

## EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA AUTO-COMPATIBILIDAD EN EL ALMENDRO

A. Fernández-Martí, J.M. Alonso, O. Kodad y R. Socias i Company

Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, (CITA), Avenida Montañana 930, 50059 Zaragoza

**Palabras clave:** *Prunus amygdalus*, auto-(in) compatibilidad, locus S.

### Resumen

El almendro presenta una auto-incompatibilidad (AI) gametofítica, controlada por el locus *S* que contiene los genes que definen la especificidad del polen y del pistilo. Sin embargo, su interacción no está totalmente determinada. El estudio durante tres años del crecimiento de los tubos polínicos de 90 individuos del cruzamiento 'Vivot' ( $S_{23} S_{f30}$ ) x 'Blanquerna' ( $S_f S_{f30}$ ) mostró un comportamiento inesperado de la auto-compatibilidad (AC) en la mayoría de los descendientes. Los zimogramas obtenidos de las RNAsas estilares así como los productos PCR han permitido determinar que el 100% de los individuos presentan un genotipo AC, pero la expresión del alelo  $S_f$  no ha sido siempre la misma, como muestra el fenotipo AI presente en muchas plantas con genotipo AC, por lo puede haber una expresión diferencial del alelo  $S_f$ .

### INTRODUCCIÓN

La mejora genética del almendro persigue la obtención de cultivares autógamos y de floración tardía para resolver los problemas de producción de esta especie predominantemente AI. El sistema de incompatibilidad del almendro es de tipo gametofítico, controlado por una serie de alelos en un solo locus, el locus *S*. Este locus está compuesto por dos genes, uno de actividad en el polen y otro en el pistilo. Las proteínas estilares *S* se han identificado como glicoproteínas con actividad ribonucleasa (*S*-RNasas), pero los cultivares AC, poseedoras del alelo  $S_f$  carecen de esta actividad (Bošković et al., 1997). Los genes del polen, llamados genes F-box, se han determinado recientemente, se han caracterizado y ligado al gen del pistilo, la *S*-RNasa.

Al observar el crecimiento del tubo polínico después de la auto-polinización en un grupo de descendientes del cruzamiento 'Vivot' ( $S_{23} S_{f30}$ ) x 'Blanquerna' ( $S_f S_{f30}$ ), se encontró un inesperado fenotipo incompatible en la mayoría de los individuos. Por ello, el objetivo de este estudio ha sido determinar las causas de este extraño comportamiento usando técnicas moleculares (NEpGHE y PCR).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se han estudiado 90 plantones de la familia 'Blanquerna' x. 'Vivot'. 'Blanquerna' (parental femenino) procede de una polinización libre de 'Genco' y 'Vivot' (parental masculino) es un cultivar tradicional de Mallorca. Durante tres años consecutivos se realizó la observación microscópica del crecimiento de los tubos polínicos según Socias i Company (1979). Se estudió el cuajado mediante el embolsamiento de ramas con un mínimo de 100 yemas florales para determinar la autogamia de los individuos y de los parentales, mediante el conteo de frutos 3 meses después de la floración. La actividad ribonucleasa se estudió mediante la técnica NEpHGE (Bošković et al., 1997). El DNA genómico de los individuos fue amplificado por PCR usando cebadores específicos ( $S_f F/S_f R$  y  $S_{23} F/S_{23} R$ ) y genéricos (PaConsIF/PaConsIIR y PaConsIF/EMPCRconsRD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento de los tubos polínicos confirmó la AI de 'Vivot', ya que se detenían en el segundo tercio del estilo, mientras que en 'Blanquerna' llegaban hasta la base del ovario. Sin embargo, sólo un 15% de los descendientes presentaron tubos polínicos en el ovario. Los embolsados confirmaron también la AI de 'Vivot', mientras que 'Blanquerna' fue altamente autógama.

Aunque la presencia del alelo  $S_f$  se ha relacionado siempre con la ausencia de actividad ribonucleasa (no presencia de banda) en las determinaciones NEpHGE, los zymogramas de todos los individuos mostraron dos bandas, con dos diferentes patrones, incluso en los que solamente una, o ninguna banda, debía aparecer. Los patrones de bandas eran idénticos en un 55% al obtenido en 'Blanquerna' y en un 45% al obtenido en 'Vivot'.

Los resultados obtenidos por PCR mostraron en 'Vivot' dos bandas diferentes, una el posible  $S_f$  y la otra  $S_{23}$ . En 'Blanquerna' sólo se identificó una banda, correspondiente a  $S_f$ . La presencia del alelo  $S_f$  fue confirmada en todos los 90 individuos, pero sólo en 45 fue posible identificar dos bandas, asumiendo que el resto eran homocigotos SC. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por NEpHGE.

Los alelos de 'Vivot' y 'Blanquerna' se han secuenciado parcialmente, pero de momento no es posible determinar si poseen el alelo  $S_f$  o el nuevo alelo  $S_{30}$  identificado por Bošković et al. (2007). Para ello se prosigue en la determinación de todos los haplotipos de nuestros individuos. El nuevo alelo  $S_{30}$  se ha citado como un nuevo alelo AI, amplificado igualmente con el cebador específico  $S_f$  y con actividad ribonucleasa, diferente del  $S_f$  de 'Tuono' en la sustitución de un amino ácido en la región C2. Sin embargo, aunque 'Vivot' tuviese el genotipo  $S_{30}S_{23}$  y 'Blanquerna'  $S_fS_{30}$ , siguiendo una distribución mendeliana, el 50% de los individuos deberían presentar un fenotipo AC, contrario al observado en el 15% de los descendientes. Por ello, es evidente la necesidad de seguir trabajando en este extraño comportamiento y estudiar más a fondo el mecanismo de incompatibilidad en el género *Prunus*.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto AGL2007-65853-C02-02 de la CICYT. A. Fernández-Martí agradece la beca concedida por el MEC y el Fondo Social Europeo (FSE) bajo los proyectos AGL 2004-06674-C02-01 y BES-2006-12621.

## REFERENCIAS

- Bošković, R., Tobutt, K.R., Batlle, I. y Duval, H. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.
- Bošković, R., Tobutt, K.R., Ortega, E., Sutherland, B.G. y Godini, A. 2007. Self-(in) compatibility of the almonds *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of 'wild-type  $S_f$ ' and new self-compatibility alleles encoding inactive S-RNases. *Mol. Genet. Genomics* 278: 265-676.
- Socias i Company, R. 1979 Aportación a las técnicas de observación de los tubos polínicos. Caso del almendro. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar., Ser. Prod. Veg.* 10: 233-236.