son Miró', 'Son Perot Manera' y 'Talegal Ahim') no descritas previamente. Estas variedades provienen de las regiones de Castellón e Islas Baleares y debido a su proximidad geográfica y relación genética (todas comparten algún haplotipo *S*), es posible que el tipo de autocompatibilidad en estas variedades sea la misma. Además este tipo de autocompatibilidad es probable que sea también la misma que la descrita y caracterizada anteriormente en la variedad 'Cristobalina' (Herrero, 1964; Wünsch y Hormaza, 2004a) y que estas variedades constituyan una población de accesiones que comparten este carácter. Estudios moleculares y genéticos adicionales serán necesarios para confirmar el tipo de autocompatibilidad en este material.

Agradecimientos

Agradecemos a A. Martorell (Govern de les Illes Balears, Mallorca), J. Orero (Viveros Orero, Castellón) y M. Pons (Mallorca), por la recolección y/o cesión de material vegetal. Este trabajo ha sido financiado por los proyectos INIA, RF2008-00028-C02-01 y RTA2009-00144. A. M. Cachi ha sido financiada por una beca predoctoral del INIA (MICINN).

Referencias

- Cachi A.M. y Wünsch A. 2009. Identificación del genotipo *S* de variedades locales de cerezo. *Actas Hort.* 54:524.
- Cachi A.M. y Wünsch A. 2011. Characterization and mapping of non-*S* gametophytic self-compatibility in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Exp. Bot.* 62:1847-1856.
- De Nettancourt D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer Verlag, Berlin.
- Dirlewanger E., Claverie J., Wünsch A., Iezzoni A.F. 2007. Cherry. p.103-118. En: *Genome mapping and molecular breeding in plants* Vol. 4, Ed. Kole C, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Herrero J. (coord.) 1964. Cartografía de las variedades frutales de hueso y pepita. CSIC, Aula Dei, Zaragoza.
- Hormaza J.I. y Herrero M. 1996. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sex. Plant Reprod.* 9:153-160.
- Perez-Sanchez R., Gómez-Sanchez M.A., Morales Corts R. 2008. Agromorphological characterization of traditional Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.), sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and duke cherry (*Prunus × gondouinii* Rehd.) cultivars. *Spanish J. Agric. Res.* 6(1):42-55.
- Tao R. e Iezzoni A.F. 2010. The *S*-RNase-based gametophytic selfincompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Sci. Hortic.* 124:423-433.
- Wünsch A. y Hormaza J.I. 2004a. Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sex Plant Reprod.* 17:203-210.
- Wünsch A. y Hormaza J.I. 2004b. Molecular evaluation of genetic diversity and *S*-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genet. Resour. Crop Ev.* 51:635-641.

Wünsch A., Tao R., Hormaza J.I. 2010. Self-compatibility in ‘Cristobalina’ sweet cherry is not associated with duplications or modified transcription levels of *S*-locus genes. *Plant Cell Rep.* 29:715-721.

Tabla 1. Caracterización de la incompatibilidad polen-pistilo en variedades locales de cerezo mediante análisis del locus *S* y mediante el seguimiento del crecimiento de tubos polínicos mediante microscopía.

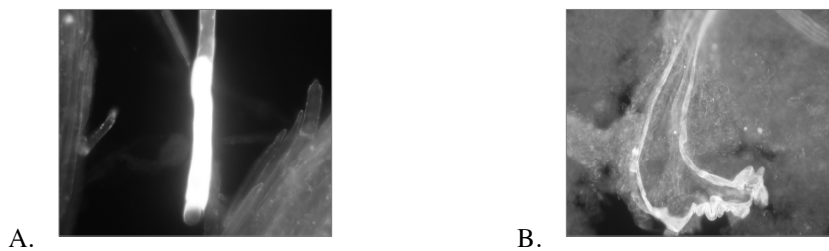
Variedad	Origen	Locus <i>S</i>		Microscopía			
		Genotipo <i>S</i>	GI	NF	PETP	PPTPO	NTPO/F
Cristobalina	Castellón	S_3S_6	VI	14	100	100	3
Temprana de Sot	Castellón	S_3S_6	VI	4	100	100	8
Son Llobet	Baleares	S_3S_6	VI	10	100	100	2
Talegal Ahim	Castellón	S_6S_{22}	XL	66	100	100	6
Talegal Almedijar	Castellón	S_3S_{22}	XXXVIII	35	70	0	0
Son Miró	Baleares	S_6S_{16}	XXXIX	15	100	100	3
Son Perot Manera	Baleares	S_6S_{16}	XXXIX	14	100	100	1

GI: Grupo de incompatibilidad; NF: Número de flores; PETP: Porcentaje de la longitud del estilo recorrida por el tubo polínico más largo; PPTPO: Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en el ovario; NTPO/F: Número de tubos polínicos en el ovario por flor.

A.



Fig. 1. Electroferograma de los alelos *SFB* de dos variedades de cerezo, ‘Son Llobet’ (S_3S_6 ; A) y ‘Talegal Ahim’ (S_6S_{22} ; B), amplificados mediante PCR.



A.

B.

Fig. 2. Observación del crecimiento de los tubos polínicos de cerezo en el microscopio. A. Tubo polínico detenido en el estilo. B. Tubos polínicos en el ovario.