

Peculiaritats al·lèliques del locus *S* de les cultivars mallorquines d'ametller

R. SOCIAS I COMPANYY, O. KODAD, À. FERNÁNDEZ I MARTÍ & J. M. ALONSO

Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, av. Montañana, 930,
ES-50059 Saragossa, Espanya

Autor per a correspondència: R. Socias i Company (rsocias@cita-aragon.es)

Editor: A. Susanna

Rebut 4 abril 2013; acceptat 20 juny 2013

Abstract

ALLELIC PECULIARITIES OF THE *S* LOCUS OF THE ALMOND CULTIVARS FROM MAJORCA.— The examination of the allelic diversity of the locus *S* in ten almond cultivars from Majorca has shown the presence of the *S_f* allele in four of them, as well as the presence of five new alleles non identified so far. Although the *S_f* allele has been described as responsible for the expression of self-compatibility in almond, it has been recently shown that this allele has two different phenotypic expressions. As a consequence, this allele cannot be always considered an index for self-compatibility of the genotypes harbouring it. The study of the four Majorcan cultivars possessing this allele has confirmed their self-incompatibility, showing that this allele is in its phenotypically active form, as it has been also observed in a group of cultivars from southern Italy, a fact possibly suggesting a connexion between these two Mediterranean almond populations.

Key words: alleles; almond; *Prunus amygdalus*; *S* locus; self-compatibility.

Resumen

PECULIARIDADES ALÉLICAS DEL LOCUS *S* DE LOS CULTIVARES MALLORQUINES DE ALMENDRO.— El examen de la diversidad alélica del locus *S* en diez cultivares mallorquines de almendro ha mostrado la presencia del alelo *S_f* en cuatro de ellos, así como la presencia de cinco nuevos alelos no identificados hasta ahora. Aunque el alelo *S_f* se ha descrito como responsable de la expresión de la autocompatibilidad del almendro, recientemente se ha descubierto que tiene dos expresiones fenotípicas diferentes, por lo que no siempre se puede considerar un índice de la autocompatibilidad de los genotipos que lo presentan. El estudio de los cuatro cultivares mallorquines que presentan este alelo ha confirmado su autoincompatibilidad, de manera que este alelo se expresa en estos cultivares en su forma fenotípicamente activa, como también se ha comprobado en un grupo de cultivares del sur de Italia, lo que podría indicar una conexión entre estas dos poblaciones mediterráneas de almendro.

Palabras clave: alelos; almendro; autocompatibilidad; locus *S*; *Prunus amygdalus*.

Resum

PECULIARITATS AL·LÈLIQUES DEL LOCUS *S* DE LES CULTIVARS MALLORQUINES D'AMETLLER.— L'examen de la diversitat al·lèlica del locus *S* en deu cultivars mallorquines d'ametller ha mostrat la presència de l'al·lel *S_f* en quatre, així com la presència de cinc al·lèls nous fins ara no identificats. Encara que l'al·lel *S_f* s'ha descrit com a responsable de l'expressió de l'autocompatibilitat de l'ametller, fa poc que s'ha descobert que té dues expressions fenotípiques diferents, pel que no sempre es pot considerar un índex de l'autocompatibilitat dels genotips que el tenen. L'estudi de les quatre cultivars mallorquines que presenten aquest al·lel ha confirmat la seva autoincompatibilitat, de manera que aquest al·lel s'hi expressa en la seva forma fenotípicament activa, com també s'ha comprovat en un grup de cultivars del sud d'Itàlia, fet que podria indicar una connexió entre aquestes dues poblacions mediterrànies d'ametller.

Paraules clau: al·lèls; ametller; autocompatibilitat; locus *S*; *Prunus amygdalus*.

INTRODUCCIÓ

La majoria de les cultivars d'ametller (*Prunus amygdalus* Batsch), amb unes poques excepcions, són autoincompatibles (Socias i Company, 1977), fet que comporta que la seva pol·linització encreuada sigui essencial per a la producció d'un fruit, ja que la part comercial de l'ametller és una llavor que exigeix la fecundació de l'òvul pel pol·len. L'autocompatibilitat s'ha considerat un caràcter desitjable per als cultivars d'ametller (Socias i Company *et al.*, 1998), pel qual s'ha convertit en un objectiu prioritari dels programes de millora genètica (Socias i Company, 1978). La introducció de l'autocompatibilitat es va intentar per primera vegada a l'ametller per mitjà de la introgressió d'aquest caràcter des del presseguer [*P. persica* (L.) Batsch] mitjançant la hibridació del presseguer 'Lukens Honey' amb l'ametller 'Texas' i els successius retro-entrecreuaments amb 'Nonpareil' i altres cultivars d'ametller (Socias i Company *et al.*, 1976). El redescobriments de l'autocompatibilitat a la població d'ametllers de la regió italiana de la Pulla (Grasselly & Olivier, 1976) i la confirmació de la transmissió de l'autocompatibilitat a la descendència (Socias i Company & Felipe, 1977) permeté d'incorporar aquest caràcter als programes de millora genètica de l'ametller (Felipe & Socias i Company, 1985; Socias i Company, 1990). La font exclusiva de l'autocompatibilitat a la majoria dels programes de millora ha estat 'Tuono' i qualche altre cultivar pròxima procedent de la mateixa regió de la Pulla (Socias i Company, 2002). Com a conseqüència d'aquest reduït cercle de diversificació de l'autocompatibilitat, s'han observat alguns signes de depressió, produïts per la consanguinitat dels individus de diverses descendències de millora, probablement deguts a l'efecte de gens letals o deleteris presents a la població de la Pulla i que poden afectar diferents caràcters agronòmics, com són el creixement dels tubs pol·línics, el vigor de la planta i la seva grossària (Alonso & Socias i Company, 2005; Grasselly & Olivier, 1988). Aquesta situació redueix l'eficàcia dels programes de millora i es podria evitar per mitjà de la diversificació de les fonts de l'autocompatibilitat, fins ara limitades a aquesta població de la Pulla. Aquesta possibilitat podria donar-se si es confirmés la presència de l'autocompatibilitat en d'altres poblacions locals d'ametller, tal com va passar originàriament amb la població de la Pulla (Grasselly & Olivier, 1976). Per tant, es va considerar d'interès estudiar les cultivars mallorquines d'ametller presents a la col·lecció na-

cional de germoplasma ubicada al CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria) d'Aragó a Saragossa (Espiau *et al.*, 2002).

L'autocompatibilitat de l'ametller s'atribueix a la presència de l'al·lel S_f (Socias i Company & Felipe, 1988), de manera que el producte que aquest al·lel codifica a l'estil no presenta l'activitat RNasa pròpia dels altres al·lells S (Bošković *et al.*, 2003). L'al·lel S_f s'ha seqüenciat i s'han dissenyat encebadors específics per a la seva detecció a partir del segon intró (Channuntapipat *et al.*, 2001). Aquests encebadors s'han utilitzat àmpliament en la identificació de plançons autocompatibles als programes de millora genètica de l'ametller (Alonso & Socias i Company, 2005; López *et al.*, 2005).

Aquesta aproximació també s'ha aplicat a un grup de cultivars mallorquines d'ametller amb el fi d'establir la seva identitat al·lèlica. El conreu de l'ametller a Mallorca s'ha basat en un gran nombre de cultivars autòctones (Estelrich, 1907), encara que darrerament s'han introduït d'altres cultivars de diversos programes de millora genètica. Si bé hi ha notícies de la introducció de cultivars d'altres procedències, probablement a principis del segle XIX, amb l'activitat de la Societat Econòmica d'Amics del País, com possiblement va ocórrer amb cultivars com 'Sicilià', la majoria de cultivars mallorquines presenta una tipologia relativament homogènia, fet que pot indicar un origen molt antic, relacionat amb la introducció d'ametlles fins i tot abans de la nostra era, com mostra la semblança de les ametlles del naufragi de Magaluf (cap al 400 aC) amb una cultivar actual com 'Menu' (Cerdà, 1973).

L'examen de la identitat al·lèlica d'un grup de cultivars mallorquines ha permès d'identificar l'al·lel S_f a quatre de les cultivars examinades, 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot' (Kodad *et al.*, 2008; 2009b). Aquestes cultivars no s'havien assenyalat mai abans com a autocompatibles (Rubí, 1980), pel que es va plantejar la necessitat de profunditzar en l'estudi de la seva compatibilitat floral per mitjà d'una anàlisi multi-dimensional, que inclogués la identificació molecular del seu genotip S , així com l'expressió de la seva auto-(in)compatibilitat pel creixement dels tubs pol·línics i el quallat en camp després de pol·linitzacions controlades. El coneixement de cada genotip i de la seva expressió fenotípica podrà permetre de recomanar els parentals adequats als programes de millora genètica amb el fi de diversificar les fonts de l'autocompatibilitat i així disminuir els problemes produïts per la depressió de consanguinitat.

MATERIALS I MÈTODES

Material vegetal

S'estudiaren 10 cultivars (Taula 1) d'origen mallorquí presents a la col·lecció nacional de germoplasma de l'ametller. Aquestes cultivars es mantenen com a arbres empeltats sobre el patró clonal híbrid ametller × pres-seguer INRA GF-677, seguint un manteniment comercial de les plantacions (Espiau *et al.*, 2002). Les cultivars utilitzades com a testimonis en els diferents assaigs de compatibilitat i d'identitat dels al·lells es troben a la mateixa col·lecció de germoplasma.

Creixement dels tubs pol·línics i quallats de camp

L'auto-(in)compatibilitat fisiològica es va determinar per mitjà de tres mètodes diferents: creixement dels tubs pol·línics, quallats després d'autopol·linitzacions artificials i quallats estimats a branques embossades. Es recolliren flors al camp a l'estat fenològic D (Felipe, 1977) i es dugueren al laboratori per a la seva preparació d'acord amb el procediment descrit per Kodad & Socias i Company (2006). Les relacions de compatibilitat es determinaren per l'observació del creixement dels tubs pol·línics a un microscopi Leitz Ortholux II (Leitz, Wetzlar, Alemanya) amb una font de llum ultraviolada d'una làmpada de mercuri Osram HBO 200 W/4 (Osram GmbH, Munic, Alemanya), mitjançant la fluorescència dels dipòsits de callosa dels tubs pol·línics per tinció amb blau d'anilina després del seu aixafament.

Al camp, diverses branques tot al voltant dels arbres se seleccionaren per tal de fer les emasculacions i pol·linitzacions artificials, així com d'altres branques s'embossaren abans de l'obertura de les flors tal com han descrit Socias i Company *et al.* (2004). Els quallats es determinaren al mes de juny per a tots els tractaments, quan ja no hi ha caiguda fisiològica de fruits.

Determinació de les RNases

Les RNases estilar es determinaren en gels de poliacrilamida. De cada cultivar es recolliren 20 estils de flors en l'estat fenològic D (Felipe, 1977) i es conservaren a -80°C fins a llur anàlisi. S'extragueren les proteïnes estilar i se separaren per mitjà de la tècnica de l'electroenfocament de gradient de pH en desequilibri (NEpHGE). L'activitat de les RNases es

Taula 1. Llista de les cultivars mallorquines d'ametller estudiades i genotip *S* determinat.

Cultivar	Nombre de clon	Genotip <i>S</i> ¹	Tècnica ²
'Alzina'	238	<i>S</i> ₇ <i>S</i> ₃₆	P, S, T
'Garondès'	235	<i>S</i> ₇ <i>S</i> ₃₆	P, S, T
'Menut'	247	<i>S</i> ₁₀ <i>S</i> ₁₃	S, T
'Pau'	234	<i>S</i> ₂₂ <i>S</i> ₂₃	C, P, S
'Ponç'	246	<i>S</i> ₇ <i>S</i> ₂₇	P, S
'Pou de Felanitx'	237	<i>S</i> ₃₁ <i>S</i> ₇	S
'Taiatona'	242	<i>S</i> ₃₂ <i>S</i> ₇	S
'Totsol'	240	<i>S</i> ₈ <i>S</i> ₃₁	P, S
'Verdereta'	239	<i>S</i> ₂₂ <i>S</i> ₂₃	C, P, S
'Vivot'	241	<i>S</i> ₇ <i>S</i> ₂₃	P, S

¹ Els nous al·lells s'han remarcat en negreta.

² Mètode aplicat en la determinació dels al·lells: C, pol·linització encreuada amb cultivars dels mateixos al·lells; P, anàlisi PCR amb encebadors específics per als al·lells *S*; S, seqüenciació de nucleòtids; T, digestió enzimàtica.

va detectar per tinció segons el procediment descrit per Bošković *et al.* (1997). La determinació es va repetir almenys dues vegades per tal d'assegurar la seva confirmació.

Aïllament del DNA i condicions de la PCR

El DNA genòmic es va extreure de les fulles joves de les cultivars segons el mètode d'extracció CTAB basat en Doyle & Doyle (1987). Per a l'amplificació per la PCR, la solució de DNA es va diluir a $20\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ en aigua.

La identificació dels al·lells *S* de cada cultivar per la PCR es va dur a terme per mitjà d'encebadors universals o específics (Taula 2). Totes les reaccions de la PCR es realitzaren amb $20\text{ } \mu\text{L}$ de la solució que contenia 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, $0,1\text{ mM}$ de cada dNTP, $0,2\text{ } \mu\text{M}$ de cada encebador, 1 unitat de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Madrid, Espanya), i 90 ng de DNA genòmic d'ametller. El programa de PCR incloïa una desnaturació inicial a 95°C durant 3 min, seguida per 34 cicles de 30 s a 95°C , 45 s o 1 min a la temperatura d'anellament (Taula 2), i 1 o 2 min a 72°C , amb un pas final d'extensió de 10 min a 72°C .

Els productes de la PCR se separaren a gels a $1,5\%$ (p/v) d'agar en 150 mL del tampó $1 \times$ TBE, es tincien amb una solució de $0,4\text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de

Taula 2. Encebadors de PCR utilitzats per a la determinació dels al·lells *S*.

Encebador	Al·lel objectiu	Seqüència de nucleòtids (5'–3')	Grossària del producte (bp)	Temperatura d'anellament (°C)
Encebadors al·lel-específics dissenyats a partir del segon intró				
S ₁ F	S ₁	CTCTTTAGCATTTTAGTTTTAG	488	55
S ₁ R		CTGAGACATCCAAGCAATATAG		
S ₈ F	S ₈	CAAATGGTCCTTCAGGTTTTTC	648	65
S ₈ R		CCCAAATCGCAGACTCACTCT		
S ₂₃ F	S ₂₃	ATTGTCATCTGAAGACCATATAC	437	60
S ₂₃ R		TGAGACATCCAAGCAATATATAC		
S _f F	S _f	GTGCCCTATCTAATTTGTTGAC	459	60
S _f R		GACATTTTTTTAGAAAGAGTG		
Encebadors conservats per al segon intró				
SeRT	S ₃	ACCAACTGCAGAGTTCGAACG	1175	52
Suniv		TACCACTTCTGTAACAACCTGAG		
ConF	-	GTGCAACAATGGCCACCGAC	#	55
ConR	-	TACCACTTCATGTAACAACCTGAG		
AS1II (F)	-	TATTTTCAATTTGTGCAACAATGG	#	53
AmyC5(R)	-	CAAAATACCACTTCATGTAACAAC		

#: Variable, dependent de la cultivar.

bromur d'etidi, i es visualitzaren davall una llum UV. La determinació de les bandes es va dur a terme amb una escala normalitzada d'1 kbp de DNA (Invitrogen).

Clonació i seqüenciació del gDNA de les *S*-Rnases

Per a l'amplificació de les regions entre el pèptid de senyal i la regió conservada C5 dels al·lells s'utilitzaren l'encebador directe PaConsI-F (Sonneveld *et al.*, 2003) i l'encebador invers EM_PC5conSRD (Sutherland *et al.*, 2004), d'acord amb el procediment d'Ortega *et al.* (2006). A més, s'utilitzaren encebadors específics per a la identificació de l'al·lel *S_f* (Channuntapipat *et al.*, 2001). Abans de la clonació, la grossària de banda corresponent a l'al·lel analitzat es va purificar mitjançant el Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega, Madrid, Espanya) i es va quantificar a un gel d'1,5% d'agar usant l'escala normalitzada d'1 kbp de DNA (Invitrogen). Els productes de la PCR purificats es clonaren al vector pCR2.1 mitjançant el TA Cloning Kit (Invitrogen). La presència de la inserció en el DNA plàsmid es va confirmar per digestió amb enzims de restricció amb *EcoRI*. Els plàsmids s'aïllaren amb el QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya). Almenys tres plàsmids de diferents PCRs se seqüenciaren des d'ambdós extrems.

Digestió restrictiva dels fragments de la PCR

Els enzims de restricció per a un al·lel específic s'elegiren d'acord amb la informació obtinguda dels diferents bancs de gens. Dos µL d'una reacció de la PCR es digeriren durant la nit amb un enzim determinat en el tampó apropiat a 37°C. Els fragments de la PCR digerits s'analitzaren a gels d'1 o 2% (p/v) d'agar com ja s'ha descrit. La determinació de les bandes es dugué a terme amb una escala normalitzada d'1 kbp de DNA (Invitrogen).

RESULTATS

Identificació dels al·lells *S*

L'amplificació per la PCR del DNA genòmic amb els encebadors de consens AS1II (directe) i AmyC5R (invers), dissenyats des de les regions codificadores conservades que flanquegen el segon intró de les *S*-RNases de l'ametller, produí dos fragments de diferent longitud, excepte en els casos de 'Pou de Felanitx', 'Tiatona' i 'Totsol', en les quals només s'observà un fragment. El genotip de les cultivars estudiades es comparà amb els patrons de bandes de genotip *S* conegut per tal d'establir llur possible identitat (Fig. 1).

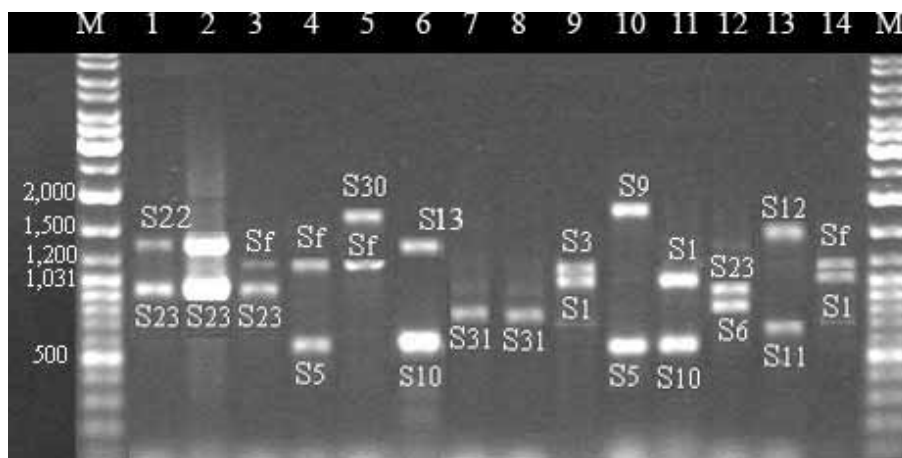


Figura 1. Identificació dels al·lells *S* de les cultivars mallorquines d'ametller amplificades amb els encebadors ASIII i AmyC5R en comparació amb sis cultivars de referència. Línies 1: 'Pau'; 2: 'Verdereta'; 3: 'Vivot'; 4: 'Garondès'; 5: 'Ponç'; 6: 'Menut'; 7: 'Totsol'; 8: 'Pou de Felanitx'; 9: 'Ferragnès'; 10: 'Primorskij'; 11: 'Desmai Llargueta'; 12: 'Ramillete'; 13: 'Marcona'; 14: 'Tuono'. M: escala d'1 kbp (Invitrogen).

Les cultivars que mostraren la presència dels al·lells S_1 , S_3 , S_8 , S_{23} i S_f s'analitzaren per mitjà d'encebadors específics perquè aquests al·lells presenten bandes de grossària similar a la d'altres al·lells (S_5 , S_6 , S_{10} i S_{12}). Els encebadors específics de l'al·lel S_f resultaren totalment efectius en la identificació d'aquest al·lel a 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot' (Fig. 1), encara que amb aquest encebador no es va obtenir cap amplificació a 'Alzina'. Quan amb aquestes quatre cultivars s'utilitzaren encebadors no específics, com a PaConsI-F i EM_PC5consRD, tots els genotips produïren dos fragments després de l'amplificació per la PCR del gDNA (Fig. 2). La seqüència parcial dels al·lells *S* va mostrar la característica típica de les RNases del tipus T2 dels *Prunus*, amb cinc dominis conservats (C1, C2, C3, RC4 i C5) i una regió hiper-variable (Fig. 3). L'anàlisi de les seqüències va revelar que la banda d'una grossària de 1600 bp amplificada a 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot' era idèntica a la de l'al·lel S_f (Fig. 4).

A les cultivars 'Menut', 'Pau', 'Ponç', 'Pou de Felanitx', 'Taiatona', 'Verdereta' i 'Totsol', l'amplificació per PCR va produir fragments de grossària diferent als trobats a les cultivars testimoni. Per tal d'assolir llur identificació, els al·lells desconeguts d'aquestes cultivars es clonaren i seqüenciaren per tal d'assignar els al·lells corresponents a cada una (Taula 1). Així, en un primer moment s'identificaren dos putatius nous al·lells *S* a aquestes cultivars, una banda d'aproximadament

800 bp a 'Pou de Felanitx' i 'Totsol' (S_{31} , EF690373) i un altra d'aproximadament 820 bp a 'Taiatona' (S_{32} , EF690374).

Va ésser especialment significativa la identificació de l'al·lel S_f a quatre de les cultivars examinades, 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot'. Amb tot, aquestes cultivars han estat considerades autoincompatibles (Rubí, 1980; Socias i Company & Rallo i Garcia, 1996), així que aquest al·lel es va seqüenciar i es va comprovar la seva identitat amb l'al·lel S_f (Kodad *et al.*, 2009b; Fernández i Martí *et al.*, 2009).

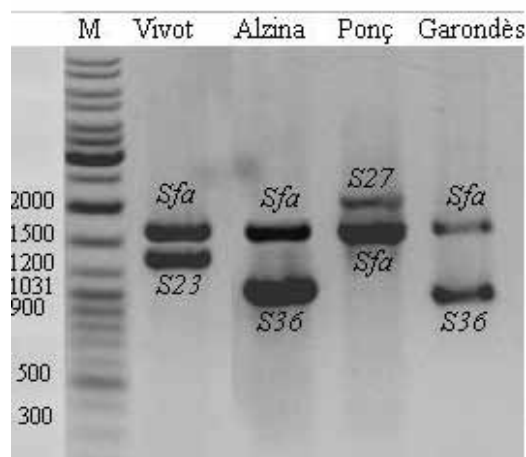


Figura 2. Identificació dels al·lells *S* de les cultivars mallorquines que presenten l'al·lel S_{fa} per mitjà de l'amplificació amb el parell d'encebadors PaConsI-F i EM_PCconsRD. M: escala d'1 kbp (Invitrogen).

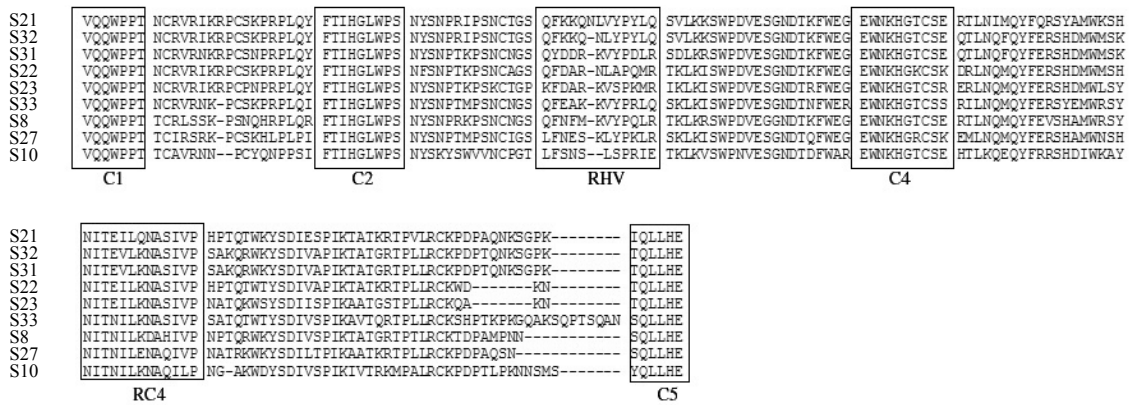


Figura 3. Alineació múltiple de les seqüències deduïdes d’aminoàcids per als al·lells *S* identificats a les cultivars mallorquines d’ametller. S’han enquadrat les regions conservades (C1-C5) i la regió hipervariable (RHV) típiques de les Rosaceae (Ujishima *et al.*, 1998).

En el cas d’‘Alzina’ i ‘Garondès’, l’amplificació per la PCR per mitjà dels encebadors AS111 i AmyC5R va produir dos fragments, un corresponent a *S_{fa}*, prèviament caracteritzat per Kodad *et al.* (2009b), i l’altre d’una grossària similar al dels al·lells *S₅* i *S₁₀* (Fig. 1). Aquest parell d’encebadors no sempre distingeix al·lells amb un nombre similar de nucleòtids, com succeeix amb *S₅* i *S₁₀* (López *et al.*, 2004; Kodad *et al.*, 2008), amb *S₅* i *S_f* (Sánchez-Pérez *et al.*, 2004; Kodad *et al.*, 2008), i amb *S₃* i *S₂₅* (Kodad *et al.*, 2008), ja que en aquests casos les bandes dels dos al·lells apareixen molt properes després de l’electroforesi en gels normals d’agar. Amb tot, l’aplicació de la digestió de restricció dels fragments obtinguts per PCR mitjançant diferents enzims va permetre de distingir entre *S₅* i *S₁₀*, assignant així l’al·lel *S₁₀* a ‘Garondès’ (Kodad *et al.*, 2008). Quan es va aplicar el mateix procediment amb ‘Alzina’,

també se li va assignar l’al·lel *S₁₀*. Emperò, quan la seqüència genòmica del DNA de les regions C1-C5 del suposat al·lel *S₁₀* d’‘Alzina’ i ‘Garondès’ (Fig. 3) es va comparar amb la seqüència de l’al·lel *S₁₀* de ‘Desmai Llangueta’ (AM231659) (Ortega *et al.*, 2006), així com amb la de l’al·lel *S₅* de ‘Bulbunte’ (R. Socias i Company, dades inèd.), es va comprovar que era diferent, així com de tots els altres al·lells dipositats al EMBL Nucleotide Sequences Database, encara que conserva l’estructura similar de tots els al·lells *S*. Per tot això, l’al·lel identificat a ‘Alzina’ i a ‘Garondès’ (Kodad *et al.*, 2008) es va considerar un nou al·lel i s’ha identificat com a *S₃₆* (Kodad *et al.*, 2010), i com a tal s’ha dipositat al EMBL Genebank (FJ876154 per al *S₃₆* d’‘Alzina’ i FJ876155 per al *S₃₆* de ‘Garondès’). Aquests resultats confirmen que l’anàlisi de seqüències es un mètode eficaç i fiable per a la identificació del genotip *S* a l’ametller.

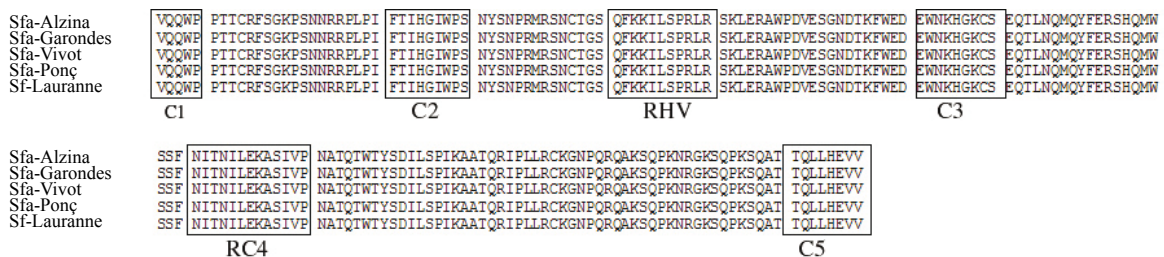


Figura 4. Alineació múltiple de les seqüències deduïdes d’aminoàcids per als al·lells *S_{fa}* i *S_f* identificats a les cultivars mallorquines d’ametller en comparació amb les dipositades a les bases de dades. S’han enquadrat les regions conservades (C1-C5) i la regió hipervariable (RHV) típiques de les Rosaceae (Ujishima *et al.*, 1998). Els nombres d’accessió del EMBL/GenBank són els següents: *S_f* de ‘Lauranne’ (AM690356; Bošković *et al.*, 2007, idèntic al de ‘Cambra’, EU684318; Kodad *et al.*, 2009b); *S_{fa}* de Vivot (FJ 887785); *S_{fa}* de ‘Garondès’ (FJ 887784); *S_{fa}* d’‘Alzina’ (FJ 887783) i *S_{fa}* de ‘Ponç’ (EU293146; Kodad *et al.*, 2009b).

Taula 3. Percentatge de pistils amb tubs pol·línics a llur base després dels diferents tractaments de pol·linització.

Cultivar	Auto-pol·linització	Pol·linització per 'Marcona' (♂)	Pol·linització sobre 'Marcona' (♀)
'Alzina'	0	67	68
'Garondès'	0	100	89
'Ponç'	0	98	92
'Vivot'	0	69	87

Taula 4. Quallat (%) després de pol·linitzacions artificials als tractaments de camp.

Cultivar	Auto-pol·linització	Pol·linització per 'Marcona' (♂)	Pol·linització sobre 'Marcona' (♀)
'Alzina'	0	25,9	21,4
'Garondès'	0	33,2	31,2
'Ponç'	0	25,7	28,2
'Vivot'	0	34,8	32,0

Assaigs de pol·linització

La germinació de totes les mostres de pol·len utilitzades per a les pol·linitzacions artificials va ésser molt bona, indicant la seva elevada viabilitat (R. Socias i Company *et al.*, dades inèd.). Els pistils de totes les cultivars varen mostrar una bona germinació del pol·len després de llur autopol·linització. El nombre de tubs pol·línics en el terç superior del pistil va ésser similar tant en el cas de les autopol·linitzacions com en el de les pol·linitzacions encreuades, amb una mitjana de 47 tubs pol·línics. Amb tot, el nombre de tubs pol·línics a la base de l'estil va ésser nul en el cas de les autopol·linitzacions, quan en el cas de les pol·linitzacions encreuades sí que s'observaren tubs pol·línics (Taula 3).

En el cas de les pol·linitzacions artificials al camp, no es va obtenir cap fruit després de l'autopol·linització, mentre que en el cas de la pol·linització amb el pol·len de 'Marcona', el quallat va ésser superior al 25% (Taula 4). En cap cas no s'obtingueren fruits a les branques embossades.

Els genotips que comparteixen els mateixos al·lells *S*, tal com 'Verdereta' i 'Pau' ($S_{22}S_{23}$), així com 'Alzina' i 'Garondès' ($S_{36}S_{37}$), es varen interpol·linitzar i mostraren llur interincompatibilitat, confirmant així els resultats obtinguts per l'anàlisi de PCR i per digestió enzimàtica. Crida l'atenció que les cultivars 'Alzina' i 'Garondès', que presenten l'al·lel S_p siguin interincompatibles, fet que confirma l'activitat d'aquest al·lel en el reconeixement del propi pol·len i d'un altre pol·len que posseeixi l'al·lel S_p . Tant a 'Ponç' (Kodad *et al.*, 2009b) com a 'Vivot' (Fernández i Martí *et al.*, 2009) ja s'ha comprovat que aquestes cultivars mostren activitat de la RNasa, malgrat la presència

de l'al·lel S_p amb una activitat completa d'aquest al·lel, fins i tot en el reconeixement del pol·len que posseeixi la forma inactiva d'aquest al·lel, S_{fi} (Fernández i Martí *et al.*, 2010).

DISCUSSIÓ

Confirmació de la identitat dels al·lells *S*

La revisió de la composició al·lèlica de les cultivars mallorquines d'ametller ha revelat dos aspectes d'especial interès: la presència d'al·lells nous, no descrits prèviament, així com la de l'al·lel S_f a quatre de les cultivars examinades. La presència d'al·lells nous a una població d'ametller relativament aïllada no és d'estranyar, com ja s'havia comprovat en ampliar el ventall de cultivars examinades a treballs diferents (Kodad *et al.*, 2008, 2009a; Ortega *et al.*, 2005). La seqüenciació de alguns d'aquests al·lells ha mostrat que les diferències són de vegades molt petites, el que concorda amb la hipòtesi que es poden generar nous al·lells *S* per mitjà de l'acumulació de mutacions puntuals (Després *et al.*, 1994). Ortega *et al.* (2006) ja varen suggerir que la diversitat dels al·lells *S* no és atribuïble només a mutacions puntuals, sinó també a la recombinació intragènica a prop de l'intró, ja que Gilbert *et al.* (1997) varen assenyalar que els introns poden ésser 'punts calents' per a un possible sobre-encreuament meiótic.

La seqüenciació de l'al·lel S_f amplificat a 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot' per mitjà dels encebadors de consens PaConsi-F i EM_PC5consRD va confirmar llur identitat amb l'al·lel S_f prèviament identificat a aquestes cultivars (Kodad *et al.*, 2008; Fernández i Martí *et al.*, 2009) mitjançant la utilització de l'encebador específic per

a l'al·lel S_f dissenyat per Channuntapipat *et al.* (2001). L'alineament de la seqüència dels aminoàcids de l'al·lel S_f d'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot' va mostrar la seva identitat de seqüències amb l'al·lel S_f de les cultivars autocompatibles d'ametller, com 'Cambra' (Kodad *et al.*, 2009b) i 'Lauranne' (Channuntapipat *et al.*, 2001), així que, en raó a l'autoincompatibilitat fisiològica d'aquestes cultivars, es tracta de la forma activa de l'al·lel S_f denominada S_{fa} (Kodad *et al.*, 2009b) (Fig. 4). A més, aquest al·lel S_{fa} ha mostrat la seva completa activitat RNasa en el reconeixement de qualsevol tipus de pol·len amb el genotip S_p independentment de l'expressió fenotípica d'aquest al·lel S_f en el pol·len, ja sigui S_{fa} o S_{fi} . Al mateix temps, aquest al·lel es transmet a la descendència com un caràcter mendelià simple (Fernández i Martí *et al.*, 2010).

Expressió fenotípica de l'autoincompatibilitat

Els resultats del creixement dels tubs pol·línics i del quallat després de l'autopol·linització de les quatre cultivars que posseeixen l'al·lel S_{fa} , 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot', varen confirmar que són fisiològicament autoincompatibles. El percentatge prou alt de pistils amb tubs pol·línics a llur base després de la pol·linització amb 'Marcona', així com els quallats obtinguts després de la pol·linització encreuada, demostren que tots els pistils són capaços de mantenir el creixement dels tubs pol·línics si aquest pol·len és d'un genotip S diferent. Per tant, l'autoincompatibilitat fisiològica observada al pistil no es pot deure a una acumulació deficient de reserves al teixit transmissor del pistil (De Graaf *et al.*, 2001), ja que els pistils varen ésser capaços de subministrar tots els nutrients per a l'atracció, la guia i la conducció dels tubs pol·línics estranys (Cheung *et al.*, 1995; Cheung, 1996a, b). Quan el pol·len d'aquestes quatre cultivars es va utilitzar per a pol·linitzar una altra cultivar de genotip S diferent, es va comprovar la seva eficàcia en créixer normalment i dur a terme una fecundació correcta, corroborada per l'obtenció d'un bon nivell de quallat, considerat acceptable per a una producció comercial (Kester & Griggs, 1959).

Quan aquestes quatre cultivars s'autopol·linitzaren, l'aturada dels tubs pol·línics es va produir en el terç mitjà de l'estil. Això indica que el fenotip autoincompatible no és degut a l'efecte de la con-

sanguinitat, com ja s'ha descrit a d'altres genotips d'ametller que també posseeixen l'al·lel S_f , ja que per efecte de la consanguinitat els tubs pol·línics no s'aturen al terç mitjà de l'estil, sinó que arriben en un nombre molt baix a un percentatge reduït de pistils en relació a una pol·linització compatible (Alonso & Socias i Company, 2005). Pel contrari, aquestes quatre cultivars mostren realment els símptomes d'una pol·linització incompatible (Socias i Company *et al.*, 1976). És per això que aquest al·lel S_f s'ha identificat com a S_{fa} (Kodad *et al.*, 2009b) i no com a S_{fi} , la forma inactiva de l'al·lel S_f que confereix l'autocompatibilitat a l'ametller (Fernández i Martí *et al.*, 2009). Per tant, la utilització de l'encebador específic S_f per a la identificació de l'autocompatibilitat a l'ametller no és completament fiable, així que per tal d'assegurar una selecció indiscutible dels genotips autocompatibles s'han d'aplicar mètodes empírics, com l'observació del creixement dels tubs pol·línics, el quallat després de pol·linitzacions artificials al camp i el quallat a branques embossades (Socias i Company *et al.*, 2004).

Així mateix, com tots els resultats varen confirmar la identitat dels al·lells d'Alzina' i 'Garondès' i llur interincompatibilitat, s'ha proposat un nou grup d'interincompatibilitat a l'ametller, el XXVIII, per a afegir als proposats per Kodad & Socias i Company (2009).

Correlacions al·lèliques i geogràfiques

La presència de l'al·lel S_{fa} a aquestes quatre cultivars pròpies de Mallorca suggereix una possible relació parental entre aquests genotips. A més, fa poc que Bošković *et al.* (2007) han identificat una S -RNasa idèntica a la S_{fa} -RNasa d'aquestes quatre cultivars a d'altres tres cultivars autoincompatibles de la mateixa regió italiana que 'Tuono', la Pulla, que són 'Fra Giulio Grande', 'Santoro' i 'Cinquanta Vignali'. Això pot indicar que les poblacions d'ametller d'aquestes dues regions mediterrànies podrien estar relacionades i fins i tot es podria sospitar un possible intercanvi de material, no sols en el remot passat (Socias i Company, 1988), sinó també en èpoques més properes, com indica el conreu a Mallorca d'una cultivar com 'Sicília' que es considera procedent d'aquesta altra illa mediterrània.

La semblança entre diferents al·lells S també pot indicar una relació parental entre genotips distints.

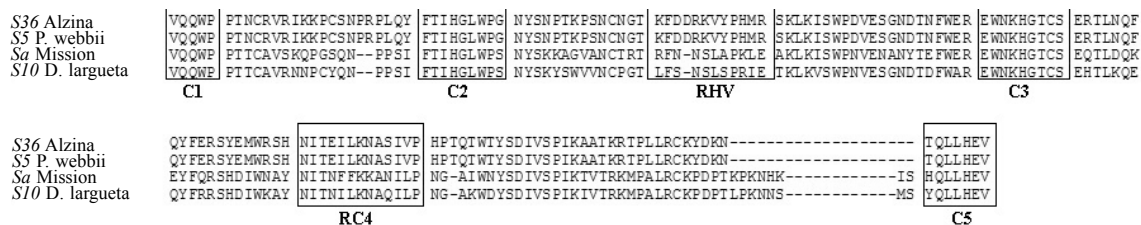


Figura 5. Alineació múltiple de les seqüències deduïdes d'aminoàcids per als al·lèls *S* dels cultivars estudiats en comparació amb d'altres al·lèls. S'han enquadrat les regions conservades (C1-C5) i la regió hipervariable (RHV) típiques de les Rosaceae (Ujishima *et al.*, 1998). Els nombres d'accèssió del EMBL/GenBank són els següents: *S*₃₆ d'Alzina' (FJ876154); *S*₅ de *P. webbii* (DQ993664); *S*_a de 'Mission' (AF148465) i *S*₁₀ de 'Desmai Lardueta' (AM 232659).

Així, l'al·lel *S*₃₆ identificat a Mallorca és idèntic a l'al·lel *S*₁₀ (DQ993664) (Fig. 5) d'una forma de *P. webbii* (Spach) Vierh. del centre d'Espanya (Sánchez & Oliveira, 2005). Igualment Kodad *et al.* (2008) han assenyalat que els al·lèls *S*₁, *S*₃₃ i *S*_f de l'ametller eren idèntics als *S*₆, *S*₈ i *S*_f identificats a diferents ecotips de *P. webbii* (Sánchez & Oliveira, 2005; Bošković *et al.*, 2007). Tots aquests resultats suporten la hipòtesi de la possibilitat d'introgressió d'aquests al·lèls per mitjà d'hibridació des de *P. webbii* a l'ametller (Socias i Company, 2004), o que aquests al·lèls s'hagin pogut heretar des d'un avantpassat comú (Kodad *et al.*, 2008).

El fet que *S*_f sigui inactiu als genotips autocompatibles, tal com s'ha observat a 'Tuono' i a 'Cambra' (Bošković *et al.*, 2007; Kodad *et al.*, 2009b), però que sigui actiu a genotips autoincompatibles, com són aquestes quatre cultivars mallorquines, encara no s'ha pogut explicar. S'han proposat diverses hipòtesis per a explicar aquest fet, tal com una mutació que afecti qualche fragment fora de la regió codificant (Kodad *et al.*, 2009b). Amb tot, com que no s'han trobat diferències fora de la regió codificant entre els al·lèls *S*_f d'una cultivar autocompatible com 'Blanquerna' (Socias i Company & Felipe, 1999) i d'una autoincompatible com 'Vivot' (Fernández i Martí *et al.*, 2009), aquesta diferència podria ésser deguda a l'activitat d'un gen modificador extern a l'al·lel *S*_f i que controli la seva expressió (Fernández i Martí *et al.*, 2010).

Com a conclusió, es pot indicar que totes les cultivars mallorquines estudiades són autoincompatibles, incloses les quatre que presenten l'al·lel *S*_f 'Alzina', 'Garondès', 'Ponç' i 'Vivot'. Aquests resultats indiquen que la presència d'aquest al·lel a una cultivar d'ametller no li confereix implícitament

un fenotip autocompatible. Per tant, la combinació d'una aproximació molecular (PCR i anàlisi de seqüències) així com fisiològica (creixement dels tubs pol·línics i quallats al camp) és indispensable per a avaluar eficaçment l'autocompatibilitat de l'ametller.

AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha dut a terme en el marc dels projectes AGL2010-22197-C02-01 de la CICYT i INIA-RF2008-00027, així com de l'activitat del Grup Consolidat d'Investigació A12 d'Aragó.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- Alonso, J. M. & Socias i Company, R. 2005. Self-compatibility expression in self-compatible almond genotypes may be due to inbreeding. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 865-869.
- Bošković, R., Tobutt, K. R., Batlle, I. & Duval, H. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.
- Bošković, R., Tobutt, K. R., Batlle, I., Duval, H., Martínez-Gómez, P. & Gradziel, T. M. 2003. Styler ribonuclease in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding* 122: 70-76.
- Bošković, R., Tobutt, K. R., Ortega, E., Sutherland, B. C. & Godini, A. 2007. Self-(in)compatibility of the almond *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of 'wild-type *S*_f' and new self-compatibility alleles encoding inactive *S*-RNases. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 665-676.
- Cerdà, D. 1973. Economía antigua de Mallorca. In: Mascaró, J. (Ed.), *Historia de Mallorca* 1. Ed. J. Mascaró, Palma de Mallorca: 417-448.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M. & Collins, G. 2001. Sequences of cDNAs and genomic DNAs encoding the *S*₁, *S*₇, *S*₈ and *S*_f alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1115-1122.
- Cheung, A. Y. 1996a. Pollen-pistil interactions during pollen tube growth. *Trends in Plant Science* 1: 45-51.

- Cheung, A. Y. 1996b. The pollen tube growth pathway: its molecular and biochemical contributions and responses to pollination. *Sexual Plant Reproduction* 9: 330–336.
- Cheung, A. Y., Wang, H. & Wu, H. 1995. A floral TT-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383–393.
- De Graaf, B. H. J., Deksen, J. W. M. & Mariani, C. 2001. Pollen and pistil in the progamic phase. *Sexual Plant Reproduction* 14: 41–55.
- Després, C., Saba-El-Leil, M., Rivard, S. R., Morse, D. & Cappadocia, M. 1994. Molecular cloning of two *Solanum chacoense* S-alleles and a hypothesis concerning their evolution. *Sexual Plant Reproduction* 7: 169–176.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11–15.
- Espiau, M. T., Ansón, J. M. & Socias i Company, R. 2002. The almond germplasm bank of Zaragoza. *Acta Horticulturae* 591: 275–278.
- Estelrich, P. 1907. *El almendro y su cultivo en el mediodía de España e Islas Baleares*. Hijos de J. Cuesta, Madrid & Antonio López, Barcelona.
- Felipe, A. J. 1977. Almendro. Estados fenológicos. *Información Técnica Económica Agraria* 27: 8–9.
- Felipe, A. J. & Socias i Company, R. 1985. L'amélioration génétique de l'amandier à Saragosse. *Options Méditerranéennes, Série Etudes* 1985/I: 9–14.
- Fernández i Martí, A., Alonso, J. M., Hanada, T., Yamane, H., Tao, R. & Socias i Company, R. 2010. The almond S_f haplotype shows a double expression despite its comprehensive genetic identity. *Scientia Horticulturae* 125: 685–691.
- Fernández i Martí, A., Hanada, T., Alonso, J. M., Yamane, H., Tao, R., & Socias i Company, R. 2009. A modifier locus affecting the expression of the S-RNase gene could be the cause of breakdown of self-incompatibility in almond. *Sexual Plant Reproduction* 22: 179–186.
- Gilbert, W., De Souza, S. J. & Long, M. 1997. Origin of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7698–7703.
- Grasselly, C. & Olivier, G. 1976. Mise en évidence de quelques types autocompatibles parmi les cultivars d'amandier (*P. amygdalus* Batsch) de la population des Pouilles. *Annales de l'Amélioration des Plantes* 26: 107–113.
- Grasselly, C. & Olivier, G. 1988. Phénomènes d'inbreeding dans les descendance issues d'autofécondation chez l'amandier. In: Grasselly, C. (Ed.), *7^e colloque du Grempa - Groupe de recherche et d'étude méditerranéen pour le pistachier et l'amandier. Recueil des communications. Reus (Tarragone), Espagne, 17-19 juin 1987* (Rapport EUR, 11557). Office des publications officielles des Communautés européennes, Luxembourg: 73–78.
- Kester, D. E. & Griggs, W. H. 1959. Fruit setting in the almond: the effect of cross-pollinating various percentages of flowers. *Proceedings of the American Horticultural Society for Horticultural Science* 74: 214–219.
- Kodad, O., Alonso, J. M., Fernández i Martí, A., Oliveira, M. M. & Socias i Company, R. 2010. Molecular and physiological identification of new S-alleles associated with self-(in) compatibility in local Spanish almond cultivars. *Scientia Horticulturae* 123: 308–311.
- Kodad, O., Alonso, J. M., Sánchez, A., Oliveira, M. M. & Socias i Company, R. 2008. Evaluation of genetic diversity of S alleles in an almond germplasm bank. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 603–605.
- Kodad, O., Sánchez, A., Oliveira, M. M. & Socias i Company, R. 2009a. S-allele genotyping of local Spanish almond cultivars. *Acta Horticulturae* 814: 635–638.
- Kodad, O. & Socias i Company, R. 2006. Pollen source effect on pollen tube growth in advanced self-compatible almond selections (*Prunus amygdalus* Batsch). *Advances in Horticultural Science* 20: 256–261.
- Kodad, O. & Socias i Company, R. 2009. Review and update of self-incompatibility alleles in almond. *Acta Horticulturae* 814: 421–424.
- Kodad, O., Socias i Company, R., Sánchez, A. & Oliveira, M. M. 2009b. The expression of self-compatibility in almond may not only be due to the presence of the S_f allele. *Journal of the American Horticultural Society for Horticultural Science* 134: 221–227.
- López, M., Mnejja, M., Romero, M. A., Vargas, F. J. & Batlle, I. 2005. Use of S_f specific PCR for early selection of self-compatible seedlings in almond breeding. *Options Méditerranéennes, Série A* 63: 269–274.
- López, M., Mnejja, M., Rovira, M., Collins, G., Vargas, F. J., Arús, P. & Batlle, I. 2004. Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonuclease, sequencing analysis and controlled pollinations. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 954–964.
- Ortega, E., Bošković, R., Sargent, D. J. & Tobutt, K. R. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genomics and Genetics* 276: 413–426.
- Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Bošković, R. & Tobutt, K. R. 2005. Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breeding* 124: 188–196.
- Rubí, V. 1980. *El almendro*. Delegación de Baleares del Ministerio de Agricultura, Palma de Mallorca.
- Sánchez, A. M. & Oliveira, M. M. 2005. S-alleles in self-compatible *Prunus webbii*. *Options Méditerranéennes, Série A* 63: 147–152.
- Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F. & Martínez-Gómez, P. 2004. Identification of S-alleles in almond using multiplex PCR. *Euphytica* 138: 263–269.
- Socias i Company, R. 1977. La autoincompatibilidad en el almendro. *Información Técnica Económica Agraria* 26: 41–47.
- Socias i Company, R. 1978. La autocompatibilidad en la mejora del almendro. In: *I Congreso Internacional de Almendra y Avellana, Reus, 25-28 octubre 1976*. Feria Oficial de Muestras de la Provincia de Tarragona, Reus: 513–522.
- Socias i Company, R. 1988. Per l'avior de l'ametller: una troballa d'ametlles antigues. A: *Homenatge al Dr. Sebastià García Martínez* 3. Conselleria de Cultura, Educació i Ciència (Generalitat Valenciana), València: 319–322.
- Socias i Company, R. 1990. Breeding self-compatible almonds. *Plant Breeding Reviews* 8: 313–318.
- Socias i Company, R. 2002. Latest advances in almond self-compatibility. *Acta Horticulturae* 591: 205–211.
- Socias i Company, R. 2004. The contribution of *Prunus webbii* to almond evolution. *Plant Genetic Resources Newsletter*

- 14: 9–13.
- Socias i Company, R., Alonso, J. M. & Gómez Aparisi, J. 2004. Fruit set and productivity in almond as related to self-compatibility, flower morphology and bud density. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 754–758.
- Socias i Company, R. & Felipe, A. J. 1977. Heritability of self compatibility in almond. In: *3e colloque du Grempra, Bari, 3-7 octobre 1977*: 181–183.
- Socias i Company, R. & Felipe, A. J. 1988. Self-compatibility in almond: transmission and recent advances in breeding. *Acta Horticulturae* 224: 307–317.
- Socias i Company, R. & Felipe, A. J. 1999. 'Blanquerna', 'Cambra' y 'Felisia': tres nuevos cultivares autógamos de almendro. *Información Técnica Económica Agraria* 95: 111–117.
- Socias i Company, R., Felipe, A. J., Gómez Aparisi, J., García, J. E. & Dicenta, F. 1998. The ideotype concept in almond. *Acta Horticulturae* 470: 51–56.
- Socias i Company, R., Kester, D. E. & Bradley, M. V. 1976. Effects of temperature and genotype on pollen tube growth of some self-compatible and self-incompatible almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 490–493.
- Socias i Company, R. & Rallo i Garcia, J. 1996. Ensayo de polinización de los principales cultivares de almendro de Mallorca. *Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetales* 11: 21–31.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R. & Robbins, T. P. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles S_1 to S_{16} using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1059–1070.
- Sutherland, B. G., Robbins, T. P. & Tobutt, K. R. 2004. Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. *Plant Breeding* 123: 582–584.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M. & Hirano, H. 1998. Cloning and characterization of cDNAs encoding *S*-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of *S*-RNases in Rosaceae. *Molecular Genomics and Genetics* 260: 261–280.