

Evaluación de la autoincompatibilidad en nuevas variedades de albaricoquero mediante microscopía de fluorescencia

S. Herrera¹, J. Lora², J.I. Hormaza², M. Herrero³ & J. Rodrigo¹

¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Avda. Montañana, 930, 50059 Zaragoza, Spain, sherreral@aragon.es, jrodrigo@cita-aragon.es

² Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain, jlora@eelm.csic.es, ihormaza@eelm.csic.es

³ Pomology Department, Estación Experimental Aula Dei-CSIC, Av. Montañana, 1005, 50059 Zaragoza, Spain, mherrero@ead.csic.es

Resumen

Tradicionalmente, las necesidades de polinización no se han tenido en consideración en el cultivo del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) en Europa, ya que la mayoría de las variedades de origen europeo son autocompatibles y, salvo excepciones, no necesitan variedades polinizadoras. Sin embargo, la utilización como parentales en muchos programas de mejora de variedades autoincompatibles procedentes de Norteamérica y Asia ha provocado la introducción reciente de nuevas variedades cuyas necesidades de polinización son desconocidas. El mecanismo de incompatibilidad gametofítica presente en albaricoquero, al igual que en otras especies de las Rosáceas, determina si una variedad es autoincompatible mediante la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo, evitando así la fecundación. En este trabajo se ha evaluado el carácter de autoincompatibilidad en un grupo de nuevas variedades procedentes de distintos programas de mejora de albaricoquero mediante autopolinizaciones controladas en laboratorio y la posterior observación del crecimiento de los tubos polínicos mediante microscopía de fluorescencia. Se consideraron autocompatibles aquellas variedades en las que se observó al menos un tubo polínico en la base del estilo de la mayoría de los pistilos, y variedades autoincompatibles aquellas en las que los tubos polínicos se detuvieron a lo largo del estilo sin alcanzar el ovario. Los resultados se relacionan con los alelos *S* de incompatibilidad para determinar las necesidades de polinización de cada variedad y los alelos relacionados con el carácter de autocompatibilidad.

Palabras-clave: alelos *S* de incompatibilidad, ovario, polinización, *Prunus armeniaca*, tubos polínicos

Abstract

In the last years, an important renewal of plant material is taking place in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Most traditional European apricot cultivars has been considered self-compatible, however, the use of American and Asian self-incompatible cultivars as parental in some breeding programs has resulted in the introduction of new cultivars with unknown pollination requirements. In Rosaceae, the self(in)compatibility is determined by a Gametophytic Self-Incompatibility system (GSI) that acts through the inhibition of the pollen tube growth along the style, avoiding the fecundation. In this work, self(in)compatibility has been evaluated in a group of new and traditional cultivars by controlled self-pollinations in laboratory and the observation of pollen tube growth under

a fluorescence microscopy. Cultivars were considered as self-compatible when at least one pollen tube reached the base of the style and self-incompatible when the pollen tubes arrested in the style and did not reach the ovary. Results are related to the incompatibility *S*-alleles to determine the pollination requirements of each cultivar and the alleles related to self-compatibility.

Keywords: Incompatibility *S*-alleles, ovary, pollination, *Prunus armeniaca*, pollen tube

Introducción

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es un árbol frutal perteneciente a la familia Rosaceae. Se originó en Asia Central y se dispersó mundialmente hasta convertirse, dentro del género *Prunus*, en el tercer cultivo de importancia económica a nivel mundial. La distribución actual de las variedades de albaricoquero se puede clasificar en seis grupos ecogeográficos (Layne et al., 1996). La mayoría de las variedades originarias de los grupos Asia Central e Irano-Caucásico son autoincompatibles, sin embargo, gran parte de las variedades europeas han sido tradicionalmente consideradas como autocompatibles (Hormaza et al., 2007).

En Rosáceas la auto(in)compatibilidad está determinada genéticamente mediante un sistema gametofítico (GSI) que actúa mediante la inhibición del crecimiento del tubo polínico en el estilo. Este mecanismo está controlado por el locus multialélico *S*, que codifica dos genes que determinan el genotipo del pistilo y del polen. En el pistilo se expresa como una ribonucleasa, *S*-RNAsa, que determina la especificidad del estilo (Tao et al., 1997) mientras que el determinante del polen es una proteína con una caja-F, denominada SFB (Ushijima et al., 2003). Cuando el alelo *S* del grano de polen es el mismo que uno de los dos alelos expresados en el pistilo, el crecimiento del tubo polínico se detiene evitando la fecundación del ovulo.

En los últimos años se está produciendo una intensa renovación varietal. La utilización de variedades resistentes autoincompatibles procedentes de América como parentales en los programas de mejora con el objetivo de incorporar una fuente de resistencia al virus de la sharka (Hormaza et al., 2007; Zhebentyayeva et al., 2012) ha provocado la introducción de un gran número de variedades de albaricoquero con necesidades de polinización desconocidas. En este trabajo se ha estudiado la auto(in)compatibilidad de 50 variedades de albaricoquero mediante el análisis al microscopio del comportamiento de los tubos polínicos en pistilos de flores autopolinizadas.

Material y métodos

Se han utilizado flores de 50 variedades de albaricoquero de diferentes colecciones y fincas localizadas en Aragón (España). Se recogieron flores en estado de botón globoso de cada variedad, se emascularon y se colocaron en espuma de florista húmeda a temperatura ambiente (Rodrigo & Herrero, 1996). Entre 25-30 flores por variedad fueron polinizadas manualmente con su propio polen y con polen de una variedad compatible, Katy o Canino, que actuó como control. El polen se obtuvo de yemas en estado de botón globoso, de las que se separaron las anteras sin dehiscir de sus filamentos y se extendieron sobre papel a temperatura ambiente durante 24 horas hasta su dehiscencia. El polen se coló usando una malla de 0,26 mm de luz. Setenta y dos horas después de la polinización, entre 25 y 30 pistilos de cada cruce se fijaron en etanol: acético (3:1). Para preparar el material para su observación al microscopio, los pistilos se lavaron tres veces con agua destilada y se dejaron en sulfito sódico al 5% a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se autoclavaron durante 10 minutos a 1 kg/cm², y se prepararon mediante

aplastamiento (*squash*) y tinción con azul de anilina 0,1 % (v/v) en fosfato potásico 0,1 N para detectar la callosa (Linskens & Esser, 1957).

Resultados y discusión

Los resultados han permitido establecer la autoincompatibilidad o autocompatibilidad de 50 variedades de albaricoquero mediante la observación de tubos polínicos. Se consideraron autocompatibles 21 variedades (Tabla 1), ya que en la mayoría de los pistilos se observaron tubos creciendo a lo largo del estilo y al menos un tubo polínico alcanzó la base del estilo (Figura 1A y B). Los resultados obtenidos para ‘Canino’, ‘Corbato’, ‘Mirlo blanco’, ‘Mitger’, ‘Palsteyn’, ‘Paviot’, ‘Tadeo’ y ‘Tom Cot’ confirman su autocompatibilidad descrita en trabajos previos (Rodrigo & Herrero, 1996; Burgos et al., 1997; Egea et al., 2010; Muñoz-Sanz et al., 2017) mientras que 13 variedades se describieron como autocompatibles por primera vez en este trabajo. Por otro lado, en las flores de 29 variedades los tubos polínicos se detuvieron a lo largo del estilo sin alcanzar el ovario, por lo que se consideraron autoincompatibles (Tabla 1). Se confirma la autoincompatibilidad de ‘Aurora’, ‘Bergarouge’, ‘Goldrich’, ‘Goldstrike’, ‘Harcot’, ‘Hargrand’, ‘Moniqui’, ‘Orange Red’, ‘Robada’, ‘Stark Early Orange’, ‘Sun Glo’ y ‘Veecot’, descrita en trabajos anteriores (Egea & Burgos, 1996; Rodrigo & Herrero, 1996; Burgos et al., 1997; Milatovic et al., 2013a; Milatovic et al., 2013b), mientras que las otras 17 variedades son descritas por primera vez como autoincompatibles. En las variedades autoincompatibles es característico la formación de un tapón en el extremo terminal del tubo polínico debido a la acumulación de callosa cuando el crecimiento se detiene (Figura 1C). Como se esperaba, todas las flores procedentes de cruzamientos con Katy o Canino presentaron tubos polínicos en la base del estilo.

En 8 de las variedades autocompatibles analizadas en este trabajo se ha identificado el alelo *Sc* en trabajos previos [‘Canino’ (Alburquerque et al., 2002), ‘Mirlo blanco’ (Egea et al., 2010), ‘ASF0404’, ‘Corbato’, ‘Paviot’ y ‘Soledane’ (Lora et al., 2017), ‘Mitger’ y ‘Tadeo’ (Muñoz-Sanz et al., 2017)], que se ha relacionado con el carácter de autocompatibilidad en albaricoquero (Vilanova et al., 2006). Sin embargo, las variedades ‘Early Queen’, ‘Golden Sweet’, ‘Katy’, ‘Lorna’, ‘Palsteyn’ y ‘Westley’ se han comportado como autocompatibles y no presentan el alelo *Sc* (Zuriaga et al., 2013; Lora et al., 2017), por lo que se confirma que existen otros alelos *S* relacionados con el carácter de autocompatibilidad.

Más de la mitad de las variedades analizadas (58%) fueron autoincompatibles, un porcentaje muy alto en comparación con la situación de hace unos años en la que la mayoría de las variedades europeas eran autocompatibles (Mehlenbacher et al., 1991), incluyendo la mayoría de las variedades tradicionales (Burgos et al., 1997). Debido a la introducción de nuevas variedades autoincompatibles de diferentes programas de mejora, es necesario conocer las necesidades de polinización a la hora de diseñar nuevas fincas comerciales.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) - Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea (AGL2013-43732-R); Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) (RFP2015-00015-00, RTA2014-00085-00); Gobierno de Aragón – Fondo Social Europeo, Unión Europea (Grupo Consolidado A-43) y por Agroseguro S.A. Agradecemos a Reyes López la asistencia técnica.

Referencias

- Albuquerque, N., Egea, J., Pérez-Tornero, O. & Burgos, L. 2002. Genotyping apricot cultivars for self-(in)compatibility by means of RNases associated with *S* alleles. *Plant Breeding* 121(4):343–347. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.725292.x>
- Burgos, L., Egea, J., Guerriero, R., Viti, R., Monteleone, P. & Audergon, J.M. 1997. The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *J. Hortic. Sci.* 72:147–154.
- Egea, J. & Burgos, L. 1996. Detecting Cross-incompatibility of Three North American Apricot Cultivars and Establishing the First Incompatibility Group in Apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(6):1002–1005.
- Egea, J., Rubio, M., Campoy, J.A., Dicenta, F., Ortega, E., Nortes, M.D., Martínez-Gómez, P., Molina, A., Molina Jr., A. & Ruiz, D. 2010. “Mirlo Blanco”, “Mirlo anaranjado” and “Mirlo Rojo”: Three new very early-season apricots for the fresh market. *HortScience* 45(12):1893–1894.
- Hormaza, J., Yamane, H. & Rodrigo, J. 2007. “Apricot”. p. 171–185. In: C. Kole (ed.), *Genome mapping and molecular breeding in plants, Vol. 4, Fruit and nuts*. Springer, New York. Springer, Berlin.
- Layne, R.E.C., Bailey, C. & Hough, L.F. 1996. p.79-111. In J. Janick & J. Moore (eds.), *Fruit Breeding, Vol. 1, Tree and Tropical Fruits*. Wiley, New York..
- Linskens, H. & Esser, K. 1957. Über eine spezifische anfarbung der pollenschlauche im griffel und die zahl der kallosepfropfen nach selbstung und fremdung. *Naturwiss* 44:16.
- Lora, J., Hormaza, J.I., Herrero, M. & Rodrigo, J. 2017. Self-incompatibility and *S*-allele identification in new apricot cultivars. *Acta Hort.* In press.
- Mehlenbacher, S.A., Cociu, V. & Hough, F.L. 1991. Apricots (*Prunus*). *Acta Hort.* 290:65–110. doi:10.17660/ActaHortic.1991.290.3.
- Milatovic, D., Nikolic, D., Fotiric-Aksic, M. & Radovic, A. 2013a. Testing of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 12(6):103–113.
- Milatović, D., Nikolić, D. & Krška, B. 2013b. Testing of self-(in)compatibility in apricot cultivars from European breeding programmes. *Horticultural Science* 40(2):65–71.
- Muñoz-Sanz, J.V., Zuriaga, E., López, I., Badenes, M.L. & Romero, C. 2017. Self-(in)compatibility in apricot germplasm is controlled by two major loci, *S* and *M*. *BMC Plant Biology* 17(1):82. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1027-1>
- Rodrigo, J. & Herrero, M. 1996. Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot “Moniqui”. *J. Hortic. Sci.* 71:801–805.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T.M., Dandekar, A.M. & Sugiura, A. 1997. Identification of Stylar RNases Associated with Gametophytic Self-Incompatibility in Almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.* 38:304–311. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029167.
- Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Tao, R. & Hirano, H. 2003. Structural and Transcriptional Analysis of the Self-Incompatibility Locus of Almond: Identification of a Pollen-Expressed F-Box Gene with Haplotype-Specific Polymorphism. *THE PLANT CELL ONLINE* 15(3):771–781. doi:10.1105/tpc.009290.
- Vilanova, S., Badenes, M.L., Burgos, L., Martinez-Calvo, J., Llacer, G. & Romero, C. 2006. Self-Compatibility of Two Apricot Selections Is Associated with Two Pollen-Part Mutations of Different Nature. *Plant Physiology* 142(2):629–641. <https://doi.org/10.1104/pp.106.083865>

- Zhebentyayeva, T., Ledbetter, C., Burgos, L. & Llacer, G. 2012. Apricot. p. 415-458. In M. Badenes & D. Byrne (eds.), *Fruit Breeding, handbook of plant breeding* 8. Springer, New York.
- Zuriaga, E., Muñoz-Sanz, J.V., Molina, L., Gisbert, A.D., Badenes, M.L. & Romero, C. 2013. An S-Locus Independent Pollen Factor Confers Self-Compatibility in “Katy” Apricot. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053947>

Tablas y Figuras

Tabla 1 - Variedades autocompatibles y autoincompatibles de albaricoquero y porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo.

Variedades autocompatibles	Pistilos (%) ^a	Variedades autoincompatibles	Pistilos (%) ^a
ASF0404	91	ASF0401	0
Bergecot	95	ASF0402	0
Canino	100	Aurora	0
Charisma	100	Bergarouge	0
Corbato	98	CA-26 (Almater)	5
Early Queen	90	Durobar	0
Faralia	100	Flodea	0
Flopria	100	Gold Bar	0
Golden Sweet	95	Goldrich	3
Katy	100	Goldstrike	0
Lorna	100	Harcot	0
Mirlo blanco	100	Hargrand	14
Mitger	100	Henderson	15
Palsteyn	100	JNP	5
Paviot	50	Lilly Cot	2
Pricia	100	Magic Cot	0
Soledane	100	Maya Cot	0
Swired	100	Moniqui	6
Tadeo	97	Muñoz	0
Tom Cot	100	Orangered	0
Westley	89	Pandora	4
		Perle Cot	4
		Pinkcot	9
		Robada	0
		Stark E Orange	33
		Stella	23
		Sun Glo	2
		Veecot	3
		Wonder Cot	0

^a: Porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo. n=25-30.

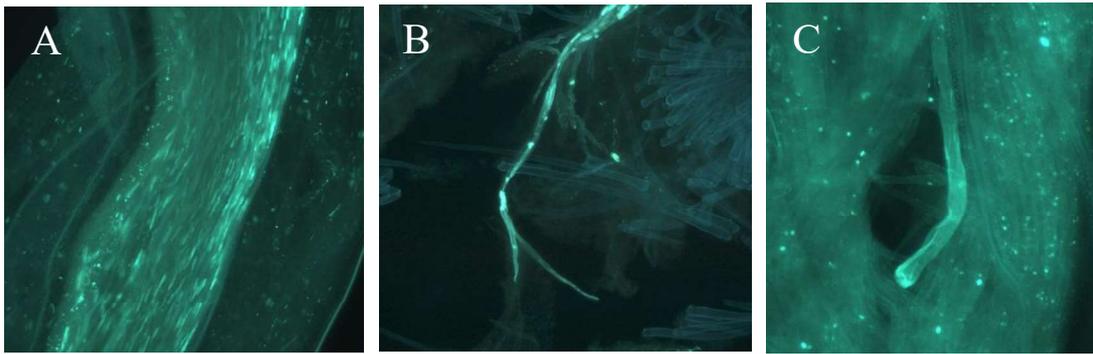


Figura 1 - (A) crecimiento de tubos polínicos en el estilo, (B) llegada de tubos polínicos al ovario, (C) parada de un tubo polínico en el estilo con formación de tapón de callosa.