

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA**

Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra.

Área de Fisiología Vegetal



## **TESIS DOCTORAL**

### **“Polinización y cuajado en ciruelo japonés”**

**Doctoranda:**

M<sup>a</sup> Engracia Guerra Velo

**Directores:**

Dr. Margarita López-Corrales

Dr. Javier Rodrigo García

Dr. Ana Wünsch Blanco

**Badajoz, 2 de junio de 2011**

Memoria presentada en satisfacción de los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.





**Margarita López Corrales**, Doctor Ingeniero Agrónomo, investigadora del Centro de Investigación “Finca La Orden-Valdeesequera” perteneciente a la Vicepresidencia Segunda y Consejería de Economía, Comercio e Innovación, de la Dirección General de Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura.



**Javier Rodrigo García**, Doctor Ingeniero Agrónomo, investigador del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), perteneciente al Gobierno de Aragón.

**Ana Wünsch Blanco**, Doctor por la Universidad Pública de Navarra investigadora del centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), perteneciente al Gobierno de Aragón.

#### **CERTIFICAN:**

Que la Memoria titulada **“POLINIZACIÓN Y CUAJADO EN CIRUELO JAPONÉS”**, que presenta la Licenciada en Ciencias Biológicas M<sup>a</sup> Engracia Guerra Velo para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el **Centro de Investigación Finca “La Orden-Valdeesequera”** de la Junta de Extremadura y en el **Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)** del Gobierno de Aragón.

Considerando que se trata de un trabajo original de investigación que reúne todos los requisitos establecidos en el RD 778/1998, de 30 de abril, estimamos que puede ser presentado para su defensa ante el Tribunal nombrado al efecto.

Para que conste y preste los efectos oportunos lo firmamos, a petición de la interesada, en Badajoz, el 2 de junio de 2011.



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
AGRADECIMIENTOS.....	15
RESUMEN .....	21
SUMMARY .....	22
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	23
1.1. EL CIRUELO JAPONÉS. ORIGEN, MEJORA Y SITUACIÓN DEL CULTIVO.....	24
1.2. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	27
1.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA .....	30
1.4. INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO .....	31
1.5. PROBLEMÁTICA Y NECESIDADES DEL CULTIVO.....	35
1.6. OBJETIVOS.....	37
<b>PARTE I: POLINIZACIÓN, INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO Y CUAJADO</b>	
2. LA POLINIZACIÓN COMO CONDICIONANTE DEL CUAJADO EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS .....	41
2.1. INTRODUCCIÓN .....	42
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
2.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	43
2.2.2 <i>Polinización y cuajado en campo</i> .....	44
2.2.3 <i>Preparación del material para el microscopio</i> .....	49
2.2.4 <i>Análisis estadístico</i> .....	52
2.3. RESULTADOS .....	52
2.3.1 <i>Cuajados en campo</i> .....	52
2.3.2 <i>Germinación y viabilidad de polen</i> .....	62
2.4. DISCUSIÓN.....	64
3. AUTOINCOMPATIBILIDAD Y FALTA DE CUAJADO EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS. SELECCIÓN DE CULTIVARES POLINIZADORES.....	69
3.1. INTRODUCCIÓN .....	70

## Índice general

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	73
3.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	73
3.2.2 <i>Polinizaciones en campo</i> .....	73
3.2.3 <i>Polinizaciones en laboratorio</i> .....	74
3.2.4 <i>Preparación de muestras para el microscopio</i> .....	75
3.2.5 <i>Identificación de alelos S mediante PCR</i> .....	76
3.3. RESULTADOS .....	78
3.3.1 <i>Observación del crecimiento de los tubos polínicos</i> .....	78
3.3.2 <i>Identificación de alelos S mediante PCR</i> .....	82
3.4. DISCUSIÓN.....	83

## **PARTE II: IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS S Y GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD**

4. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO S Y ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD MEDIANTE PCR Y ENSAYOS DE POLINIZACIÓN EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS .....	91
4.1. INTRODUCCIÓN.....	92
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	94
4.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	94
4.2.2 <i>Análisis de alelos S mediante PCR</i> .....	94
4.2.3 <i>Ensayos de polinización</i> .....	95
4.3. RESULTADOS .....	96
4.3.1 <i>Determinación de alelos S mediante análisis de PCR</i> .....	96
4.3.2 <i>Ensayos de polinización</i> .....	103
4.4. DISCUSIÓN.....	105
5. DETECCIÓN DEL GENOTIPO S DE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS MEDIANTE PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR.....	109
5.1. INTRODUCCIÓN .....	110
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	112
5.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	112
5.2.2 <i>Identificación del genotipo S mediante PCR y electroforesis capilar</i> .....	112
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
5.3.1 <i>Detección de alelos S mediante electroforesis capilar</i> .....	114
5.3.2 <i>Genotipado S de cultivares de ciruelo japonés</i> .....	120

**PARTE III: DESARROLLO DE ÓVULOS Y CUAJADO**

<b>6. DEGENERACIÓN DE ÓVULOS Y FALTA DE CUAJADO EN DOS NUEVOS CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS.....</b>	<b>125</b>
6.1. INTRODUCCIÓN .....	126
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	128
6.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	128
6.2.2 <i>Viabilidad del polen</i> .....	128
6.2.3 <i>Ensayos de polinización</i> .....	129
6.2.4 <i>Incompatibilidad polen-pistilo</i> .....	133
6.2.5 <i>Degeneración de óvulos</i> .....	133
6.2.6 <i>Análisis estadístico</i> .....	134
6.3. RESULTADOS .....	134
6.4. DISCUSIÓN.....	138
<b>7. LA EMASCULACIÓN DE FLORES COMO CAUSA DE FALTA DE CUAJADO EN CRUCES ENTRE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS.....</b>	<b>143</b>
7.1. INTRODUCCIÓN .....	144
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	145
7.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	145
7.2.2 <i>Ensayos de polinización en campo</i> .....	146
7.2.3 <i>Incompatibilidad polen-pistilo</i> .....	147
7.2.4 <i>Desarrollo de óvulos</i> .....	148
7.2.5 <i>Análisis estadístico</i> .....	149
7.3. RESULTADOS .....	149
7.3.1 <i>Cuajado y caída de frutos</i> .....	149
7.3.2 <i>Auto(in)compatibilidad y relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares</i> ....	152
7.3.3 <i>Degeneración de óvulos</i> .....	155
7.4. DISCUSIÓN.....	156
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL .....</b>	<b>161</b>
8.1. INFLUENCIA DE LA POLINIZACIÓN EN EL PROCESO REPRODUCTIVO.....	162
8.1.1 <i>Germinación del polen</i> .....	162
8.1.2 <i>Crecimiento de los tubos polínicos</i> .....	163
8.2. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO .....	164
8.2.1 <i>Auto(in)compatibilidad</i> .....	164

## Índice general

8.2.2 <i>Relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares</i> .....	167
8.3. OTROS FACTORES IMPLICADOS EN LA FALTA DE CUAJADO.....	169
8.3.1 <i>Esterilidad femenina</i> .....	169
8.3.2 <i>Origen de los cultivares y comportamiento agronómico</i> .....	171
9. CONCLUSIONES .....	173
10. REFERENCIAS.....	175
11. ANEXOS.....	185
Anexo 1. PUBLICACIONES RECOGIDAS EN ‘SCIENCE CITATION INDEX’ .....	187
Anexo 2. PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL .....	203
Anexo 3. DESCRIPCIÓN DE CULTIVARES* .....	205
Anexo 4. GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE CIRUELO JAPONES.....	211
Anexo 5. GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE CIRUELO JAPONES POR ORDEN ALFABÉTICO DE CULTIVARES.....	217
Anexo 6. PORCENTAJE DE PISTILOS CON TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO EN AUTOPOLINIZACIONES Y CRUCES ENTRE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS REALIZADOS EN LABORATORIO.....	222



ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.1.** Taxonomía de los ciruelos de interés agronómico. .... 28

**Figura 1.2.** Porte redondeado del cultivar Songold. .... 29

**Figura 1.3.** Hojas con borde serrado y forma obovada..... 29

**Figura 1.4.** Flores hermafroditas de ciruelo japonés..... 29

**Figura 1.5.** Frutos de ciruelo japonés, cv. Santa Rosa. .... 30

**Figura 1.6.** Esquema del crecimiento de tubos polínicos en reacción compatible (verde) e incompatible (rojo). .... 32

**Figura 2.1.** Obtención de polen. Anteras depositadas sobre una bandeja de papel (A). Detalle de anteras antes (arriba), durante (derecha) y después de dehiscir (izquierda) (B). Pincel, malla y frasco utilizados para el colado y almacenamiento de polen (C). .... 46

**Figura 2.2.** Ensayos de polinización en campo realizados mediante emasculación de flores. Establecimiento de poblaciones de flores (A). Yemas en estado de botón globoso (B). Flores emasculadas (C). Polinización de flores emasculadas (D). .... 47

**Figura 2.3.** Ensayos de polinización en campo realizados mediante polinización suplementaria de flores sin emasculación bajo malla. Árboles cubiertos con malla para evitar la llegada de insectos polinizadores (A). Establecimiento de poblaciones de flores (B). Polinización suplementaria de flores sin emasculación (C). .... 48

**Figura 2.4.** Granos de polen germinando en medio de cultivo *in vitro*. Granos de polen sin teñir observados al microscopio de campo claro (A). Granos de polen teñidos con azul de anilina observados al microscopio con luz ultravioleta (B). Grano de polen germinado con el tubo polínico mayor que su diámetro (C). Grano de polen sin germinar (izquierda) y grano de polen germinado con tubo polínico menor que su diámetro (derecha) (D). Barras: 50µm. .... 51

**Figura 2.5.** Porcentaje de cuajado en ensayos de polinización libre, autopolinización y polinización cruzada (2007-2010) en los cultivares de ciruelo japonés Songold (A y B), Larry Ann (C y D), Angeleno (E y F), Blackamber (G), Black Diamond (H), Fortune (I), Earliqueen (J), Golden Globe (K), Black Star (L), Golden Japan (M), Black Gold (N) y Friar (O). .... 58-59

<b>Figura 2.6.</b> Cuajado y caída relativa de ensayos de polinización libre, autopolinización y polinización cruzada (2007-2010) en los cultivares de ciruelo japonés Songold (A y B), Larry Ann (C y D), Angeleno (E y F), Blackamber (G), Black Diamond (H), Fortune (I), Earliqueen (J), Golden Globe (K), Black Star (L), Golden Japan (M), Black Gold (N) y Friar (O).....	60-61
<b>Figura 2.7.</b> Germinación del polen en el estigma. Granos de polen hidratados y germinados (A). Granos de polen sin germinar (B). Barra: 50µm.....	63
<b>Figura 3.1.</b> Flores emasculadas sobre espuma de florista húmeda.....	75
<b>Figura 3.2.</b> Diagrama de una flor de ciruelo japonés y observación del crecimiento de tubos polínicos en el estilo. Tubo polínico parado en el tercio superior del estilo en un cruce incompatible (A). Tubos polínicos creciendo en mitad del estilo en un cruce compatible (B). Tubo polínico en la base del estilo alcanzando la entrada del ovario en un cruce compatible (C). Barras: 50µm.....	77
<b>Figura. 4.1.</b> Amplificación mediante PCR, con los cebadores PruC2-PCER, de los cultivares de ciruelo japonés Frontier (F), Nubiana (N), Queen Ann (QA), Queen Rosa (QR), Angeleno (A), Santa Rosa (S), Ambra (Am), Simka (Si), Red Beaut (R), Blackamber (B), Fortune (Fo), Black Beaut (BB), Laetitia (L), TC Sun (T) y Golden Globe (G). 1kb: estándar de tamaño.....	101
<b>Figura. 4.2.</b> Pedigrí (Byrne, 1989; Okie y Weinberger, 1996; Boonprakob <i>et al.</i> , 2001; Goulão <i>et al.</i> , 2001; Ahmad <i>et al.</i> , 2004) y genotipo <i>S</i> (Beppu <i>et al.</i> , 2002, 2003; Sapir <i>et al.</i> , 2004; Halász <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2007; este trabajo) de algunos de los principales cultivares de ciruelo japonés. p.l.: Polinización libre; *: Alelos <i>S</i> esperados.....	103
<b>Figura. 4.3.</b> Crecimiento de tubos polínicos en el estilo en un cruce compatible (A). Tubo polínico parado en el estilo en un cruce incompatible (B). Barras = 50 µm.....	104
<b>Figura. 5.1.</b> Electroferograma del analizador genético ABI310 (Applied Biosystems) de fragmentos de PCR de <i>SFB</i> (NED, negro) y <i>SRNasa</i> (6-FAM) del cultivar Kelsey ( <i>SfSk</i> ). En naranja estándar de tamaño (500-LIZ, Applied Biosystems).....	114
<b>Figura 6.1.</b> Germinación de polen, crecimiento del tubo polínico y desarrollo de óvulos en flores de ciruelo japonés. Germinación de granos de polen <i>in vitro</i> (A) y en el estigma (B). Tubo polínico parado en el estilo en un cruce incompatible (C). Tubos polínicos avanzando hacia la base del estilo en un cruce compatible (D). Óvulo degenerado con acumulación de calosa en el final de la calaza (E). Óvulo bien desarrollado (F). Barras = 50 µm. ....	132
<b>Figura 6.2.</b> Curva de caída en tres cultivares de ciruelo japonés con diferentes tratamientos de polinización: polinización libre, autopolinización	

y polinización cruzada. Porcentaje de frutos a partir del número inicial de flores durante las 12 semanas siguientes a la antesis en ‘Sweet August’ (A), ‘Rubirosa’ (B) y ‘Simka’ (C).....137

**Figura. 7.1.** Flores de ciruelo japonés en estado de botón globoso (A) y después de la emasculación (B).....147

**Figura. 7.2.** Curvas de caída en distintos tratamientos de polinización realizados en cultivares de ciruelo japonés: Polinización libre, autopolinización y polinización cruzada, en flores emasculadas y no emasculadas. Porcentaje de flores y frutos que permanecen en el árbol respecto al número original de flores durante trece semanas después de antesis: ‘Fortune’(A), ‘Golden Globe’ (B), ‘Black Diamond’(C), ‘Earliqueen’ (D). .....150

**Figura. 7.3.** Crecimiento de los tubos polínicos y estado de desarrollo de los óvulos en flores de ciruelo japonés: Tubo polínico detenido en el estilo en un cruce incompatible (A) (Barra = 50  $\mu\text{m}$ ), tubos polínicos avanzando hacia la base del estilo en un cruce compatible (B) (Barra = 50  $\mu\text{m}$ ), los dos óvulos degenerados con acumulación de calosa en la zona final de la calaza (C) (Barra = 100  $\mu\text{m}$ ), óvulo bien desarrollado (D) (Barra = 100  $\mu\text{m}$ )......153

**Figura. 7.4.** Amplificación mediante PCR de los alelos de la *SRNasa*, usando los cebadores PruC2-PCER, en los cultivares de ciruelo japonés: Black Diamond (B), Fortune (F), Earliqueen (E), Ambra (A), Angeleno (An) y Golden Globe (G) procedentes de las diferentes fincas de ensayo. 1kb: Estándar de tamaño.....154

ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 2.1.** Prueba Chi-cuadrado de Pearson sobre tablas de contingencia para el análisis de los porcentajes de frutos cuajados y de pistilos con granos de polen germinados en el estigma entre los diferentes tratamientos de polinización de cada cultivar..... 53

**Tabla 2.2.** Ensayos de polinización realizados sobre 12 cultivares de ciruelo japonés (2007-2010). Año de ensayo, localización de la plantación, cultivar analizado, tratamiento, número de flores, número de frutos, porcentaje de cuajado y porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma. E, emasculación; S, polinización suplementaria. Valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los diferentes tratamientos de polinización de cada cultivar..... 56-57

**Tabla 2.3.** Germinación de polen en cultivo *in vitro* de los cultivares de ciruelo japonés utilizados en los ensayos de 2009 y 2010. Valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0,05$ )..... 63

**Tabla 3.1.** Ensayos de polinización realizados sobre 12 cultivares de ciruelo japonés (2007-2010). Año de ensayo, localización de la plantación, cultivar analizado, tratamiento, porcentaje de cuajado (Capítulo 2), porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo en ensayos de campo y ensayos de laboratorio, y genotipo S. E: Emasculación; S: Polinización suplementaria.....80-81

**Tabla 3.2.** Grupo de incompatibilidad (G.I.) y genotipo S de los cultivares analizados. .... 82

**Tabla 4.1.** Grupos de incompatibilidad (G.I.) y alelos S de 68 cultivares descritos en este trabajo y 49 cultivares analizados en trabajos previos. .... 97-99

**Tabla 4.2.** Cultivares de ciruelo japonés autopolinizados, genotipo S, grupo de incompatibilidad (G.I.) al que pertenecen y porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo. .... 100

**Tabla 4.3.** Cruces entre cultivares de distintos grupos de incompatibilidad y porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base de estilo en cada cruce. .... 100

**Tabla 4.4.** Tamaño de los fragmentos de PCR, en pares de bases, de los alelos S amplificados con las diferentes combinaciones de cebadores. .... 101

**Tabla 5.1.** Alelos de *SRNasa* y *SFB* secuenciados en ciruelo japonés. .... 111

**Tabla 5.2.** Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo S de los 105 cultivares de ciruelo japonés analizados en este trabajo. .... 116-118

<b>Tabla 5.3.</b> Tamaños de productos de PCR (pb) detectados mediante electroforesis capilar con los cebadores PaConsIF-PaConsIR2 (Sonneveld <i>et al.</i> , 2006) para <i>SRNasa</i> y Fbox5'A-FboxIntronR (Vaughan <i>et al.</i> , 2005) para <i>SFB</i> en los alelos <i>S</i> identificados en los cultivares control con los analizadores genéticos ABI 310 y ABI 3130xl. ....	119
<b>Tabla 6.1.</b> Tratamientos de polinización realizados en cada cultivar, número de flores utilizadas, número de frutos obtenidos, porcentaje de cuajado, porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma, porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo, porcentaje de pistilos con los dos óvulos degenerados, y genotipo <i>S</i> de los cruces realizados.....	131
<b>Tabla 6.2.</b> Porcentaje de granos de polen germinados <i>in vitro</i> en ocho cultivares de ciruelo japonés. Los valores son la media $\pm$ error estándar de seis replicaciones. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).....	135
<b>Tabla 7.1.</b> Tratamientos de polinización realizados, número de flores utilizadas, número de frutos cuajados, porcentaje de cuajado y porcentaje de pistilos con ambos óvulos degenerados en diferentes cultivares de ciruelo japonés .....	151
<b>Tabla 7.2.</b> Tratamientos de polinización, porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y genotipo <i>S</i> de los diferentes cultivares de ciruelo japonés utilizados en polinizaciones realizadas en laboratorio.....	154



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la colaboración prestada en la realización de esta tesis al departamento de Fruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) en Zaragoza y al departamento de Hortofruticultura del Centro de Investigación 'Finca La Orden-Valdesequera' en Guadajira (Badajoz), donde se ha realizado este trabajo, por haberme permitido disponer de sus instalaciones, material vegetal, medios y personal.

Agradezco la cesión de material vegetal a:

Agroseguro S.A.

Grupo ALM (Zaragoza)

Ignasi Iglesias [Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA-  
Generalitat de Cataluña)(Lérida)]

José Luis Espada [Centro de Técnicas Agrarias (CTA-DGA) (Zaragoza)]

José Ramón Rituerto [RITUCON Consultoría Agronómica (Badajoz)]

Manuel Alonso Escobar [Cooperativa de Regantes de Extremadura,  
(CREX)(Badajoz)]

OPFH S.L. Frugalia (Badajoz)

Dr. Ryutarō Tao (Universidad de Kyoto, Japón)

Viveros Provedo (Badajoz)

Viveros Atanasio Naranjo (Badajoz)

Esta tesis ha sido financiada por:

Ministerio Ciencia e Innovación–FEDER (Proyectos: AGL2006–13529–C02–00;  
AGR, AGL2009 12621–C02–02; INIA RTA2009–00144–00–00)

Gobierno de Aragón (Grupo de excelencia A-43)

Agroseguro S.A.

M<sup>a</sup> Engracia Guerra Velo ha disfrutado de una beca predoctoral del Ministerio de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) 2007-2010 [B.O.E. nº 308 (2006) pp. 45691].

Como dijo una buena amiga, *“en este momento es cuando te das cuenta de que la tesis está casi finalizada y es hora de dar las gracias a todos los que han ayudado para que se hiciese realidad”*.

**Gracias:** En primer lugar quiero agradecer profundamente todo lo que significa esta tesis a mis directores: a Rodro, por confiar y creer en mí en todo momento, por transmitirme la ilusión con la que vive todos los progresos, por tener siempre una palabra amable y una palmadita en la espalda de esas que dan la vida, por llevarme de la mano durante este arduo, aunque inolvidable camino hacia la realización de esta tesis y por haber hecho de mí un proyecto de investigadora, un millón de gracias. A Ana Wunsch por su paciencia, por sus ganas, por no dejar que me durmiese nunca en los laureles y por ayudarme a zambullirme en el apasionante y complicado mundo de los marcadores moleculares, gracias Ana. A Marga, por haber estado ahí siempre, apoyándome en la distancia primero y en la cercanía después, por haber confiado en mí para este maravilloso viaje que ha resultado ser el mundo del ciruelo japonés, gracias Marga.

En la Universidad de Extremadura agradecer a Julio Salguero y especialmente a Francisco Espinosa su inestimable apoyo en los trámites y burocracias de esta tesis.

En el CITA de Aragón, gracias a los becarios con los que compartí la sala, Ana Pina, Carmen, Ariana y Ons que hicieron más amenas las horas de trabajo, y especialmente a mi gran amigo Ángel, por haber estado siempre ahí, por tu humor, por ese ritmo loco que impregnas en todas partes y por haberme apoyado y respetado en todas mis decisiones.

Gracias a todos aquellos que me hicieron los días menos grises lejos de casa, a Chus, por esas infusiones-confesiones que tan divertidas hicieron las tediosas tardes de trabajo y a Lidia por haberme ayudado a cambiar (a la vejez!) mi percepción de muchas cosas.

A las dos grandes amigas que me llevo de mi experiencia maña, Carol y Librada, por ser como sois, auténticas!, por vuestro cariño y por la amistad que tan cercana siento a pesar de la distancia, un millón de gracias de todo corazón.

A mis tres escuderas: Teresa por su profesionalidad desbordante y su saber hacer, a Olga por esas profundas charlas viajeras que tanto me ayudaron y por esa forma de ver la vida que se contagia y a Rosa por el optimismo que desprendes en todo lo que haces y por cuidarme dentro y fuera del laboratorio. Muchas gracias también a mi Pili, por haberme dado tanto cariño y considerarme una hija más y por hacerme sentir siempre como una reina, gracias Pili.

A todo el personal del departamento de Fruticultura, en especial a Pilar Bergua por ser un encanto y la persona más eficiente que he conocido nunca, a Pilar Tomey por sus ánimos y su cariño en este largo viaje, a Jesús Castillo por esa chispa que nadie acierta a seguir, a Sanzol, Julio Bubal, José Miguel, Quique, Maite, Pepe Jaime, Mariajo, Marisol, Ana G, Manu, Susana, Rafa Gella y por supuesto a Rafael Socías por ver la vida regalando poesía, a todos ellos muchas gracias.

En Aula Dei, agradezco a María todos sus consejos y la sencillez y humildad con la que regala su saber, y a todos los demás del grupo el cariño, la acogida y los calçots!!.

En el Centro de Investigación Agraria Finca “La Orden-Valdesequera” gracias a Henar, por haber sido la artífice de esta aventura y por haber confiado en mí hasta las últimas consecuencias.



A mis niñas del laboratorio, Candi y Lourdes, por su tesón, su eficacia y por estar siempre al pie del cañón y a Fernando, Miguel y Guadalupe por su inestimable ayuda en todo momento.

A mi gran amiga Ana por haberme seguido el rastro y haberme apoyado y ayudado tanto, porque a pesar de los quehaceres de becaria nunca han faltado los mails de ánimo y cariño.

A mis amigas Nieves, Maribel y Laura porque han sabido comprender y perdonar mis ausencias que han sido demasiadas y me han hecho llegar toneladas de cariño en todo momento.

A mi familia, a los que están, en especial a mi abuela y a mi tía María, por aguantar mis ausencias con resignación y haberme dado tanto cariño en momentos tan difíciles para todos, no imagináis lo que os he echado de menos, y a los que ya no están, por ayudar desde arriba y porque les hubiera enorgullecido esta experiencia.

A ti mamá, porque eres la esencia que envuelve mi vida, por quererme hasta el delirio sin pedir nada a cambio, por ser mi apoyo y mi sustento, por dejarme volar lejos para alcanzar mis sueños a costa de tus desvelos, porque siempre te he sentido cerca a pesar del abismo insalvable de la distancia que nos han separado demasiado tiempo, por todo esto y más, esta tesis es para ti.

A la persona que comparte mis pasos en el camino de la vida, Sergio, porque contigo todo ha sido más fácil, por soportar tantas ausencias, por no dejar que la mecha de mis ilusiones se apagase nunca, aunque ello haya supuesto una distancia que no merecíamos, por haberme apoyado y no haberte escuchado jamás un reproche y por formar parte indispensable del puzzle de mi futuro, esta tesis también es para ti.



A mi madre.  
A ti.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación  
sino como una oportunidad para entrar en el maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein



## RESUMEN

En algunos cultivares de ciruelo japonés se produce una caída masiva de flores y se obtienen porcentajes de cuajado muy bajos por causas que no están bien establecidas. Esta situación repercute negativamente en la cosecha y provoca grandes oscilaciones en la producción de un año a otro. En este trabajo se estudian las causas de los cuajados erráticos registrados en 12 cultivares de ciruelo japonés en condiciones reales de cultivo. Para ello, se han analizado el proceso de polinización y cuajado de frutos en campo y la incompatibilidad polen-pistilo. Los ensayos de polinización controlada realizados en plantaciones comerciales con historiales de cuajados erráticos mostraron una clara influencia de la polinización en el cuajado en los cultivares analizados, ya que se obtuvo un cuajado mayor que el registrado en polinización libre o bien no se obtuvo cuajado, lo que indica que es necesaria una elección adecuada de cultivares polinizadores para obtener cuajado. La observación de la germinación del polen al microscopio ha permitido descartar la ausencia de insectos polinizadores y la falta de viabilidad del polen como las causas responsables de la falta de cuajado en las plantaciones estudiadas, aunque se han identificado dos nuevos cultivares androestériles, Black Jewell y Sybarite. Para determinar si la incompatibilidad polen-pistilo está relacionada con las situaciones de falta de cuajado, se ha evaluado la auto(in)compatibilidad en un total de 30 de cultivares, incluyendo los de mayor importancia a nivel nacional, mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos en flores autopolinizadas en campo y laboratorio. La combinación de ensayos de polinización y cuajado en campo, la determinación de la autoincompatibilidad mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio y la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad mediante PCR ha permitido identificar las causas de los bajos cuajados de 12 cultivares en 9 plantaciones comerciales. Uno de estos cultivares, Friar, se ha identificado como autocompatible, y los otros 11 como autoincompatibles (Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Fortune, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann y Songold), para los que se han podido seleccionar cultivares polinizadores compatibles y coincidentes en floración en las condiciones de cultivo de cada plantación, lo que ha permitido aportar soluciones agronómicas a cada uno de las situaciones analizadas de falta de cuajado asociada a problemas de polinización. Se ha evaluado la auto(in)compatibilidad en otros 17 cultivares en flores autopolinizadas en laboratorio. Siete de ellos se han identificado como autocompatibles (Casselman, Laetitia, Nubiana, Rubirosa, Santa Rosa, Simka y Zanzi Sun) y 10 como autoincompatibles (Champion, Eldorado, Flavour Queen, Frontier, Green Sun, Laroda, Queen Ann, Queen Rosa, Sweet August y TC Sun). Se ha determinado también el genotipo *S* de un total de 115 cultivares, 97 de ellos descritos por primera vez, que incluyen la mayoría de los cultivados en la actualidad. Para ello se han utilizado técnicas moleculares ya establecidas en ciruelo japonés y se ha desarrollado un nuevo método, basado en la detección con electroforesis capilar, que han permitido distribuir los cultivares en sus correspondientes grupos de incompatibilidad y agilizar el proceso de selección de polinizadores. Los análisis moleculares de los genes del locus *S* en los cultivares analizados han permitido identificar cinco nuevos alelos de incompatibilidad (*S<sub>0</sub>-S<sub>s</sub>*) y 14 nuevos grupos de incompatibilidad. Finalmente, en algunos cultivares se han detectado situaciones de falta de cuajado no relacionadas con problemas de polinización, sino con problemas en el desarrollo de los óvulos. Por un lado, en las flores emasculadas de algunos cruzamientos y, por otro, en plantaciones comerciales de dos nuevos cultivares (Rubirosa y Sweet August). En ambos casos la falta de cuajado se ha asociado a la degeneración prematura de los dos óvulos de la flor.

## SUMMARY

In some Japanese plum cultivars a massive flower drop occurs and very low fruit set percentages are obtained for reasons that are not well established. This situation negatively influences crop load, causing large year-to-year variations in production. In this work, the causes of low and erratic fruit set of 12 Japanese plum cultivars are studied in commercial orchards. For this purpose, the pollination and fruit set processes in the field as well as the self-incompatibility and ovule development have been analyzed. Controlled pollination assays carried out in commercial orchards with previous erratic fruit set records showed a clear influence of pollination on fruit set, because fruit set in controlled pollinations was higher or null than fruit set in open pollination conditions, thus revealing that most cultivars need an appropriate pollinator to produce fruit set. The observation of pollen germination under the microscope has allowed to discard the absence of pollinating insects and reduced pollen viability as the causes of lack of fruit set in the orchards studied, although two male sterile cultivars, Black Jewell and Sybarite were newly identified. To determine if self-incompatibility is related to lack of fruit set, the self-(in)compatibility of 30 cultivars, including most relevant in Spanish orchards, was evaluated by the observation of pollen tube growth in self-pollinated flowers in the field and the laboratory. The combined pollination and fruit set assays in the field, self-incompatibility determination under the microscope and self-incompatibility *S* allele identification by PCR have allowed identifying the causes of low fruit set in 12 cultivars from 9 commercial orchards. One of these cultivars, Friar, has been identified as self-compatible, and the other 11 as self-incompatible (Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Fortune, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann and Songold), for which it was possible to select at least one compatible pollinator coincident in blooming time in the growing conditions of each orchard. This, it has been possible to provide agronomic solutions to each of the analyzed situations of lack of fruit set associated with pollination failure. The self(in)-compatibility has been evaluated in other 17 cultivars in self-pollinated flowers in the laboratory. Seven of them were self-compatible (Casselman, Laetitia, Nubiana, Rubirosa, Santa Rosa, Simka and Zanzi Sun) and 10 self-incompatible (Champion, Eldorado, Flavour Queen, Frontier, Green Sun, Laroda, Queen Ann, Queen Rosa, Sweet August and TC Sun). The *S* genotype of 115 cultivars, 97 of them described for the first time, which include most of currently grown cultivars, was also identified. For this purpose, molecular techniques well established in Japanese plum were used and a new methodology, based on capillary electrophoresis detection, was developed. These results allowed assigning the cultivars analyzed to their corresponding incompatibility groups and expediting the process of pollinator selection. Molecular analysis of *S*-locus genes in the cultivars tested allowed the identification of five new *S*-alleles (*So*-*Ss*) and 14 new incompatibility groups. Despite of these results, some cultivars showed lack of fruit set that was not related to pollination failure, but with abnormalities in the developmental process of ovules. In both emasculated flowers of some crosses, and in two new cultivars (Rubirosa and Sweet August), the lack of fruit was associated with premature degeneration of the two flower ovules.

## **1. INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1.1. EL CIRUELO JAPONÉS. ORIGEN, MEJORA Y SITUACIÓN DEL CULTIVO

El ciruelo japonés, como otros frutales de hueso, pertenece al género *Prunus* dentro de la familia Rosaceae, que incluye más de 100 géneros. El de los *Prunus* es el segundo género más numeroso dentro de la familia, con unas 200 especies (Okie, 2008). La mayoría de los cultivares de ciruelo cultivados en la actualidad pertenecen a dos especies: ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.), que incluye cultivares precoces adaptados a zonas templadas, y ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), más extendido en zonas más frías. Los ciruelos, en inglés “*plums*”, dieron originalmente nombre al género, ya que el término *Prunus* proviene del nombre en latín que recibían los ciruelos. Más tarde, los taxonomistas fueron añadiendo otras especies de frutales de hueso al género *Prunus*, como albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), almendro [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb], cerezo (*Prunus avium* L.) y melocotonero [*Prunus persica* (L.) Batsch] (Okie, 2008).

El ciruelo japonés tiene su origen en China, en las orillas del río Yangtze, donde su cultivo data de alrededor del año 300 a.C. (Okie, 2008). En el s. VIII fue llevado a Japón, donde se ha cultivado ampliamente hasta la actualidad (Okie y Weinberger, 1996). Sin embargo, la presencia del ciruelo japonés en Japón se cree que es anterior a esta fecha, ya que se han encontrado huesos de ciruelo de la Era Yayoi con 2.300 años de antigüedad, y en algunos libros japoneses antiguos ya se mencionaba este cultivo desde hace más de 1.500 años (Yoshida, 1987). A finales del s. XIX, el mejorador Luther Burbank llevó algunos genotipos de *P. salicina*, como ‘Kelsey’ y ‘Abundance’, desde Japón a Estados Unidos (Okie y Hancock, 2008). Con el objetivo de adaptar este material a las condiciones de cultivo de California e introducir nuevas características en la especie, se realizaron hibridaciones con otras especies americanas de ciruelos diploides, como *Prunus simonii* Carrière y *Prunus americana* Marsh, entre otras. A partir de estas hibridaciones se obtuvieron cultivares como Beauty, Burbank, Duarte, Eldorado, Formosa, Gaviota, Santa Rosa, Satsuma, Shiro y Wickson (Faust y Surányi, 1999; Okie, 2008).

En el s. XX el cultivo se expandió a países de zonas de clima templado de todo el mundo, como Australia, Brasil, Italia o Sudáfrica. El proceso de mejora continuó en cada país mediante la hibridación con las especies anteriores y otras nuevas como



*Prunus cerasifera* Ehrh. y *Prunus angustifolia* Marsh. (Faust y Surányi, 1999). Como resultado de las distintas hibridaciones, la mayoría de los cultivares de ciruelo japonés cultivados en la actualidad son híbridos interespecíficos obtenidos a partir de *P. salicina* y hasta otras 14 especies de *Prunus* (Okie y Weinberger, 1996). Aunque originariamente la denominación “ciruelo japonés” se empleaba sólo para los cultivares de *P. salicina*, hoy en día se aplica también a los cultivares procedentes de los distintos cruces interespecíficos. En los primeros cultivares comerciales híbridos, *P. salicina* contribuyó al tamaño, sabor y color del fruto, *P. simonii* aportó la firmeza y la acidez, y las especies americanas incorporaron dureza de piel, resistencia a enfermedades y calidad aromática (Okie, 2006).

En la actualidad se continúa el proceso de mejora del cultivo en distintos programas, tanto públicos como privados, en diferentes países del mundo como Australia, Brasil, España, Estados Unidos, Francia, Israel, Italia y Sudáfrica, que están generando un gran número de cultivares (Okie, 2008). A los objetivos de mejora tradicionales en la especie, como un gran calibre de fruto o resistencia al almacenamiento y transporte, se han ido incorporando otros nuevos, como la mejora de la calidad gustativa del fruto, nuevos colores de la piel, autocompatibilidad floral, bajas necesidades de frío, ampliación del periodo de recolección, con cultivares muy tempranos o muy tardíos, tamaño reducido del árbol y resistencia a enfermedades (Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008; Okie, 2008). En Occidente se valoran más los frutos de piel negra o púrpura, lo que ha provocado que estos cultivares sean los más cultivados. La piel oscura hace que las ciruelas resulten muy atractivas y que no se aprecien magulladuras y otras imperfecciones, pero puede provocar una recogida prematura de la fruta con la consiguiente reducción de la calidad, ya que en muchos cultivares la fruta adquiere esta tonalidad antes de alcanzar la madurez comercial.

Los bajos precios que en ocasiones han alcanzado algunos de los cultivares de ciruelas negras más cultivadas han provocado un aumento del interés en otros colores de piel, como el rojo y el amarillo o verde-amarillo, que es el color más apreciado en algunos mercados asiáticos. En los últimos años se están incorporando al mercado muchos cultivares nuevos procedentes de los programas de mejora, lo que está

## *Introducción general*

provocando una importante renovación varietal en la especie (Okie y Weinberger, 1996; Okie, 2006).

Las ciruelas japonesas se destinan principalmente al consumo en fresco, por lo que la apariencia del fruto, incluyendo color de la piel, tamaño y forma, constituye una importante característica del cultivar. Además de la apariencia del fruto, en el que una forma atractiva y un color negro, rojo o amarillo son valorados favorablemente por el consumidor, cada vez cobra mayor importancia las características gustativas, que han pasado a ser un objetivo importante en los programas de mejora. Igualmente, los frutos más firmes, además de resistir mejor la manipulación tras la cosecha y el transporte, son más apreciados por los consumidores (Okie, 2008).

La superficie dedicada al cultivo de ciruelo europeo y japonés en España ha alcanzado 18.600 ha, con una producción media anual de 169.000 t en los últimos diez años y más de 180.000 t en 2010 (MARM, 2011). La producción de ciruelas en España representa el 9% de la producción de la Unión Europea, que sitúa a España como el 8º productor a nivel mundial (FAOSTAT, 2011). Los principales países productores de ciruelo japonés son China, Estados Unidos (principalmente California), México, Italia, España, Chile, Pakistán, Corea, Egipto, Australia, Sudáfrica y Argentina. Se trata de un cultivo en expansión, principalmente en Europa y Asia (FAOSTAT, 2011).

A nivel nacional, en Extremadura, Andalucía y la zona mediterránea se cultivan principalmente cultivares de tipo japonés, mientras que en zonas más frías están más extendidos los cultivares de ciruelo europeo. Las comunidades con mayor producción anual en los últimos años son Extremadura (80.000 t) y Andalucía (36.000 t), con una superficie cultivada de más de 4.000 ha en cada una (MARM, 2011). Aunque la superficie dedicada al cultivo de ciruelo a nivel nacional se encuentra estabilizada, la evolución en los últimos años ha sido muy diferente en cada Comunidad Autónoma. En Extremadura, Andalucía y Murcia se produce el 79% de la producción nacional (MARM, 2011).

En la actualidad existe un gran número de cultivares, que se va ampliando con la introducción de nuevas obtenciones de los distintos programas de mejora (Anexo 3). Los cultivares de ciruelo japonés se caracterizan por tener frutos grandes y firmes, el hueso pequeño en relación al tamaño del fruto, forma redondeada, buenas aptitudes para la conservación y el transporte y una gran diversidad en el color de la piel y la

pulpa (Okie, 2008). Se pueden encontrar en el mercado nacional ciruelas japonesas desde mayo, con cultivares de maduración muy temprana como Red Beaut o Earliqueen procedentes de las regiones más precoces de Andalucía, Extremadura, Valencia o Murcia, hasta septiembre, con los cultivares más tardíos, como Angeleno o Larry Ann, en zonas interiores. Más de la mitad de la producción nacional recae en cultivares de piel negra, como Angeleno y Black Diamond, y el resto de la producción en cultivares de piel roja, como Fortune, Larry Ann y Red Beaut, o amarilla, como 'Songold', 'Golden Globe' y 'Golden Japan' (Anexo 3) (MARM, 2011). Desde España se exportan más de 89.200 t de ciruelas anuales, principalmente a países de la Unión Europea como Reino Unido (19%), Alemania (19%), Francia (13%) e Italia (12%) (FAOSTAT, 2011).

En general, las ciruelas procedentes del sur y el oeste peninsular son más precoces, mientras que las del valle del Ebro presentan mayor contenido de azúcares. La presencia de ciruelas importadas del hemisferio sur, principalmente Chile y Argentina, desde noviembre hasta abril, hace que sea posible encontrar ciruelas japonesas en nuestros mercados prácticamente en cualquier época del año (Giacinti, 2004).

## 1.2. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Los ciruelos de tipo japonés se clasifican dentro de la familia Rosaceae, que incluye entre 100 y 115 géneros y entre 3000 y 3500 especies, distribuidas por todo el mundo, aunque son más frecuentes en las zonas templadas y subtropicales del Hemisferio Norte. Los géneros más numerosos son *Potentilla*, *Rosa*, *Spiraea* y *Prunus*, (Strasburger *et al.*, 1984; Blanca y Díaz de la Guardia, 1999) (Fig. 1.1).

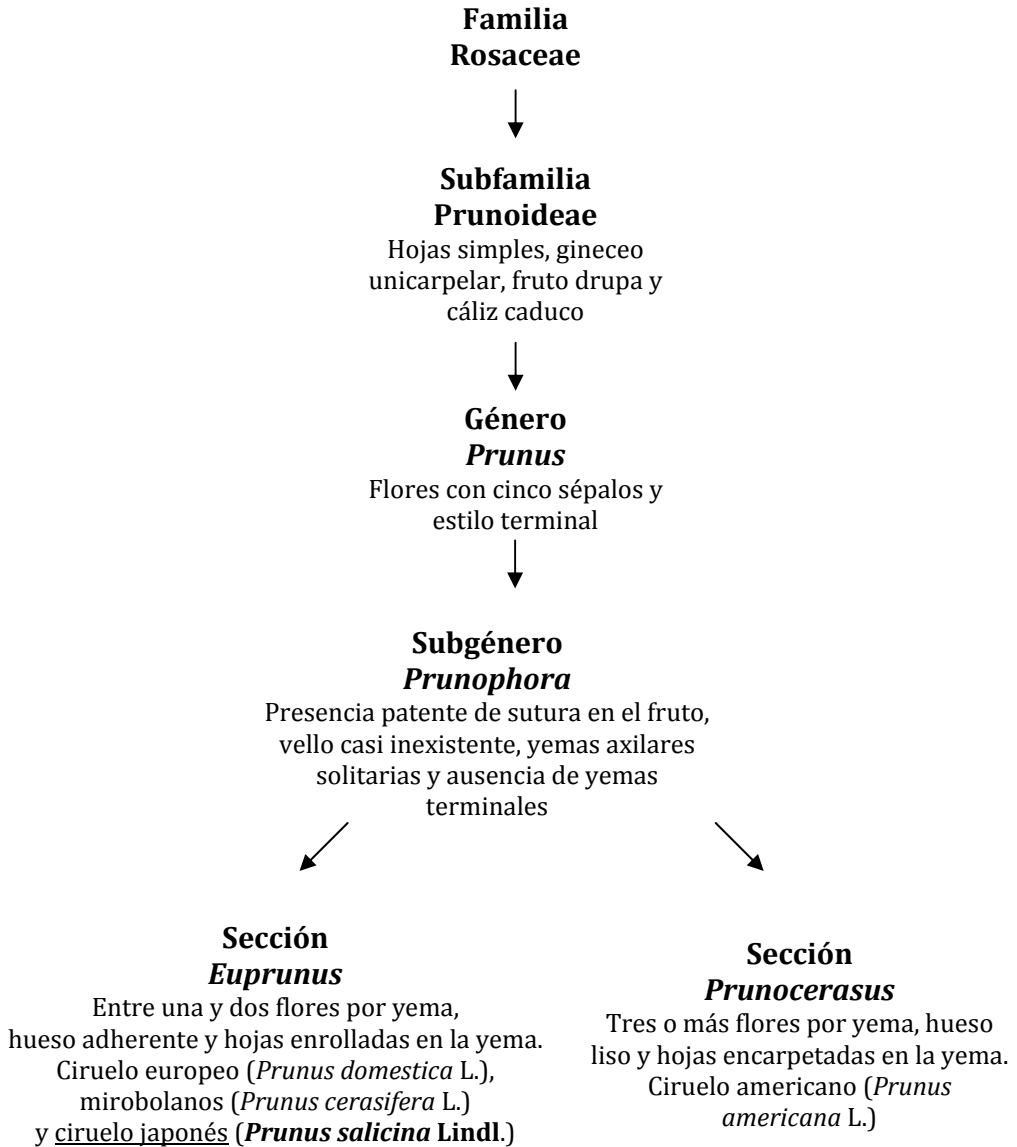


Figura. 1.1. Taxonomía de los ciruelos de interés agronómico (Okie, 2008).



Figura 1.2. Porte redondeado del cultivar Songold.

**Porte:** El ciruelo japonés presenta un tamaño de árbol entre pequeño y medio, llegando a alcanzar entre 8 y 10 m de altura en condiciones naturales. La copa suele presentar una forma redondeada (Fig. 1.2), aunque algunos cultivares procedentes de los programas de mejora de Estados Unidos pueden aparecer con un porte más erecto o columnar (Okie, 2008).

**Hojas:** Las hojas son de tipo caduco, que caen en el otoño. Son alternas, simples, con estípulas fijas al pecíolo, donde además a menudo se observan varias glándulas de pequeño tamaño. Suelen ser de forma elíptica a obovada, con ápice de agudo a acuminado, un tamaño de entre 5 y 10 cm de longitud y entre 3 y 6 cm de anchura y margen crenado o serrado (Fig. 1.3) (Okie, 2008).



Figura 1.3. Hojas con margen serrado y forma obovada.

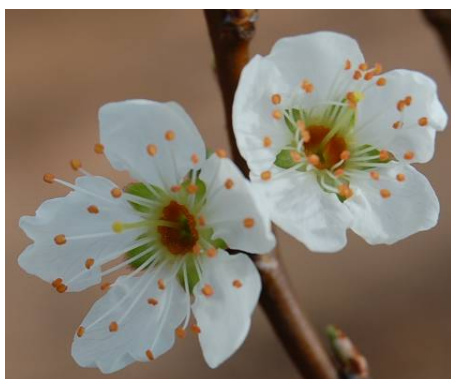


Figura 1.4. Flores hermafroditas de ciruelo japonés.

**Flores:** Presenta entre una y tres flores por cada yema. Las yemas florales generalmente flanquean una yema vegetativa. Las flores son solitarias, actinomorfas, hermafroditas, periginas y con el hipanto muy visible (Fig. 1.4). El perianto presenta 5 sépalos imbricados, que aparecen como lóbulos del hipanto, y 5 pétalos libres, generalmente grandes, vistosos y rara vez desiguales. La flor presenta un androceo, con entre 20 y 30

## Introducción general

estambres de filamentos libres insertos en un hipanto a menudo nectarífero, y un gineceo unicarpelar libre, con uno o dos primordios seminales por cada carpelo (Okie y Weinberger, 1996).

**Fruto:** El fruto es una drupa, con el exocarpo glabro y a menudo pruinoso, el mesocarpo carnoso y el endocarpo generalmente adherente y liso (Fig. 1.5) (Okie, 2008).



Figura 1.5. Frutos de ciruelo japonés, cv. Santa Rosa.

### 1.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

La reproducción sexual en angiospermas requiere una serie de eventos ineludibles para la fecundación del óvulo y la formación del fruto. En los frutales de hueso del género *Prunus*, la polinización es necesaria para el establecimiento del cuajado. Se realiza por insectos, principalmente himenópteros de los géneros *Bombus* y *Apis*, ambos pertenecientes a la familia Apidae (Calzoni y Speranza, 1998), los cuales depositan el polen en el estigma de la flor. El estigma del ciruelo japonés es de tipo húmedo, como en otros *Prunus*, y cuando está receptivo produce una secreción estigmática que ayudará a los granos de polen a adherirse a su superficie y a comenzar su germinación (Herrero y Arbeloa, 1989; Rodrigo y Herrero, 2002a). El periodo comprendido entre la polinización y la fecundación engloba un intenso proceso de interacción entre los tubos polínicos y el pistilo. Al germinar, el grano de polen genera un tubo polínico que avanza por el tejido transmisor del estilo en dirección al ovario. El tejido transmisor de los *Prunus* es de tipo compacto (Esau, 1977), y sirve de sustento nutricional de los tubos polínicos en su crecimiento hacia el ovario (Herrero y Hormaza, 1996).

A medida que va creciendo el tubo polínico, tanto la célula vegetativa como la generativa se sitúan en el extremo del tubo, quedando aisladas de los restos no funcionales mediante tapones de calosa. La función de la célula vegetativa parece ser la producción de las paredes del tubo, que están formadas por calosa en el interior y por celulosa en el exterior (Heslop-Harrison, 1987). La calosa es un polisacárido compuesto por 1,3- $\beta$ -D-glucano. Puede ser localizado citoquímicamente, ya que forma complejos con tinciones de anilina que bajo luz ultravioleta fluorescen y son fácilmente detectables (Currier, 1957), lo que permite diferenciar los tubos polínicos del resto de estructuras pistilares.

Las flores en *Prunus* tiene un gineceo unicarpelar (Sterling, 1964). El ovario contiene dos óvulos, y la fecundación de al menos uno de ellos es necesaria para que se produzca el cuajado, ya que en el género *Prunus* no se producen frutos de forma partenocárpica (Sedgley y Griffin, 1989; Hartmann y Neumüller, 2009). Uno de los dos óvulos, el óvulo primario, continúa creciendo en los días siguientes a la antesis y puede ser fecundado y llegar a formar una semilla; el otro, el óvulo secundario, detiene su crecimiento y generalmente aborta (Bradbury, 1929).

Numerosos factores intervienen en el proceso reproductivo desde la polinización hasta el establecimiento del cuajado, como la viabilidad del polen, el transporte del polen al estigma, la incompatibilidad polen-pistilo, la sincronía entre la llegada del tubo polínico al óvulo y la maduración del saco embrionario, la fecundación de al menos un óvulo y el inicio del desarrollo del cigoto (Dorsey, 1919; Bradbury, 1929; Harrold, 1935; Pimienta y Polito, 1982; Hormaza y Herrero, 1996a; Rodrigo y Herrero, 1998). Aunque estos procesos han sido estudiados en otras especies de *Prunus*, no se han estudiado en profundidad en ciruelo japonés. La biología reproductiva del ciruelo japonés podría explicar la falta de cuajado observada en algunos cultivares (Okie, 2006).

#### **1.4. INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO**

Una vez ocurrida la polinización, se produce un proceso de reconocimiento entre el grano de polen y los tejidos del pistilo que desemboca en la expresión de la incompatibilidad polen-pistilo (De Nettancourt, 2001). En especies de la familia de las

## Introducción general

Rosáceas como el ciruelo japonés opera un sistema de autoincompatibilidad de tipo homomórfico gametofítico monofactorial (De Nettancourt, 2001). Este mecanismo está genéticamente controlado por un locus polimórfico, el locus *S*, que codifica los genes que determinan los fenotipos del polen y del pistilo (Kao y Tsukamoto, 2004). La autoincompatibilidad se manifiesta por la inhibición del crecimiento de los tubos polínicos propios en el estilo, impidiendo su llegada al ovario y evitando así la autofecundación. En este mecanismo, cuando el alelo *S* del grano de polen haploide es diferente de los dos alelos *S* presentes en el tejido del estilo, que es diploide, el tubo polínico crece hasta llegar al ovario, donde puede fecundar el óvulo. Sin embargo, cuando el alelo *S* expresado en el polen es el mismo que alguno de los expresados en el tejido del pistilo, el crecimiento del tubo polínico es detenido en el estilo, impidiendo así la fecundación (Fig. 1.6).

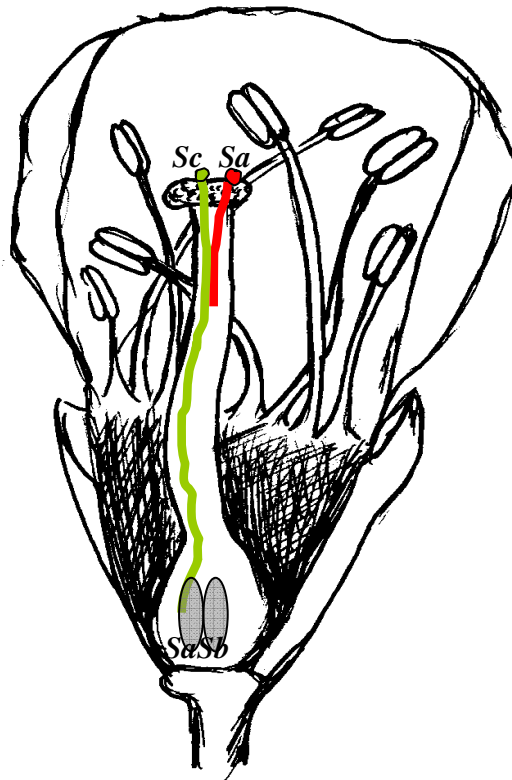


Figura 1.6. Esquema del crecimiento de tubos polínicos en reacción compatible (verde) e incompatible (rojo).



En el género *Prunus*, el determinante *S* del pistilo es una ribonucleasa, *SRNasa* (Tao *et al.*, 1997, 1999), que inhibe el crecimiento del tubo polínico mediante la degradación del ARN (McCubbin y Kao, 2000). El determinante del polen es una proteína con una caja-F, denominada *SFB* (*S*-haplotype-specific *F*-box gen) (Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003), que podría estar involucrada en un proceso de degradación proteica (Ushijima *et al.*, 2003). La secuencia de la *SRNasa* en Rosáceas presenta cinco regiones muy conservadas C1-C3, RC4 y C5, (Ushijima *et al.*, 1998), una única región hipervariable (RHV) (Ioerger *et al.*, 1991) y dos intrones. El tamaño de los intrones varía para cada alelo. El gen de la *SRNasa* en el género *Prunus* fue inicialmente clonado y caracterizado en almendro (Tao *et al.*, 1997), lo cual permitió más tarde que fuera identificado en cerezo (Tao *et al.*, 1999), ciruelo japonés (Yamane *et al.*, 1999), albaricoquero japonés (*Prunus mume*) (Yaegaki *et al.*, 2001) y guindo (*Prunus cerasus*) (Yamane *et al.*, 2001). Actualmente, se han clonado y caracterizado más de 100 secuencias de *SRNasa* de diferentes alelos de especies del género *Prunus*.

El gen del determinante *S* del polen en Rosáceas fue descubierto varios años después del de la *SRNasa*. El factor determinante del polen se describió por primera vez en Platanáceas (Lai *et al.*, 2002), posteriormente fue identificado en Rosáceas (Ushijima *et al.*, 2003) y más tarde fue confirmado en Solanáceas (Sijacic *et al.*, 2004). La estructura de *SFB* en Rosáceas presenta un único intrón de poca variabilidad en la región no traducida del extremo 5', dos regiones variables (V1 y V2) y dos hipervariables (HVa y HVb) (Ikeda *et al.*, 2004). Se han propuesto varios modelos bioquímicos para explicar el modo de interacción entre los productos de la *SRNasa* y el *SFB*, aunque el proceso de esa interacción no se conoce todavía con certeza (Tao e Iezzoni, 2010).

*Prunus salicina* Lindl. se considera autoincompatible (Ramming y Cociu, 1990), aunque este carácter no se ha estudiado en la mayoría de cultivares (Okie y Weinberger, 1996). La caracterización molecular de las *SRNasas* de ciruelo japonés (Yamane *et al.*, 1999) permitió desarrollar técnicas de PCR para la detección de alelos *S* en la especie (Beppu *et al.*, 2002, 2003). El primer cultivar en que se caracterizaron las *SRNasas* fue 'Sordum' (Yamane *et al.*, 1999), y posteriormente se han identificado los alelos *S* en diferentes cultivares. Hasta el momento se han descrito 31 alelos *S* en cultivares de ciruelo japonés, 14 de ellos nombrados alfabéticamente, *Sa* a *Sn*,

## Introducción general

(Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003) y el resto de forma numérica ( $S_7$ ,  $S_8$ ,  $S_{10}$ ,  $S_{11}$  y del  $S_{15}$  al  $S_{27}$ ) (Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). También se ha descrito la correspondencia entre algunos de los alelos en ambas nomenclaturas (Halász *et al.*, 2007). Estos estudios han permitido agrupar los cultivares en siete grupos de incompatibilidad (I-VII) además de un grupo 0 donante universal (Halász *et al.*, 2007).

Los siete primeros alelos de *SFB* descritos en ciruelo japonés (*SFBb*, *SFBc*, *SFBd*, *SFBf*, *SFBg*, *SFBh* y *SFBk*) fueron clonados y secuenciados por Sapir *et al.* (2007). En un trabajo simultáneo en cultivares distintos, Zhang *et al.*, (2007) secuenciaron diez alelos, incluyendo los siete anteriores y otros tres nuevos (*PsSFBa*, *PsSFB7* y *PsSFB10*). Los mismos alelos de *SFB* descritos anteriormente (Sapir *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007), excepto el *SFBg*, también han sido identificados por Kitashiba *et al.* (2008) usando otro método basado en hibridación ('Dot-blot').

Aunque el ciruelo japonés es autoincompatible, también se han descrito cultivares autocompatibles (Ramming y Cociu, 1990). La autocompatibilidad ha sido correlacionada con la presencia del alelo *Se* en los cultivares Beauty, Rio y Late Santa Rosa (Beppu *et al.*, 2005). En el cultivar Santa Rosa, que había sido descrito como autocompatible previamente (Crane y Lawrence, 1929), también ha sido detectada la presencia de *Se* (Beppu *et al.*, 2005). El carácter de autocompatibilidad conferido por la presencia de este alelo *Se* se ha correlacionado con una baja acumulación de *SRNasa* debido a su bajo nivel de transcripción (Watari *et al.*, 2007), y se ha comprobado en algunas progenies descendientes de cruces de los cultivares Beauty, Rio, Santa Rosa, Sordum y White Plum, donde la cosegregación de este alelo se ha relacionado con la autocompatibilidad (Beppu *et al.*, 2010b).

El método molecular más usado en la identificación de alelos *S* para determinar la compatibilidad entre cultivares de ciruelo japonés ha sido la amplificación mediante PCR de los intrones de la *SRNasa*. Para ello se han utilizado diferentes combinaciones de cebadores complementarios a zonas conservadas de los exones (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003, 2010b; Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Después de la amplificación, la determinación de los alelos se realiza mediante la correlación de los tamaños de los fragmentos amplificados con los diferentes alelos. También se han usado métodos que utilizan

cebadores específicos para cada alelo (Sapir *et al.*, 2004, 2008b; Halász *et al.*, 2007). Trabajos y metodologías similares han sido utilizados en otras especies del género *Prunus*, como almendro (Tamura *et al.*, 2000) o cerezo (Tao *et al.*, 1999), con el objetivo de identificar los diferentes alelos *S* de cada especie.

El uso de marcadores moleculares en la determinación de la compatibilidad entre cultivares se presenta como un mecanismo de gran interés para la elección de cultivares polinizadores compatibles sin necesidad de realizar cruces, con la consiguiente agilización del proceso. Esto supone una información muy valiosa para la elección de cultivares polinizadores en el establecimiento de nuevas plantaciones así como en la subsanación de errores en plantaciones ya establecidas.

## 1.5. PROBLEMÁTICA Y NECESIDADES DEL CULTIVO

A pesar de la gran importancia que ha alcanzado el cultivo del ciruelo japonés, en ocasiones muchos cultivares sufren grandes oscilaciones en el cuajado de un año a otro que repercuten negativamente en la cosecha por causas que no están bien establecidas (Okie y Weinberger, 1996; Hartmann y Neumüller, 2009). El cuajado en frutales de hueso se ve afectado por factores climáticos adversos durante la floración (Stephenson *et al.*, 1992; Delph *et al.*, 1997; Hedhly *et al.*, 2004), incluyendo las heladas primaverales (Rodrigo, 2000), las temperaturas previas (Rodrigo y Herrero, 2002b) y posteriores a la antesis (Hedhly *et al.*, 2007), y la lluvia (Ortega *et al.*, 2007). La polinización es determinante en el establecimiento del cuajado, necesiándose durante la floración suficientes insectos polinizadores para transportar el polen hasta el estigma de las flores y la presencia de polen compatible y viable que coincida con un estado adecuado de desarrollo del óvulo (Herrero y Arbeloa, 1989; Herrero, 1992, 2000, 2001). Sin embargo, las condiciones de cultivo y la estructura varietal del ciruelo japonés son muy diferentes en cada país (Ramming y Cociu, 1990), y es difícil determinar hasta qué punto los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en algunas situaciones de cultivo son provocados por problemas de polinización, ya que muchos otros factores intervienen en el establecimiento del cuajado.

A diferencia de otros frutales de hueso, el ciruelo japonés tiene pocas necesidades de frío invernal para florecer, aunque existen cultivares más exigentes

## *Introducción general*

que pueden tener problemas de floración en zonas con poco frío invernal (Okie, 2008). Las bajas temperaturas durante y a la salida del reposo son uno de los principales condicionantes de la especie, ya que su floración temprana la hace susceptible a las heladas primaverales en muchas zonas de cultivo (Okie y Hancock, 2008). Los factores involucrados en la polinización han sido relacionados con el cuajado en diversos cultivares y situaciones de cultivo en los últimos años (Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008a, b). La época de floración es determinante en el correcto diseño de una plantación, de manera que cada cultivar debe coincidir en floración con los posibles cultivares polinizadores (Dorsey, 1919). La época de floración puede presentar variaciones entre cultivares diferentes, pero también puede cambiar de un año a otro e incluso entre distintas zonas de cultivo (Hartmann y Neumüller, 2009). Igualmente, la incompatibilidad polen-pistilo entre cultivares pueden tener una gran influencia en la cosecha (Ramming y Cociu, 1990). Sin embargo, no se dispone de mucha información sobre las necesidades de polinización de los cultivares (Okie y Hancock, 2008). La elección de cultivares polinizadores se ha venido realizando tradicionalmente teniendo en cuenta únicamente la coincidencia en floración entre cultivares, lo que en muchos casos no ha solucionado las oscilaciones de cuajado. La determinación de la auto(in)compatibilidad de cada cultivar y de las relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares podría aclarar la influencia de la polinización y de la incompatibilidad polen-pistilo en los problemas de cuajado.

En este trabajo se plantea el estudio de la influencia de la polinización en el cuajado en ciruelo japonés. Para ello se ha caracterizado el proceso de polinización y cuajado en los principales cultivares. Por un lado, se ha determinado la auto(in)compatibilidad de cada cultivar y las relaciones de (in)compatibilidad entre los cultivares, y por otro, se ha analizado el proceso de desarrollo de los óvulos en relación con el establecimiento del cuajado.

## **1.6. OBJETIVOS**

El objetivo de esta tesis es el estudio de las causas que provocan falta de cuajado en algunos cultivares de ciruelo japonés. Para ello, se ha analizado el proceso de polinización y cuajado de frutos en campo, la incompatibilidad polen-pistilo y el desarrollo de los óvulos. El trabajo se ha desglosado en tres objetivos principales:

### **Objetivo 1. Polinización y cuajado.**

Valoración de la influencia de la polinización en el cuajado, caracterizando el proceso de caída de flores y frutos en desarrollo y determinando la auto(in)compatibilidad de los principales cultivares y sus necesidades de polinización (Capítulos 2 y 3).

### **Objetivo 2. Incompatibilidad polen-pistilo.**

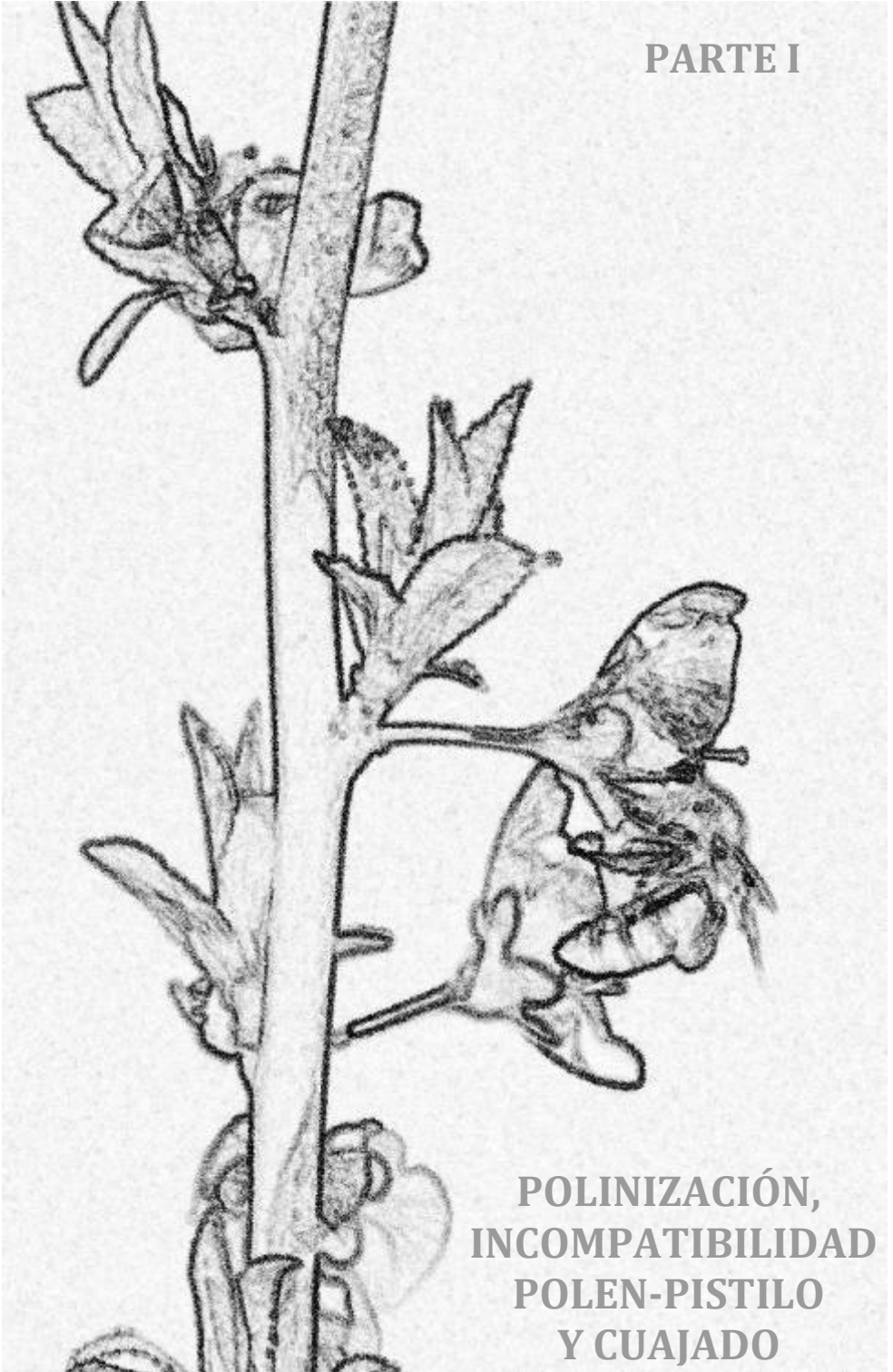
Caracterización de la (in)compatibilidad polen-pistilo entre cultivares de ciruelo japonés y asignación a sus correspondientes grupos de incompatibilidad mediante la observación al microscopio del crecimiento de tubos polínicos en cruzamientos controlados (Capítulos 3 y 4) y mediante la determinación de los alelos *S* de incompatibilidad con técnicas moleculares (Capítulos 4 y 5).

### **Objetivo 3. Desarrollo de óvulos.**

Caracterización del desarrollo de óvulos para determinar su influencia en la falta de cuajado, mediante la observación al microscopio de flores de cultivares con problemas de producción y en cruces sometidos a diferentes tratamientos de polinización en campo (Capítulos 6 y 7).



**PARTE I**



**POLINIZACIÓN,  
INCOMPATIBILIDAD  
POLEN-PISTILO  
Y CUAJADO**





## 2. LA POLINIZACIÓN COMO CONDICIONANTE DEL CUAJADO EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS

### RESUMEN

En algunos cultivares de ciruelo japonés se produce una caída masiva de flores y se obtienen porcentajes de cuajado muy bajos por causas que no están bien establecidas. Esta situación repercute negativamente en la cosecha y provoca grandes oscilaciones en la producción de un año a otro. La polinización como causa de falta de cuajado no se ha considerado tradicionalmente en la especie, aunque se conocen algunos cultivares androestériles. Para estudiar si los bajos porcentajes de cuajado están provocados por problemas de polinización, en este trabajo se han realizado ensayos de polinización y cuajado en los 12 principales cultivares de ciruelo japonés cultivados en España en la actualidad. Los ensayos se han realizado en condiciones reales de cultivo en plantaciones comerciales situadas en dos de las principales zonas de cultivo a nivel nacional, Extremadura y Aragón. En cada plantación se han realizado ensayos de polinización libre, autopolinización y polinización cruzada, en los que se ha determinado el porcentaje de cuajado de frutos y se ha caracterizado la curva de caída de flores y frutos en desarrollo hasta la maduración. Se ha evaluado la presencia de insectos polinizadores y la viabilidad del polen utilizado mediante la observación de la germinación del polen *in vitro* y en los estigmas de las flores de cada ensayo. Los resultados mostraron una clara influencia de la polinización en el cuajado, ya que en todos los ensayos de polinización controlada se obtuvo un cuajado significativamente mayor que en polinización libre o bien no se obtuvo cuajado. La observación de la germinación del polen al microscopio ha permitido descartar la ausencia de insectos polinizadores y la falta de viabilidad del polen como las causas responsables de la falta de cuajado en las plantaciones estudiadas. En la mayoría de cultivares no se obtuvo cuajado en flores autopolinizadas, y en los cruces el cuajado varió considerablemente dependiendo del cultivar polinizador, lo que apunta a que la falta de cuajado observada en determinados años y plantaciones en los cultivares analizados esté causada por problemas de autoincompatibilidad de los cultivares y de incompatibilidad polen-pistilo entre algunos de ellos.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) es una especie con pocas necesidades de frío y muy sensible a las heladas primaverales (Hartmann y Neumüller, 2009). Se cultiva en zonas templadas de todo el mundo, principalmente en China, Estados Unidos, Chile, España y Francia (FAOSTAT, 2011). La producción mundial ha aumentado en las últimas décadas (Okie y Hancock, 2008; Hartmann y Neumüller, 2009) y en la actualidad se está produciendo una importante renovación varietal en muchas zonas de cultivo, con la introducción de nuevos cultivares procedentes de distintos programas de mejora (Okie y Ramming, 1999; Okie y Hancock, 2008). Desde sus comienzos en el s. XIX, los programas de mejora de ciruelo japonés han generado un elevado número de cultivares. Los *P. salicina* originales introducidos en California desde Japón (Faust y Surányi, 1999) se hibridaron con otros ciruelos diploides, por lo que los cultivares utilizados en la actualidad no son *P. salicina* puros, sino una mezcla de híbridos de diferentes especies de ciruelos diploides del género *Prunus* (Byrne, 1989; Faust y Surányi, 1999; Okie, 2006).

El ciruelo japonés produce una cantidad de flores considerablemente mayor que otros *Prunus* (Okie, 2006; Hartmann y Neumüller, 2009). Sin embargo, en algunos cultivares se produce una caída masiva de flores y se obtienen muy bajos porcentajes de cuajado por causas que no están bien establecidas (Okie y Weinberger, 1996; Hartmann y Neumüller, 2009). Esta situación repercute negativamente en la cosecha y provoca grandes oscilaciones de producción de un año a otro en muchos cultivares (Okie y Weinberger, 1996; Calzoni y Speranza, 1998). La polinización como causa de falta de cuajado no se ha considerado tradicionalmente en ciruelo japonés, aunque se han descrito algunos cultivares androestériles (Herrero y Salvador, 1980; Ramming, 1995; González, 2002). Aunque se desconocen las causas que provocan la falta de cuajado, en los últimos años se ha relacionado la polinización con problemas de cuajado en algunos cultivares y situaciones de cultivo (González, 2002; Vidiella, 2002; Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008a, b). Sin embargo, es difícil determinar hasta qué punto los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en condiciones de cultivo son provocados por problemas de polinización, ya que muchos otros factores tanto externos como internos intervienen en el establecimiento del cuajado.

En la actualidad, los cultivares más cultivados a nivel nacional son Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star y Friar, dentro de las ciruelas de piel negra; Earliqueen, Fortune y Larry Ann, de piel roja, y Golden Globe, Golden Japan y Songold, de piel amarilla (Agroseguro S.A., comunicación personal). A pesar de la importancia económica que han alcanzado estos cultivares, en ocasiones presentan bajas producciones asociadas a falta de cuajado por causas que no están bien establecidas.

Para estudiar la influencia de la polinización en los bajos porcentajes de cuajado, en este trabajo se han realizado ensayos de polinización y cuajado en los 12 cultivares más cultivados en España en la actualidad en diferentes plantaciones comerciales con historiales de cuajados erráticos de dos de las principales zonas de cultivo, Extremadura y Aragón.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 *Material vegetal***

En este trabajo se ha estudiado el cuajado en 12 cultivares de ciruelo japonés en nueve plantaciones comerciales con historiales de cuajados erráticos, cinco de ellas localizadas en Extremadura y cuatro en Aragón. Los cultivares estudiados son Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star y Friar, de piel negra; Earliqueen, Fortune y Larry Ann, de piel roja, y Golden Globe, Golden Japan y Songold, de piel amarilla (Tabla 2.2). Además se han utilizado como polinizadores de los cultivares analizados un total de 16 cultivares localizados en las diferentes plantaciones que coincidieron en floración con alguno de los cultivares estudiados. Los ensayos se realizaron entre 2007 y 2010 (Tabla 2.2). Para evaluar la influencia de la zona de cultivo en el cuajado, tres de estos 12 cultivares (Angeleno, Larry Ann y Songold) se evaluaron simultáneamente en dos plantaciones de Extremadura y Aragón en los dos primeros años (2007 y 2008) (Tabla 2.2).

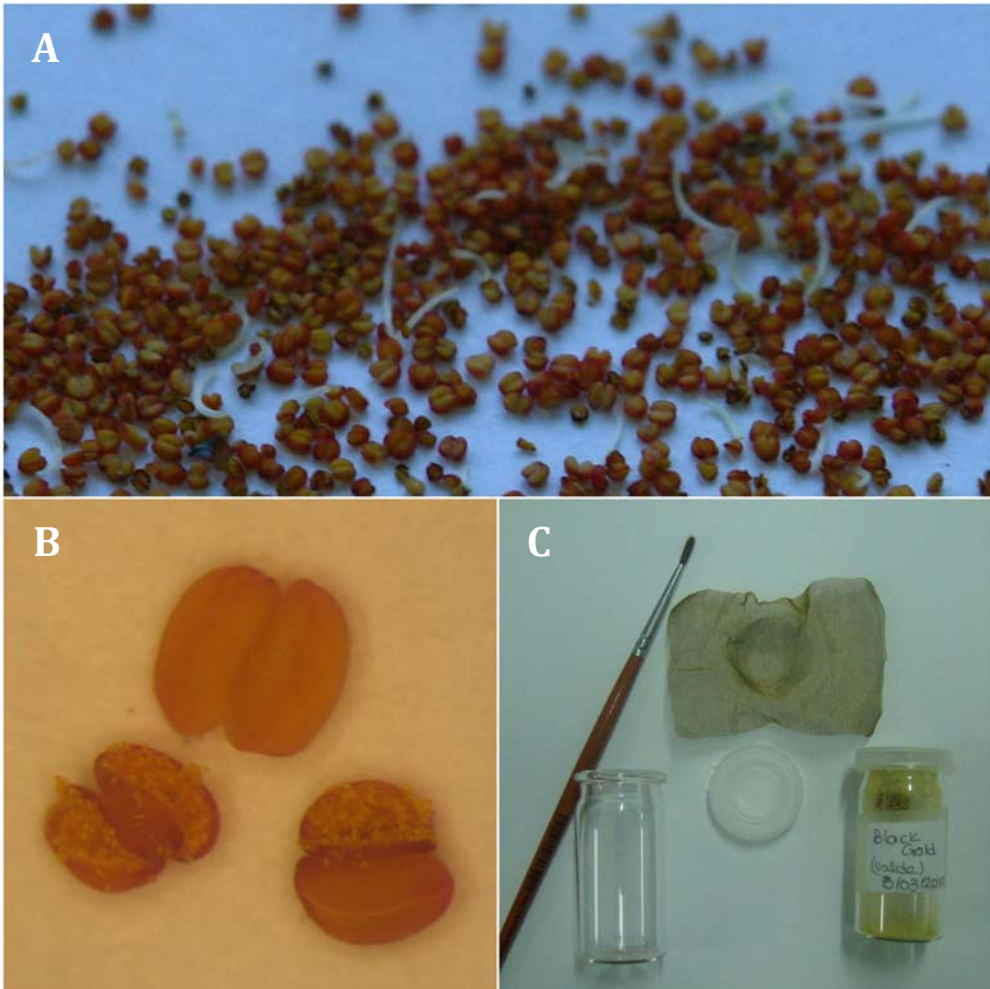
### **2.2.2 Polinización y cuajado en campo**

En cada plantación se eligieron al azar tres árboles de cada cultivar, en los que se seleccionaron y marcaron ramas. En un grupo de ramas se dejaron las flores a polinización libre como control. En las otras ramas seleccionadas se realizaron diferentes tratamientos de polinización: autopolinización y polinización cruzada con uno o dos cultivares presentes en la misma plantación y coincidentes en floración. En cada cultivar y tratamiento, las flores de las ramas seleccionadas fueron polinizadas manualmente; con polen del propio cultivar en las autopolinizaciones y con polen de uno o dos cultivares en las polinizaciones cruzadas (Tabla 2.2). En todos los casos, los tratamientos se realizaron sobre árboles adultos, salvo en el caso de ‘Songold’ en la plantación de Aragón en 2007, en la que los árboles estaban en el tercer verde.

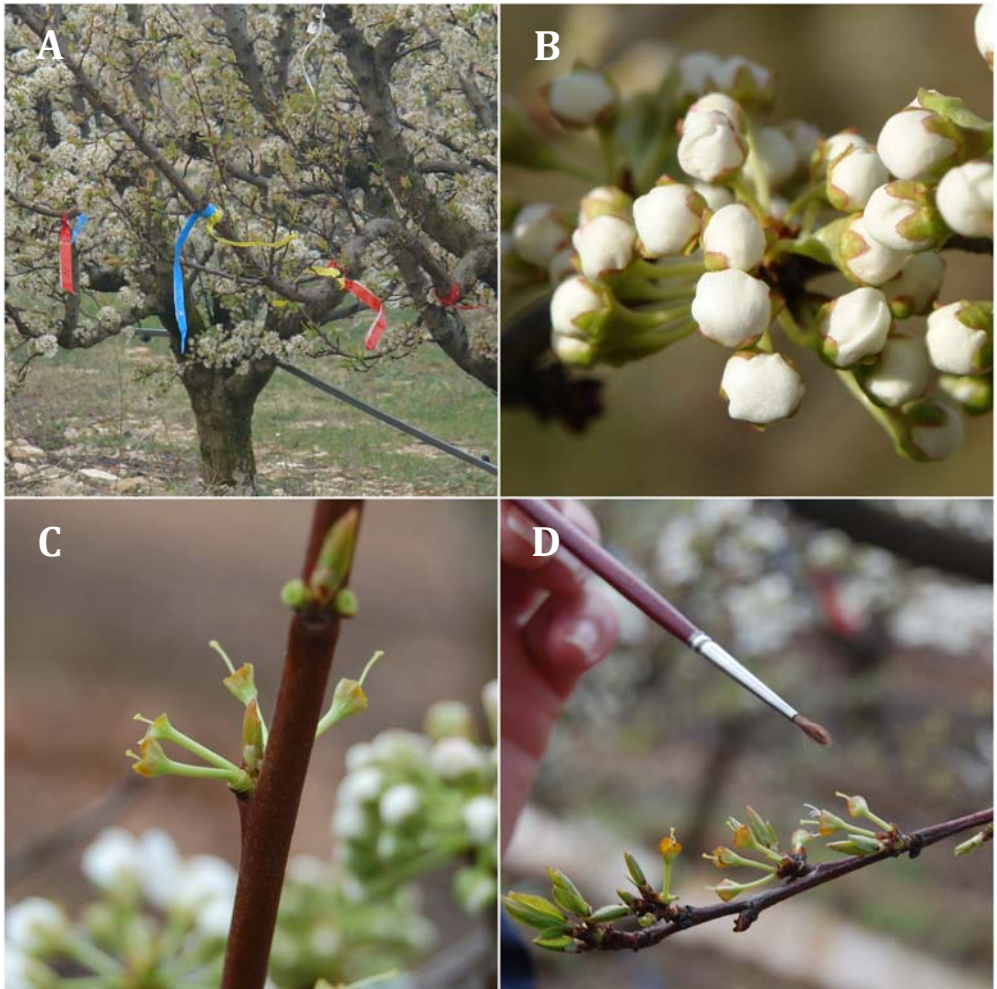
El polen utilizado en cada tratamiento se obtuvo de yemas en estado de botón globoso, de las que se separaron las anteras, todavía sin dehisir, de sus filamentos y se extendieron sobre bandejas de papel (Fig. 2.1A) a temperatura ambiente durante 24-48 h hasta su dehiscencia (Fig. 2.1B). A continuación se coló el polen usando una malla de 0,26 mm de luz, y se congeló a -20°C hasta su uso (Fig. 2.1C). Para realizar los distintos tratamientos de polinización controlada, se establecieron distintas poblaciones de flores (Fig. 2.2A). Para ello, se seleccionaron ramas en las que únicamente se dejaron yemas en estado de botón globoso, eliminando las flores abiertas y las yemas más atrasadas (Fig. 2.2B). A continuación se emascularon las yemas, eliminando anteras y pétalos y dejando únicamente el pistilo (Fig. 2.2C), con el fin de evitar la llegada de insectos polinizadores y así poder controlar la polinización (Free, 1964). Se emascularon entre 246 y 550 flores para las autopolinizaciones y entre 206 y 559 para los ensayos de cruces entre cultivares (Tabla 2.2). Transcurridas 24 h desde la emasculación, y tras mantener a temperatura ambiente durante unos minutos el polen previamente congelado, se polinizaron las flores emasculadas. Para obtener una distribución uniforme del polen en la superficie del estigma, la polinización se realizó con la ayuda de un pincel (Fig. 2.2D).

Ya que la emasculación de flores se ha relacionado con la falta de cuajado en algunos cultivares (Capítulo 7), los ensayos de 2009 y 2010 se realizaron mediante polinización suplementaria de flores no emasculadas (Williams, 1970*a*). Para evitar la

llegada de insectos polinizadores, dos árboles de cada cultivar se cubrieron con cabinas de malla de 0,8 mm de luz antes de la floración (Fig. 2.3A). En el interior de las cabinas se establecieron las diferentes poblaciones de flores (Fig. 2.3B), que fueron polinizadas mediante polinización suplementaria en días alternos hasta la apertura de todas las flores (Rodrigo y Herrero, 2002a). La polinización suplementaria en las autopolinizaciones consistió en polinizar por medio de un pincel limpio las flores el día de su antesis con el polen de sus propias anteras, mientras que en los cruces se usó el polen previamente obtenido (Fig. 2.3C). En las autopolinizaciones se utilizaron entre 1016 y 1763 flores en cada cultivar y en las polinizaciones cruzadas entre 121 y 1626 flores (Tabla 2.2). En ramas seleccionadas de un tercer árbol de cada cultivar sin cubrir con malla, se dejaron entre 532 y 1831 flores a polinización libre que se utilizaron como control.



**Figura 2.1.** Obtención de polen. Anteras depositadas sobre una bandeja de papel (A). Anteras antes (arriba), durante (derecha) y después de dehisir (izquierda) (B). Pincel, malla y frasco utilizados para el colado y almacenamiento de polen (C).



**Figura 2.2.** Ensayos de polinización en campo realizados mediante emasculación de flores. Establecimiento de poblaciones de flores (A). Yemas en estado de botón globoso (B). Flores emasculadas (C). Polinización de flores emasculadas (D).



**Figura 2.3.** Ensayos de polinización en campo realizados mediante polinización suplementaria de flores sin emasculación bajo malla. Árboles cubiertos con malla para evitar la llegada de insectos polinizadores (A). Establecimiento de poblaciones de flores (B). Polinización suplementaria de flores sin emasculación (C).



Con el fin de caracterizar la caída de flores y frutos en desarrollo, en cada ensayo se realizaron conteos semanales de flores desde la antesis hasta la maduración de los frutos. Los conteos se realizaron dos veces en cada rama, tomando la media de los dos valores como válida cuando la diferencia entre ambos no fue superior al 10% y realizando un tercer conteo cuando la diferencia entre los conteos fue superior al 10% (Williams, 1970a). Con los datos de cada día de conteo se calculó el porcentaje de frutos presentes en el árbol respecto al número inicial de flores. Para determinar el momento en que se produce el mayor porcentaje de frutos caídos, se calculó la caída relativa, que se expresó como el porcentaje de frutos caídos cada semana respecto al número inicial de flores (Rodrigo y Herrero, 2002b).

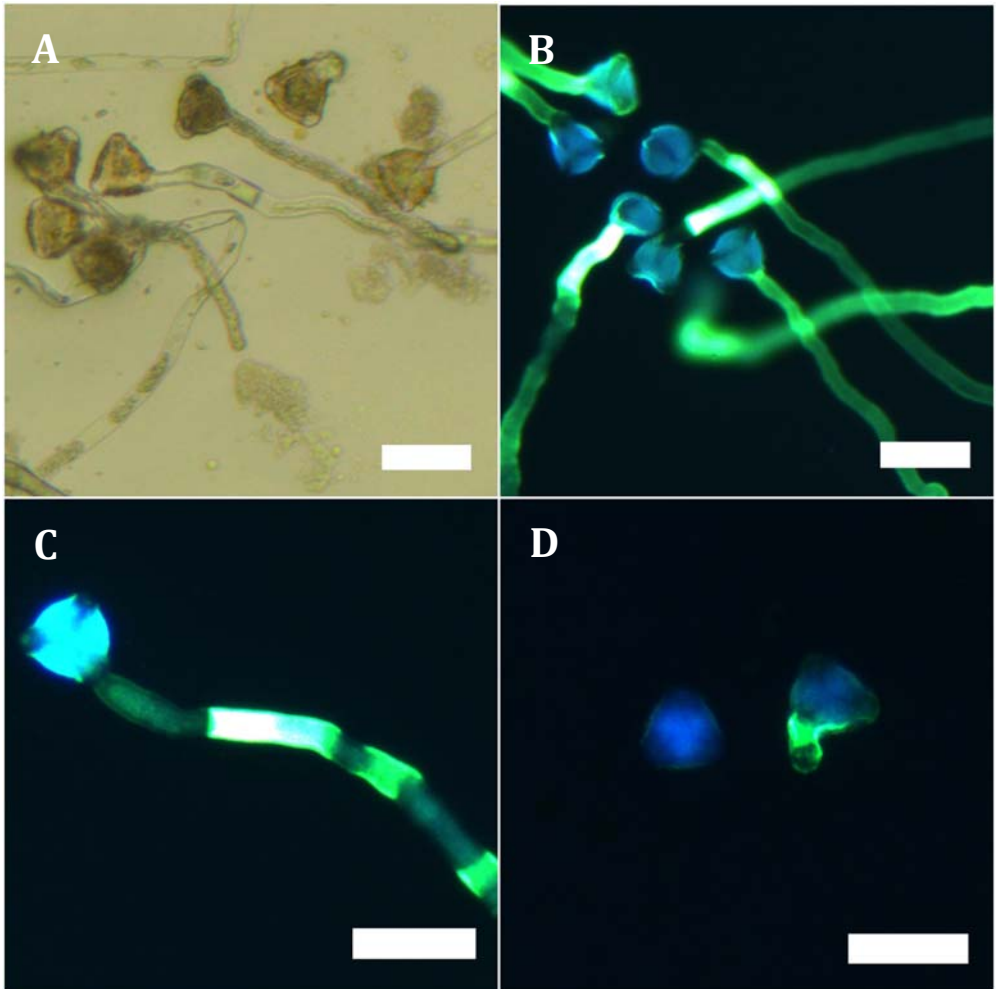
### **2.2.3 Preparación del material para el microscopio**

Para determinar si la polinización había sido realizada adecuadamente, tanto por los insectos polinizadores en los ensayos de polinización libre como en la polinización manual en el resto de ensayos, se seleccionó un grupo de ramas de cada tratamiento en las que se recogieron entre 40 y 50 flores cuatro días después de la polinización. Los pistilos de estas flores se fijaron en FAA [etanol (70%) : ácido acético : formaldehído (18:1:1)] (Johansen, 1940) en 2007 y 2008, y en etanol : ácido acético (3:1) (Williams *et al.*, 1999) en 2009 y 2010. Para la preparación del material para el microscopio, los pistilos se lavaron tres veces a intervalos de una hora con agua destilada, con un lavado final con sulfito sódico al 5% (p/v) a 4°C durante 24 h. Al día siguiente, los pistilos se autoclavaron durante 8 min a 1 kg/cm<sup>2</sup> en sulfito sódico al 5% para ablandar los tejidos (Jefferies y Belcher, 1974) y se tiñeron con azul de anilina al 0,1% en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N (v/v) para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957). El material teñido se montó mediante aplastamiento entre portaobjetos y cubreobjetos (*squash*) de los estigmas y los estilos (Rodrigo *et al.*, 2009). A continuación se observó la presencia de granos de polen en la superficie estigmática, determinando el porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma.

Ya que en los primeros años de ensayos se obtuvo un porcentaje de cuajado menor de lo esperado en algunos cruces, en 2009 y 2010 se analizó la viabilidad del polen de algunos cultivares para determinar su posible influencia en el cuajado. Para

ello, el mismo polen utilizado en las polinizaciones se sembró en placas de Petri de 60 x 10 mm con 3 ml de medio sólido de germinación [0,3 M de azúcar, 0,6mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1,6 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 0,8% de agar (Hormaza *et al.*, 1996)]. Se dejó germinar el polen durante 24 h a 20°C y se almacenó a -20°C para detener la germinación. Las placas se descongelaron durante 24 h a 4°C y se observaron mediante microscopía de campo claro (Fig. 2.4A); para facilitar la observación de la germinación del polen, las placas también se tiñeron con azul de anilina al 1% (v/v) en  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0,1 N, para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957) durante cinco minutos y se observaron con microscopía de fluorescencia (Fig. 2.4B). La viabilidad del polen se estimó mediante el conteo de granos de polen en tres campos de 1 cm<sup>2</sup> cada uno en dos placas por cada cultivar. En cada campo se contaron al menos 100 granos de polen, que se consideraron germinados cuando el tamaño del tubo polínico fue mayor o igual al diámetro del grano de polen (Fig. 2.4C), y no germinados cuando no presentaban tubo polínico o éste era menor que su diámetro (Fig. 2.4D). Posteriormente se calculó el porcentaje de germinación de cada cultivar mediante la media de las 6 medidas de cada cultivar (Tabla 2.3).

La germinación de los granos de polen se observó en un microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania) que se usó con luz normal para las placas de viabilidad de polen sin teñir, y con luz UV epifluorescente con un filtro excitador BP 340-390 y un filtro de barrera LP 425 para las tinciones con azul de anilina.



**Figura 2.4.** Granos de polen germinando en medio de cultivo *in vitro*. Granos de polen sin teñir observados al microscopio de campo claro (A). Granos de polen teñidos con azul de anilina observados al microscopio con luz ultravioleta (B). Grano de polen germinado con el tubo polínico mayor que su diámetro (C). Grano de polen sin germinar (izquierda) y grano de polen germinado con tubo polínico menor que su diámetro (derecha) (D). Barras: 50 $\mu$ m.

### **2.2.4 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para analizar los porcentajes de germinación de polen in vitro de cada cultivar, previa transformación del arcoseno de la raíz cuadrada. Cuando el ANOVA generó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), las medias se compararon con el test de Duncan.

Se utilizó la prueba Chi-cuadrado de Pearson sobre tablas de contingencia para el análisis de los porcentajes de frutos cuajados y de pistilos con granos de polen geminados en el estigma entre los diferentes tratamientos de polinización de cada cultivar. Cuando la prueba Chi-cuadrado de Pearson generó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos de cada cultivar, los valores se analizaron con tablas de contingencia 2x2, utilizando la prueba Chi-cuadrado con la corrección de Yates o el estadístico exacto de Fisher, según los casos.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1 Cuajados en campo**

Dentro de cada cultivar, los porcentajes de cuajado de los diferentes tratamientos de polinización y de polinización libre presentaron diferencias significativas (Tabla 2.1). El cuajado obtenido en las ramas dejadas a polinización libre en los diferentes cultivares, años y plantaciones osciló entre 0,5 y 5,7 % (Tabla 2.2). En los ensayos de autopolinización no se obtuvo cuajado en 11 de los 12 cultivares: Songold, Larry Ann, Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Fortune, Earliqueen, Golden Globe, Black Star, Golden Japan y Black Gold (Fig. 2.5A-N), pero sí en Friar (2%) (Fig. 2.5O). Cinco de los 27 cruces realizados ('Angeleno' x 'Larry Ann' en Aragón; 'Blackamber' x 'Fortune'; 'Black Gold' x 'Black Diamond'; 'Golden Globe' x 'Fortune'; 'Larry Ann' x 'Nubiana' en Extremadura) no presentaron cuajado o éste fue muy bajo. En los otros 22 cruces se obtuvo un porcentaje variable de cuajado que osciló entre 1,3 y 11,5 % (Tabla 2.2).

**Tabla 2.1.** Prueba Chi-cuadrado de Pearson sobre tablas de contingencia para el análisis de los porcentajes de frutos cuajados y de pistilos con granos de polen geminados en el estigma entre los diferentes tratamientos de polinización de cada cultivar.

Año	Cultivar	Cuajado (%)				Pistilos con granos de polen germinados (%)			
		N	g.l.	$\chi^2$	P	N	g.l.	$\chi^2$	P
2007	Blackamber	1312	3	34,347	<0,001	20	3	*	*
	Songold (Aragón)	1535	3	14,736	0,002	19	3	*	*
	Songold (Extremadura)	2163	3	49,377	<0,001	20	3	2,937	0,402
2008	Angeleno (Aragón)	2654	2	46,881	<0,001	16	2	2,809	0,246
	Larry Ann (Aragón)	2781	3	10,256	0,017	31	3	3,655	0,301
	Angeleno (Extremadura)	2636	2	53,406	<0,001	18	2	*	*
	Larry Ann (Extremadura)	3146	3	85,309	<0,001	22	3	3,132	0,372
2009	Black Diamond	3902	2	63,87	<0,001	27	2	1,935	0,38
	Fortune	3047	3	45,134	<0,001	32	3	*	*
	Golden Globe	5931	3	128,676	<0,001	40	3	6,547	0,088
	Earliqueen	4503	3	76,682	<0,001	40	3	5,873	0,118
2010	Friar	6177	3	110,615	<0,001	49	3	7,177	0,066
	Golden Japan	6570	3	338,04	<0,001	55	3	3,332	0,343
	Black Gold	6397	3	17,823	<0,001	37	3	8,075	0,044
	Black Star	6360	3	154,984	<0,001	44	3	2,942	0,41

\*No se calculó la Chi-cuadrado de Pearson porque los datos fueron constantes (100% de pistilos con granos de polen germinados en todos los tratamientos del cultivar).

El cuajado superó significativamente al obtenido en polinización libre en 14 de los cruces, mientras que en otros cuatro ('Earliqueen' x 'Ambra'; 'Friar' x 'Larry Ann'; 'Larry Ann' x 'Angeleno' en Aragón; 'Larry Ann' x 'Nubiana' en Aragón) los porcentajes fueron similares a los de polinización libre, y en dos casos ('Angeleno' x 'Larry Ann' y 'Songold' x 'Golden Plum', ambos en Extremadura) el cuajado obtenido en el cruce fue significativamente menor que el obtenido en la polinización libre (Tabla 2.1).

El establecimiento del cuajado definitivo tuvo una duración variable dependiendo del cultivar. Mientras que en la mayoría de cultivares la caída de flores y frutos en desarrollo se completó entre la quinta y séptima semana después de antesis [Angeleno (Aragón y Extremadura), Blackamber, Black Gold, Fortune, Friar, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann (Aragón y Extremadura), y Songold (Aragón y Extremadura)] (Fig. 2.6), en otros cultivares no se completó hasta dos o tres semanas más tarde, entre la octava y la décima semana después de antesis (Black Diamond, Black Star y Earliqueen) (Fig. 2.6H, J, L). En cada cultivar, las curvas de caída de polinización libre y de los distintos tratamientos de polinización presentaron el mismo patrón, completándose la caída de todas las poblaciones de flores en la misma semana, salvo en los cruces realizados sobre flores emasculadas de algunos cultivares [Angeleno (Aragón y Extremadura) y Larry Ann (Aragón)], en los que la caída se completó antes que en las flores dejadas a polinización libre.

La curva de caída de flores y frutos presentó en general dos picos principales de caída; en el primero se cayeron entre 30 y 70 % de las flores y frutos en desarrollo, y en el segundo entre 10 y 55%. Sin embargo, los picos de caída tuvieron lugar en momentos distintos dependiendo de los cultivares. En ocho cultivares [Angeleno (Extremadura), Blackamber, Fortune, Friar, Golden Globe, Larry Ann (Aragón y Extremadura) y Songold (Aragón)], la primera caída se produjo entre la segunda y tercera semana tras la antesis y la segunda entre la quinta y la sexta semana. Otros cinco cultivares [Angeleno (Aragón), Black Diamond, Black Gold, Black Star y

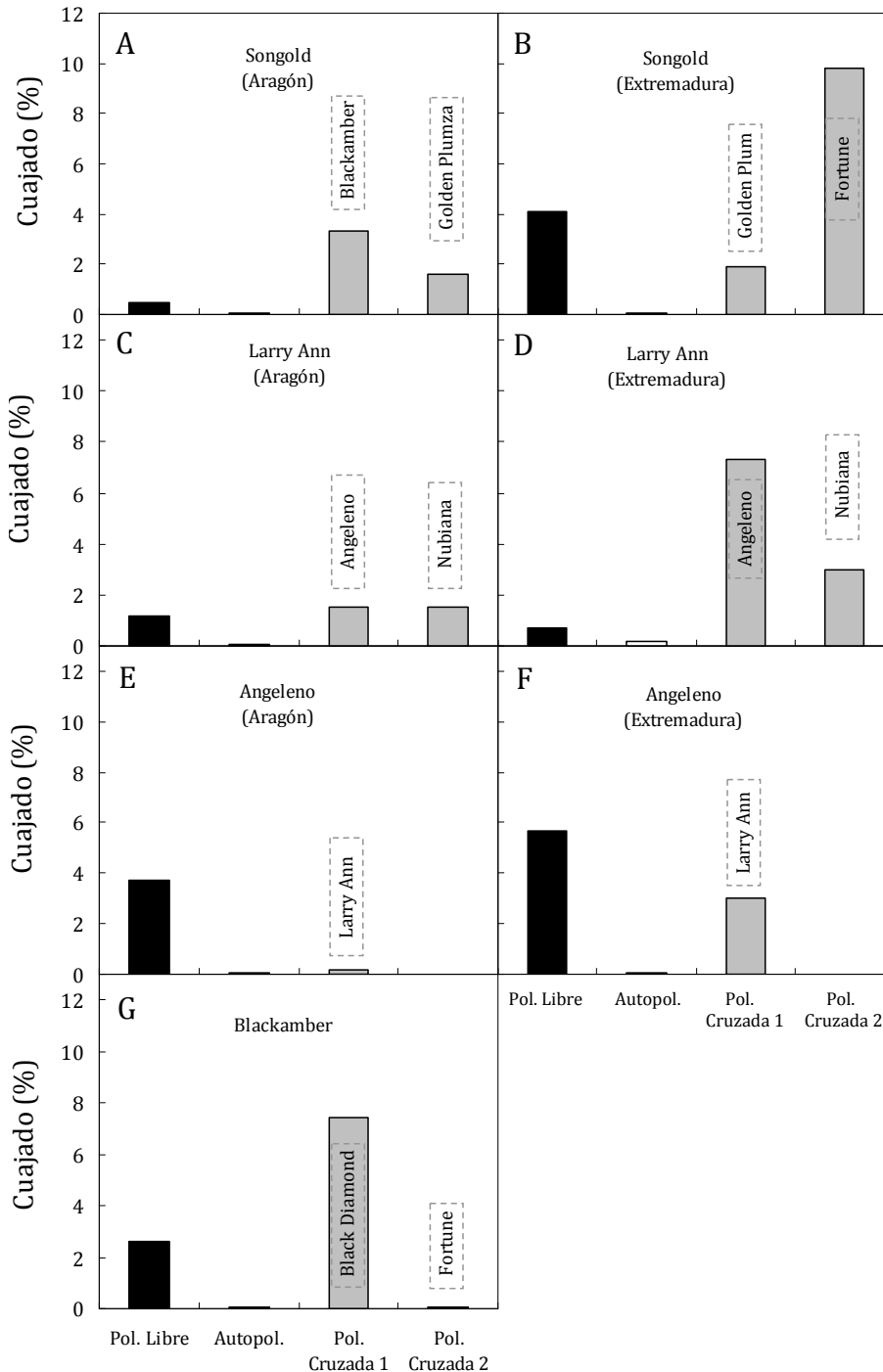
Earliqueen], también presentaron dos picos de caída, pero éstos tuvieron lugar varias semanas después: el primer pico entre la tercera y quinta semana tras la antesis y el segundo pico entre la séptima y la novena semana (Fig. 2.6). En los otros dos cultivares [Songold (Extremadura) (Fig. 2.6B) y Golden Japan (Fig. 2.6M)] la caída fue más homogénea durante las primeras semanas y sólo se observó un pico de caída entre la quinta y la séptima semana tras la antesis.

**Tabla 2.2.** Ensayos de polinización realizados sobre 12 cultivares de ciruelo japonés (2007-2010). Año de ensayo, localización de la plantación, cultivar analizado, tratamiento, número de flores, número de frutos, porcentaje de cuajado y porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma. E, emasculación; S, polinización suplementaria. Valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre los diferentes tratamientos de polinización de cada cultivar.

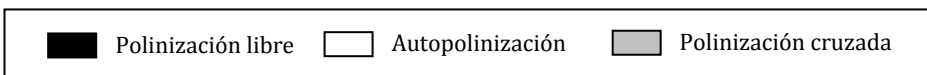
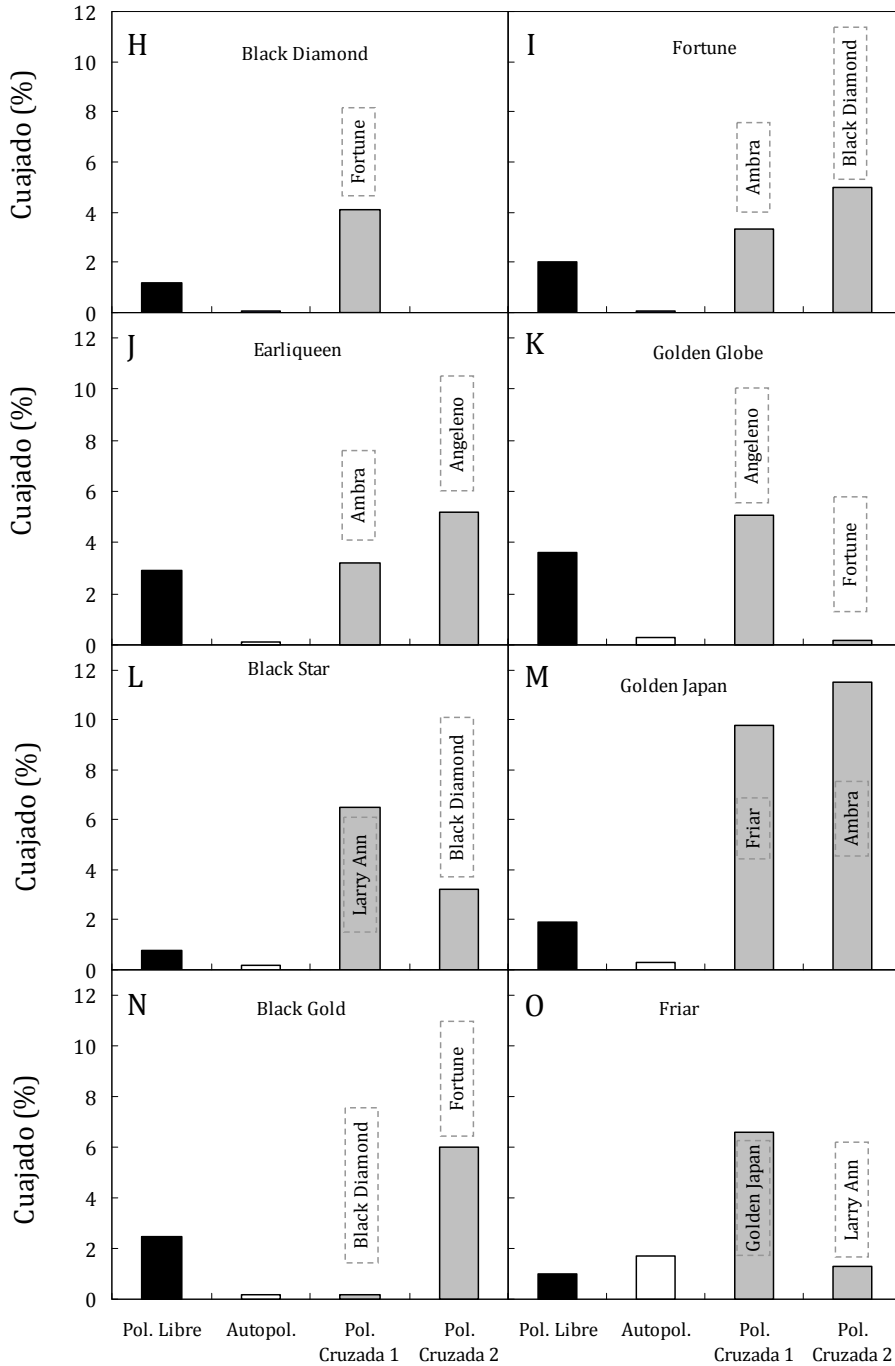
Año	Localización (Plantación) Cultivar Tratamiento	Flores (nº)	Frutos (nº)	Cuajado (%)	Pistilos con polen germinado (%)
2007	Aragón (Calatorao)				
	Blackamber				
	Polinización libre	532	14	2,6 a	100
	Autopolinización (E)	246	2	0,8 ac	100
	x Black Diamond (E)	285	21	7,4 b	100
	x Fortune (E)	249	0	0 c	100
	Songold				
	Polinización libre	579	3	0,5 a	100
	Autopolinización (E)	322	1	0,3 a	100
	x Blackamber (E)	332	11	3,3 b	100
	x Golden Plumza (E)	302	5	1,6 ab	100
	Extremadura (Valdivia)				
	Songold				
	Polinización libre	1020	42	4,1 a	100
	Autopolinización (E)	253	0	0 b	80
x Golden Plum (E)	555	11	1,9 c	100	
x Fortune (E)	335	33	9,8 a	100	
2008	Aragón (Albalate de Cinca)				
	Angeleno				
	Polinización libre	1778	66	3,7 a	57
	Autopolinización (E)	442	0	0 b	0
	x Larry Ann (E)	434	1	0,2 b	43
	Larry Ann				
	Polinización libre	1548	19	1,2 a	56
	Autopolinización (E)	413	0	0 b	86
	x Angeleno (E)	413	6	1,5 a	87
	x Nubiana (E)	407	6	1,5 a	57
	Extremadura (Guareña)				
	Angeleno				
	Polinización libre	1674	96	5,7 a	100
	Autopolinización (E)	499	0	0 b	100
	x Larry Ann (E)	463	14	3 c	100
Larry Ann					
Polinización libre	1664	12	0,7 a	100	
Autopolinización (E)	493	1	0,2 a	80	
x Angeleno (E)	488	36	7,3 b	100	
x Nubiana (E)	501	1	0,2 a	100	

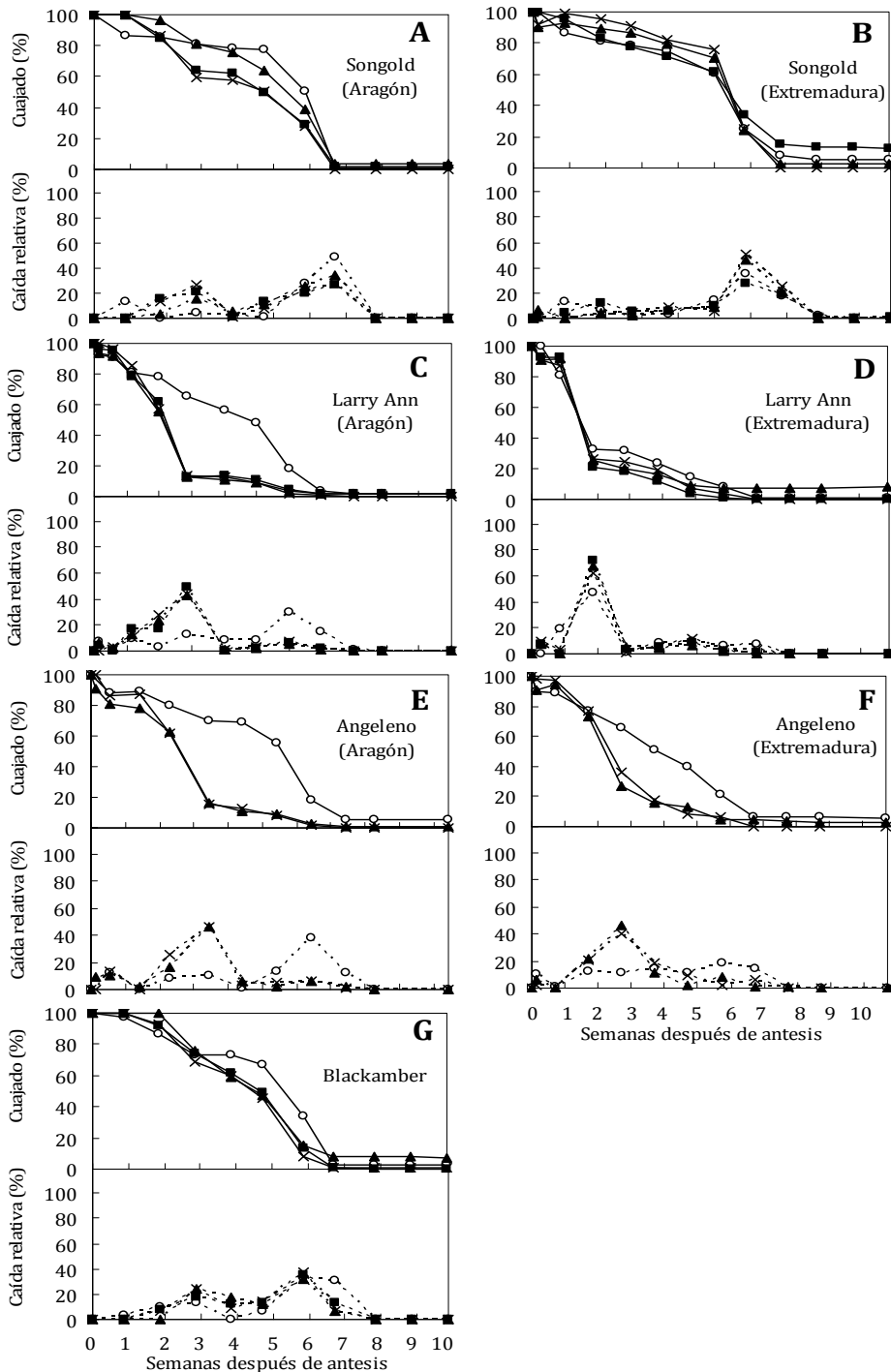


<b>Año</b>	<b>Localización (Plantación) Cultivar Tratamiento</b>	<b>Flores (nº)</b>	<b>Frutos (nº)</b>	<b>Cuajado (%)</b>	<b>Pistilos con polen germinado (%)</b>
2009	Aragón (La Almunia de Doña Black Diamond				
	Polinización libre	1622	20	1,2 a	67
	Autopolinización (S)	1763	0	0 b	92
	x Fortune (S)	517	21	4,1 c	87
	Fortune				
	Polinización libre	1514	30	2 a	100
	Autopolinización (S)	1016	0	0 b	100
	x Ambra (S)	396	13	3,3 ac	100
	x Black Diamond (S)	121	6	5 c	100
	Extremadura				
	Earliqueen				
	Polinización libre	1831	54	2,9 a	80
	Autopolinización (S)	1562	2	0,1 b	100
	x Ambra (S)	570	18	3,2 ac	100
	x Angeleno (S)	540	28	5,2 c	100
	Extremadura (Alcazaba)				
	Golden Globe				
	Polinización libre	1611	58	3,6 a	82
	Autopolinización (S)	1222	4	0,3 b	78
	x Angeleno (S)	1559	79	5,1 a	62
x Fortune (S)	1539	4	0,2 b	100	
2010	Aragón (La Almunia de Doña Friar				
	Polinización libre	1576	15	1,0 a	78
	Autopolinización (S)	1522	26	1,7 a	100
	x Golden Japan (S)	1613	106	6,6 b	100
	x Larry Ann (S)	1466	19	1,3 a	100
	Golden Japan				
	Polinización libre	1643	31	1,9 a	100
	Autopolinización (S)	1742	6	0,3 b	87
	x Friar (S)	1626	160	9,8 c	89
	x Ambra (S)	1559	180	11,5 c	80
	Extremadura				
	Black Gold				
	Polinización libre	1606	40	2,5 a	75
	Autopolinización (S)	1613	3	0,2 b	60
	x Black Diamond (S)	1583	3	0,2 b	100
	x Fortune (S)	1595	96	6,0 c	100
	Black Star				
	Polinización libre	1799	14	0,8 a	89
	Autopolinización (S)	1471	3	0,2 b	100
	x Larry Ann (S)	1488	97	6,5 c	100
x Black Diamond (S)	1602	52	3,2d	92	

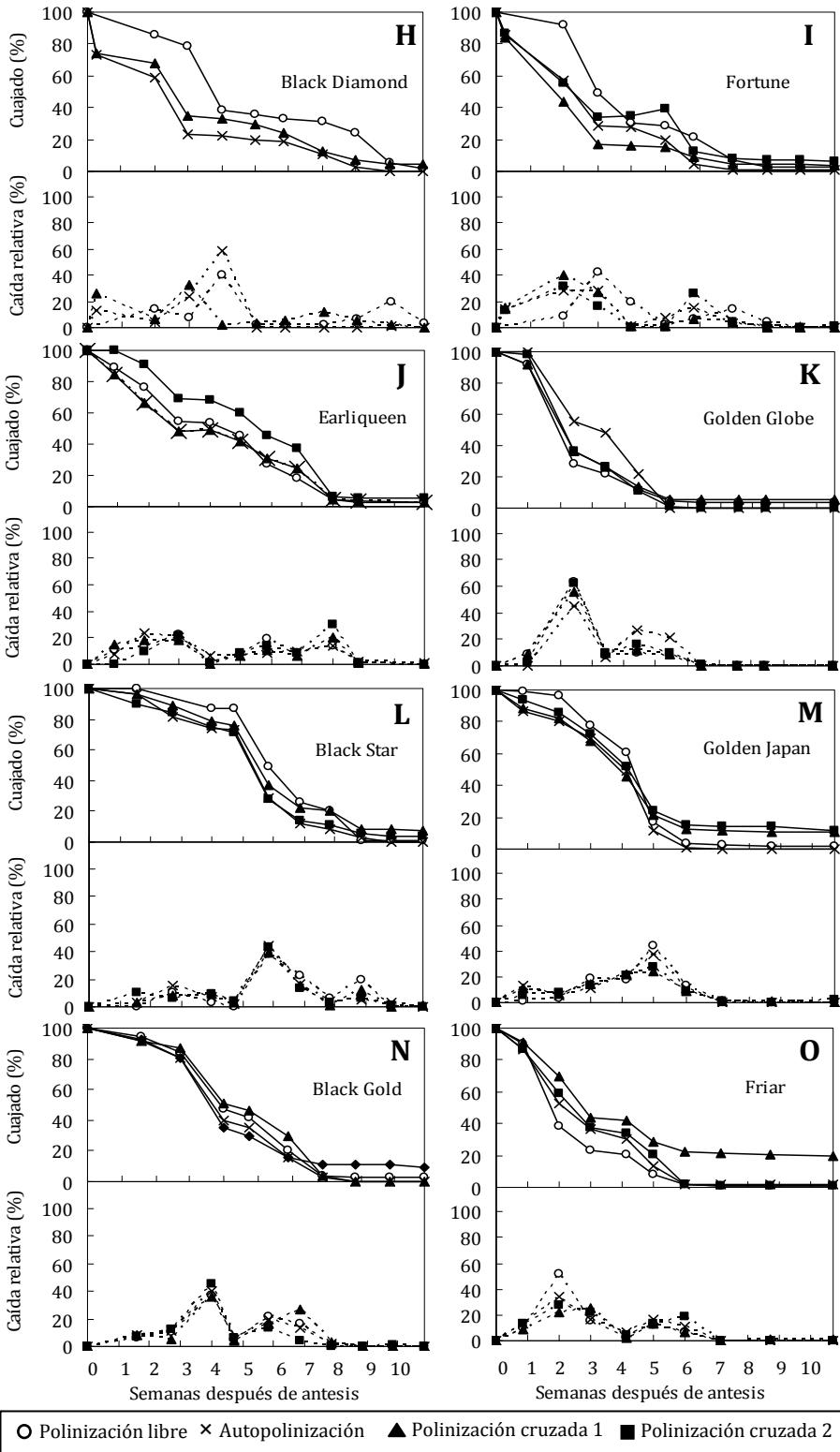


**Figura 2.5.** Porcentaje de cuajado en ensayos de polinización libre, autopolinización y polinización cruzada (2007-2010) en los cultivares de ciruelo japonés Songgold (A y B), Larry Ann (C y D), Angeleno (E y F), Blackamber (G), Black Diamond (H), Fortune (I), Earliqueen (J), Golden Globe (K), Black Star (L), Golden Japan (M), Black Gold (N) y Friar (O).





**Figura 2.6.** Cuajado y caída relativa de ensayos de polinización libre, autopolinización y polinización cruzada (2007-2010) en los cultivares de ciruelo japonés Songold (A y B), Larry Ann (C y D), Angeleno (E y F), Blackamber (G), Black Diamond (H), Fortune (I), Earliqueen (J), Golden Globe (K), Black Star (L), Golden Japan (M), Black Gold (N) y Friar (O).

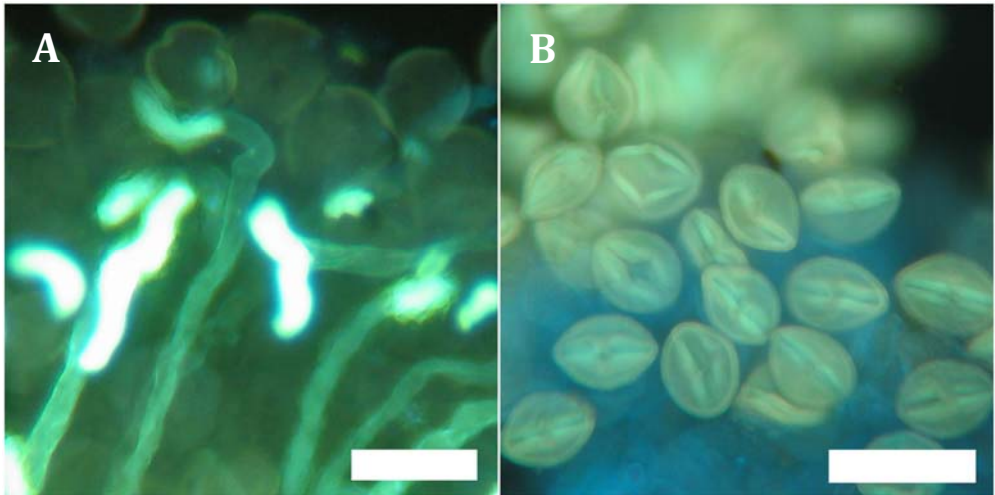


○ Polinización libre × Autopolinización ▲ Polinización cruzada 1 ■ Polinización cruzada 2

### 2.3.2 Germinación y viabilidad de polen

En la mayoría de flores de los distintos tratamientos, tanto las polinizadas manualmente como las dejadas a polinización libre, se apreciaron granos de polen bien hidratados y germinados en el estigma, con las aberturas de los colpos y el tubo polínico perfectamente visibles (Fig. 2.7A), (Tabla 2.2). El porcentaje medio de pistilos con granos de polen germinados de las polinizaciones manuales fue mayor (89,3 %) que en los pistilos de polinización libre (85,4 %). Dentro de cada cultivar, los porcentajes de pistilos con granos de polen germinados de los diferentes tratamientos de polinización y de polinización libre no presentaron diferencias significativas (Tabla 2.1). Sin embargo, un porcentaje elevado de flores de 'Angelino', tanto autopolinizadas como polinizadas con 'Larry Ann', presentaron granos de polen sin germinar en el ensayo de Aragón en 2008 (Fig. 2.7B). Esta situación pudo deberse a problemas en la receptividad de las flores o a falta de viabilidad del polen, por lo que en los años siguientes se estudió la viabilidad de cada polen utilizado a través de su germinación *in vitro*.

Mientras que todos los cultivares analizados en 2009 y 2010 presentaron una gran cantidad de granos de polen en sus anteras (Fig. 2.7A), el porcentaje de germinación del polen *in vitro* presentó diferencias significativas entre cultivares ( $F = 40,338$ , g.l. = 11,  $P < 0,001$ ), oscilando entre 11,1 y 80,1 % (Tabla 2.3). El porcentaje medio de germinación fue 37,1 % (Tabla 2.2), siendo el polen de 'Fortune' el que presentó el porcentaje más alto (80,1%), y el de 'Black Gold' el más bajo (11,1%).



**Figura 2.7.** Germinación del polen en el estigma. Granos de polen hidratados y germinados (A). Granos de polen sin germinar (B). Barra: 50µm.

**Tabla 2.3.** Germinación de polen en cultivo *in vitro* de los cultivares de ciruelo japonés utilizados en los ensayos de 2009 y 2010. Valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Año	Localización (Plantación) Cultivar	Germinación de polen (%)
2009	Aragón (La Almunia de Doña Godina)	
	Ambra	25,2 ± 1,9 c
	Fortune	22 ± 2,9 c
	Extremadura (Pueblonuevo del Guadiana)	
	Ambra	13,6 ± 4 ab
	Earliqueen	35,5 ± 3,6 d
	Extremadura (Alcazaba)	
	Angeleno	43,1 ± 2,6 de
	Fortune	45,8 ± 1,9 de
Golden Globe	36 ± 2 d	
2010	Extremadura (Valdelacalzada)	
	Black Diamond	19,3 ± 1,8 bc
	Black Gold	11,1 ± 0,8 a
	Black Star	44,4 ± 4,5 de
	Fortune	80,1 ± 5,4 f
	Larry Ann	50,1 ± 4 e

## 2.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de polinización en campo mostraron una clara influencia de la polinización en el cuajado en los cultivares de ciruelo japonés analizados. La observación de la germinación del polen al microscopio ha permitido descartar la ausencia de insectos polinizadores y la falta de viabilidad del polen como las causas responsables de la falta de cuajado en las plantaciones estudiadas. Ya que en la mayoría de cultivares no se obtuvo cuajado en flores autopolinizadas y que en los cruces entre cultivares el cuajado varió considerablemente dependiendo del cultivar polinizador utilizado, la falta de cuajado apunta a un problema de autoincompatibilidad de los cultivares y de incompatibilidad polen-pistilo entre algunos de ellos.

La polinización condicionó el cuajado en los cultivares estudiados, ya que se encontraron importantes variaciones de cuajado dependiendo del cultivar utilizado como polinizador, como también se ha visto en los cultivares Zuili plum (Jia *et al.*, 2008), y Black Diamond, Royal Zee y Songold (Sapir *et al.*, 2008a). Aunque se ha visto que tanto el tipo y cantidad de insectos polinizadores como el número de visitas de éstos a las flores tienen gran influencia sobre el cuajado en ciruelo japonés (Calzoni y Speranza, 1996, 1998), las diferencias de cuajado encontradas en los ensayos realizados no se debieron a la falta de transporte del polen al estigma en las flores dejadas a polinización libre ni a falta de viabilidad del polen utilizado en las polinizaciones manuales, ya que se observaron granos de polen germinados en la mayoría de flores. En un único cultivar, Angeleno, en la plantación de Aragón en 2008, se observó falta de germinación de polen en las flores polinizadas manualmente de los diferentes tratamientos, lo que pudo deberse a falta de receptividad en las flores en el momento de la polinización o a falta de viabilidad del polen utilizado.

Los porcentajes de cuajado obtenidos tanto en polinización libre como en los distintos tratamientos de polinización controlada son similares a los observados en otros cultivares de ciruelo japonés (Beppu *et al.*, 2005, 2010b; Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008b), pero menores a los observados en otras especies frutales de *Prunus* como albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002a), almendro (Kester y Griggs, 1959) o cerezo (Hedhly *et al.*, 2007). Sin embargo, porcentajes de cuajado relativamente bajos pueden



dar lugar a buenas producciones en ciruelo japonés, ya que esta especie produce una cantidad de flores considerablemente más alta que otros *Prunus* (Okie, 2006; Hartmann y Neumüller, 2009).

Mientras que la autopolinización de las flores aumentó el cuajado respecto al obtenido en polinización libre en el caso de 'Friar', en el resto de cultivares no se obtuvo cuajado en flores autopolinizadas, lo que apunta a problemas de autoincompatibilidad en la mayoría de los cultivares analizados. En la mayoría de los cruces entre cultivares o bien se obtuvo un cuajado significativamente mayor que el de las flores control dejadas a polinización libre o bien no se obtuvo cuajado, lo que también apunta a problemas de incompatibilidad polen-pistilo entre cultivares, como ocurre en otras especies de *Prunus* como albaricoquero (Burgos *et al.*, 1993; Rodrigo y Herrero, 1996), almendro (Tao *et al.*, 1997; Socías i Company y Alonso, 2004) o cerezo (Crane y Lawrence, 1929).

En algunos cruzamientos realizados sobre el mismo cultivar en plantaciones diferentes se encontraron resultados aparentemente contradictorios. En el cultivar Songold, el cuajado fue similar al de otros cultivares en una de las plantaciones, pero considerablemente menor en la otra. El hecho de que los árboles de esta plantación no hubieran alcanzado la plena producción podría explicar estas diferencias de cuajado. Los árboles jóvenes tardan varios años en alcanzar la plena producción y pueden tener un comportamiento diferente al de árboles adultos (Sedgley y Griffin, 1989). Los diferentes cuajados obtenidos en árboles de diferente edad del mismo cultivar indicarían que la menor cosecha obtenida en árboles jóvenes no se debería únicamente al menor número de flores, sino también a un menor porcentaje de cuajado.

Aunque la ausencia o aumento de cuajado en general apunta a relaciones de incompatibilidad o compatibilidad polen-pistilo, en 'Angeleno' en una de las dos plantaciones se obtuvieron cuajados muy bajos o nulos en todos los tratamientos realizados de forma manual. Además, en el cruce 'Angeleno' x 'Larry Ann' no se obtuvo cuajado en una de las plantaciones pero sí en la otra, aunque fue inferior al cuajado obtenido en polinización libre. Así, otros factores podrían estar involucrados en la falta de cuajado observada en este cultivar. En algunos cultivares, la emasculación de flores provoca cuajados muy bajos o incluso ausencia total de frutos (Capítulo 7), lo

que podría explicar los bajos cuajados observados en este cultivar. El establecimiento de las relaciones de compatibilidad entre estos cultivares y el estudio de la influencia de la emasculación de flores en el cuajado de fruto podría aclarar las diferencias de cuajado encontradas en este cruce.

El mayor porcentaje de caída de flores y frutos en desarrollo tuvo lugar en las cuatro semanas después de antesis, como ocurre en otros *Prunus* como albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002b), almendro (Kester y Griggs, 1959), cerezo (Bradbury, 1929), guindo (Lech y Tylus, 1983) y melocotonero (Harrold, 1935). En *Prunus* se han descrito tres picos importantes de caída hasta el establecimiento del cuajado definitivo. El primero se produce generalmente en las dos semanas siguientes a la antesis, y se ha atribuido a falta de polinización (Harrold, 1935) o fecundación (Sedgley y Griffin, 1989). La segunda caída importante se produce un mes después de la antesis, con el establecimiento del cuajado inicial y la caída de todas las flores que quedaban en el árbol sin haber sido fecundadas. Estos dos picos de caída se han observado en los cultivares de ciruelo japonés analizados en este trabajo, aunque el momento en que se produjeron fue muy variable entre cultivares. Sin embargo, el tercer pico de caída observado en otros *Prunus* en algunos años (Kester y Griggs, 1959) o cultivares (Lech y Tylus, 1983), que se ha relacionado con la competencia entre frutos en desarrollo, no se ha encontrado, en ninguno de los cultivares estudiados, como tampoco se ha encontrado en cultivares de albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002b; Rodrigo *et al.*, 2009).

El patrón de caída de cada cultivar se mantuvo con independencia del tratamiento o del polen utilizado, salvo en los cruces realizados sobre flores emasculadas en algunos cultivares [Angeleno (Aragón y Extremadura) y Larry Ann], en los que la caída se completó antes que en la población control de polinización libre. En algunos cultivares, la emasculación de las flores provoca su caída prematura (Capítulo 7), lo que podría explicar el comportamiento observado en estos cultivares. En los tratamientos realizados sobre flores emasculadas en el resto de cultivares y en todos los tratamientos realizados mediante polinización suplementaria, el patrón de caída dentro de cada cultivar fue similar entre los distintos tratamientos y las flores control de polinización libre. Sin embargo, existieron diferencias importantes entre cultivares en el momento en que se estabilizó la caída, con una variación de hasta

cuatro semanas en el establecimiento del cuajado final dependiendo del cultivar. El diferente comportamiento observado entre cultivares podría estar relacionado con el diferente origen genealógico de cada cultivar, ya que los cultivares de ciruelo japonés cultivados en la actualidad no pertenecen a una sola especie sino que son el resultado de hibridaciones interespecíficas de la especie original *P. salicina* con otros ciruelos diploides como *P. americana*, *P. angustifolia*, *P. besseyi*, *P. cerasifera*, *P. hortulana*, *P. munsoniana*, *P. nigra* y *P. simonii* (Byrne, 1989; Faust y Surányi, 1999; Okie, 2006).

La polinización presentó una clara influencia en el cuajado final en los principales cultivares de ciruelo japonés. Se ha podido descartar la falta de viabilidad de polen y la ausencia de insectos polinizadores como causas de la falta de cuajado en los ensayos realizados. El hecho de que en la mayoría de tratamientos de autopolinización no se obtuvo cuajado, junto a que en algunos cruces entre cultivares tampoco se obtuvo cuajado mientras que en otros se produjo un aumento de cuajado, apunta a un problema de autoincompatibilidad y de relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares. En el siguiente capítulo se va a determinar la auto(in)compatibilidad de cada cultivar y las relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos en cruces controlados y mediante la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad usando marcadores moleculares.



### **3. AUTOINCOMPATIBILIDAD Y FALTA DE CUAJADO EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS. SELECCIÓN DE CULTIVARES POLINIZADORES**

#### **RESUMEN**

Para determinar si la incompatibilidad polen-pistilo está relacionada con situaciones de falta de cuajado en ciruelo japonés, en este trabajo se ha evaluado la auto(in)compatibilidad de los 12 cultivares de mayor importancia en España mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos en flores autopolinizadas en campo y en laboratorio. En cada plantación también se han analizado las relaciones de (in)compatibilidad polen-pistilo entre los diferentes cultivares coincidentes en floración. Para ello se ha realizado el seguimiento del crecimiento de los tubos polínicos en flores de cruces controlados y se ha identificado el genotipo *S* de cada cultivar mediante PCR. Los resultados obtenidos han confirmado la autoincompatibilidad de 9 de los cultivares analizados (Blackamber, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Fortune, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann y Songold) y la autocompatibilidad del cultivar Friar, corroborando los resultados de los ensayos de cuajado en campo (Capítulo 2). La determinación de las relaciones de incompatibilidad polen-pistilo entre los cultivares ha permitido seleccionar, para cada cultivar autoincompatible, al menos un cultivar polinizador compatible y coincidente en floración en cada plantación.

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

El ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) produce un elevado número de flores, mucho mayor que otros *Prunus* (Okie, 2006; Hartmann y Neumüller, 2009). Sin embargo, en algunos cultivares se produce una caída masiva de flores que provoca grandes oscilaciones de cuajado entre años sin que las causas estén bien establecidas (Okie y Weinberger, 1996; Hartmann y Neumüller, 2009). En los últimos años, estos cuajados erráticos han sido relacionados con la polinización en algunos cultivares y situaciones de cultivo (González, 2002; Vidiella, 2002; Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008*a, b*). En el capítulo anterior, la falta de cuajado se ha relacionado con la polinización en cultivares ampliamente utilizados en la actualidad, tanto de piel negra (Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star y Friar), como de piel roja (Earliqueen, Fortune y Larry Ann) y amarilla (Golden Globe, Golden Japan y Songold). En ensayos realizados en campo, la falta de cuajado observada en flores autopolinizadas de la mayoría de estos cultivares apunta a un problema de autoincompatibilidad (Capítulo 2).

Tradicionalmente, algunos cultivares de ciruelo japonés se han considerado autoincompatibles (Okie y Weinberger, 1996) y otros autocompatibles (Crane y Lawrence, 1929; Ramming y Cociu, 1990; Beppu *et al.*, 2005). Sin embargo, la auto(in)compatibilidad no se ha estudiado en muchos cultivares, por lo que se desconoce el fenotipo y las relaciones de (in)compatibilidad de la mayoría de cultivares. En polinizaciones controladas entre cultivares se han obtenido cuajados muy variables dependiendo del cultivar polinizador, lo que también apunta a relaciones de incompatibilidad entre cultivares (Capítulo 2). Sin embargo, es difícil determinar hasta qué punto los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en condiciones de cultivo son provocados por problemas de polinización, ya que muchos otros factores, tanto externos como internos, intervienen en el establecimiento del cuajado.

La autoincompatibilidad es un mecanismo que impide la autofecundación y promueve el cruce entre genotipos diferentes (De Nettancourt, 2001). El ciruelo japonés, como otras especies del género *Prunus*, presenta un sistema de autoincompatibilidad de tipo gametofítico, que se manifiesta por la parada del

crecimiento de los tubos polínicos en el estilo en las reacciones incompatibles, impidiendo la llegada de los tubos polínicos al ovario y la fecundación (De Nettancourt, 2001). En el género *Prunus*, esta reacción está determinada por un locus polimórfico, el locus *S*, con dos genes ligados que codifican el fenotipo del polen (*SFB*) y del pistilo (*SRNasa*) (revisado en Yamane y Tao, 2009; Tao e Iezzoni, 2010). Tras la polinización, si el alelo *S* que se expresa en el polen (haploide) coincide con uno de los dos alelos *S* expresados en el pistilo (diploide), el crecimiento del tubo polínico se detiene a causa de la reacción de autoincompatibilidad. Por otro lado, cuando el alelo *S* del polen es distinto a los expresados en el pistilo, no se produce la reacción de autoincompatibilidad y el tubo polínico continúa su crecimiento a través del estilo hacia el ovario. Este mecanismo condiciona también la compatibilidad entre cultivares, ya que cultivares autoincompatibles con el mismo genotipo *S* son también incompatibles entre sí.

Existen distintas aproximaciones para determinar las relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares: mediante ensayos de polinización y cuajado en campo, mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos y mediante la determinación de los alelos *S* de incompatibilidad con técnicas moleculares. La auto(in)compatibilidad y las relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares han sido determinadas mediante ensayos de cuajado en campo en otros *Prunus* como cerezo (Crane y Lawrence, 1929), almendro (Kester *et al.*, 1994), albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002a) o melocotonero (Arbeloa *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados de cuajado en campo pueden verse afectados por factores externos que pueden enmascarar la respuesta de incompatibilidad, lo que hace necesario repetir los ensayos en años diferentes o completarlos con ensayos de microscopía y/o mediante la determinación de los alelos *S* de incompatibilidad.

La incompatibilidad polen-pistilo también puede determinarse mediante la observación al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo en flores de cruces controlados, como se ha estudiado en otros *Prunus* como albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 1996; Burgos *et al.*, 1997), almendro (Dicenta *et al.*, 2002; Alonso y Socías i Company, 2005), cerezo (Hormaza y Herrero, 1996a; Hedhly *et al.*, 2004) y ciruelo japonés (Vidiella, 2002). El seguimiento del crecimiento de los tubos polínicos se puede realizar en flores recogidas del árbol en los días siguientes a

la polinización. Sin embargo, el crecimiento de los tubos polínicos puede verse afectado por las condiciones ambientales, lo que puede enmascarar los resultados de incompatibilidad (Stephenson *et al.*, 1992; Delph *et al.*, 1997; Hedhly *et al.*, 2004). En otros *Prunus* como albaricoquero (Austin *et al.*, 1998), almendro (Socías i Company *et al.*, 1976), cerezo (Hedhly *et al.*, 2003), ciruelo europeo (Thompson y Liu, 1973; Jefferies *et al.*, 1982; Keulemans y Van Laer, 1989), guindo (Cerović y Ružić, 1992) y melocotonero (Hedhly *et al.*, 2005), se ha visto que las altas temperaturas aceleran el crecimiento de los tubos polínicos. Para reducir la influencia de los factores externos en el crecimiento de los tubos polínicos, los cruces se pueden realizar en laboratorio mediante el cultivo semi *in vivo* de flores, como se ha hecho en albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 1996), almendro (Socías i Company y Alonso, 2004), cerezo (Hormaza y Herrero, 1996a; Hedhly *et al.*, 2003, 2004) y melocotonero (Hedhly *et al.*, 2005).

Los ensayos de polinización y cuajado en campo, y la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio se pueden complementar con la determinación de los alelos *S* de incompatibilidad mediante PCR. Esta técnica utiliza ADN como material de partida, por lo que se puede realizar utilizando otros tejidos de la planta, además de las flores, y por lo tanto puede realizarse en cualquier época del año. La identificación y caracterización de las *SRNasas* estilares en ciruelo japonés (Yamane *et al.*, 1999) permitió establecer metodologías similares a las desarrolladas en cerezo (Tao *et al.*, 1999), almendro (Tamura *et al.*, 2000) o albaricoquero japonés (Yaegaki *et al.*, 2001) para determinar los alelos *S* mediante PCR (Beppu *et al.*, 2002, 2003; Halász *et al.*, 2007; Sapir *et al.*, 2004, 2008a, b; Zhang *et al.*, 2008). El método de detección de los diferentes alelos *S* se basa en que las *SRNasas* tienen intrones de diferentes tamaños, lo que permite identificar fragmentos de PCR correspondientes a cada alelo *S* mediante el uso de cebadores de las zonas conservadas de la secuencia, realizándose una identificación por tamaños de los fragmentos obtenidos (Tao *et al.*, 1999).

En este capítulo se ha analizado la auto(in)compatibilidad de 12 cultivares de ciruelo japonés localizados en diferentes plantaciones con historiales de cuajados erráticos. Para ello, en cada cultivar se ha observado el crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas, relacionándolo con los resultados de cuajado obtenidos en campo (Capítulo 2). En cada plantación también se ha determinado la



(in)compatibilidad entre los diferentes cultivares coincidentes en floración mediante el seguimiento de los tubos polínicos en flores de cruces controlados y la detección de alelos *S* de incompatibilidad mediante PCR.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 *Material vegetal***

En este trabajo se han estudiado 12 cultivares de ciruelo japonés situados en nueve plantaciones comerciales con historiales de cuajados erráticos, cinco de ellas localizadas en Extremadura y cuatro en Aragón (Capítulo 2). Los cultivares estudiados son Angeleno, Blackamber, Black Diamond, Black Gold, Black Star y Friar, de piel negra; Earliqueen, Fortune y Larry Ann, de piel roja, y Golden Globe, Golden Japan y Songold, de piel amarilla (Tabla 3.1). Tres de estos 12 cultivares (Angeleno, Larry Ann y Songold), han sido evaluados en dos plantaciones distintas. En cada plantación se han analizado también las relaciones de (in)compatibilidad entre estos 12 cultivares y otros cultivares coincidentes en floración en cada plantación, por lo que de algunos cultivares se ha analizado material vegetal de diferentes procedencias: Angeleno (tres plantaciones), Ambra (dos plantaciones), Black Diamond (tres plantaciones), Fortune (cinco plantaciones), Larry Ann (cuatro plantaciones), Nubiana (dos plantaciones) y Songold (dos plantaciones). En el resto de cultivares, Blackamber, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Friar, Golden Globe, Golden Japan, Golden Plum, Golden Plumza y Santa Rosa, el material vegetal procedió de una sola plantación (Tabla 3.1).

### **3.2.2 *Polinizaciones en campo***

De cada plantación y cultivar se eligieron al azar tres árboles, en los que se seleccionaron y marcaron ramas. Un grupo de ramas se dejó a polinización libre (Capítulo 2), y en las otras ramas seleccionadas se efectuaron diferentes tratamientos de polinización: autopolinización y polinización cruzada con uno o dos cultivares presentes en la misma plantación y coincidentes en floración. En cada cultivar y tratamiento se seleccionaron ramas hasta completar entre 40 y 80 flores, que fueron

polinizadas manualmente con polen del propio cultivar en las autopolinizaciones y con polen de otros cultivares en las polinizaciones cruzadas. En los ensayos realizados en 2007 y 2008, las flores fueron emasculadas y polinizadas 24 h más tarde con el polen correspondiente (Tabla 3.1) con la ayuda de un pincel. El polen utilizado se obtuvo siguiendo el protocolo descrito previamente (Apartado 2.2.2, Capítulo 2). Ya que la emasculación de flores se ha relacionado con la falta de cuajado en algunos cultivares (Capítulo 7), los ensayos de 2009 y 2010 se realizaron mediante polinización suplementaria de flores no emasculadas (Apartado 2.2.2, Capítulo 2). Cuatro días después de la polinización se recogieron las flores de las ramas de cada tratamiento y se fijaron los pistilos, en FAA [etanol (70%): ácido acético: formaldehído (18:1:1)] (Johansen, 1940) en 2007 y 2008, y en etanol : ácido acético (3:1) (Williams *et al.*, 1999) en 2009 y 2010 para su posterior observación en el microscopio.

### **3.2.3 Polinizaciones en laboratorio**

Las autopolinizaciones y cruces realizados en campo (Tabla 3.1) también se realizaron en el laboratorio en cultivo semi *in vivo*. Para ello, se recogieron flores en estado de botón globoso de cada cultivar, se emascularon y se colocaron sobre espuma de florista húmeda a temperatura ambiente (Fig. 3.1) (Hormaza y Herrero, 1996a; Rodrigo y Herrero, 1996; Hedhly *et al.*, 2004, 2005). Se utilizaron entre 20 y 30 flores por cruce, que 24 h después de la emasculación fueron polinizadas manualmente con polen obtenido siguiendo el método descrito en el apartado 2.2.2 (Capítulo 2). Se realizaron autopolinizaciones de 12 cultivares, en tres de ellos con flores de dos plantaciones distintas, y 24 cruces (Tabla 3.1). Para su posterior observación al microscopio, los pistilos fueron fijados 72 h después de la polinización, en FAA [etanol (70%): ácido acético: formaldehído (18:1:1)] (Johansen, 1940) en 2007 y 2008, y en etanol : ácido acético (3:1) (Williams *et al.*, 1999) en 2009 y 2010.



**Figura 3.1.** Flores emasculadas sobre espuma de florista húmeda.

### **3.2.4 Preparación de muestras para el microscopio**

Los pistilos fijados de los ensayos de campo y de laboratorio fueron sometidos al mismo protocolo de preparación para su observación al microscopio (Apartado 2.2.3, Capítulo 2). Los pistilos fueron lavados tres veces a intervalos de 1h con agua destilada y sometidos a un lavado final en sulfito sódico al 5% a 4°C durante 24h. Al día siguiente, los pistilos fueron autoclavados a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 8 min en sulfito sódico al 5% para ablandar los tejidos (Jefferies y Belcher, 1974), y teñidos con azul de anilina al 0,1% en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N (v/v) para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957).

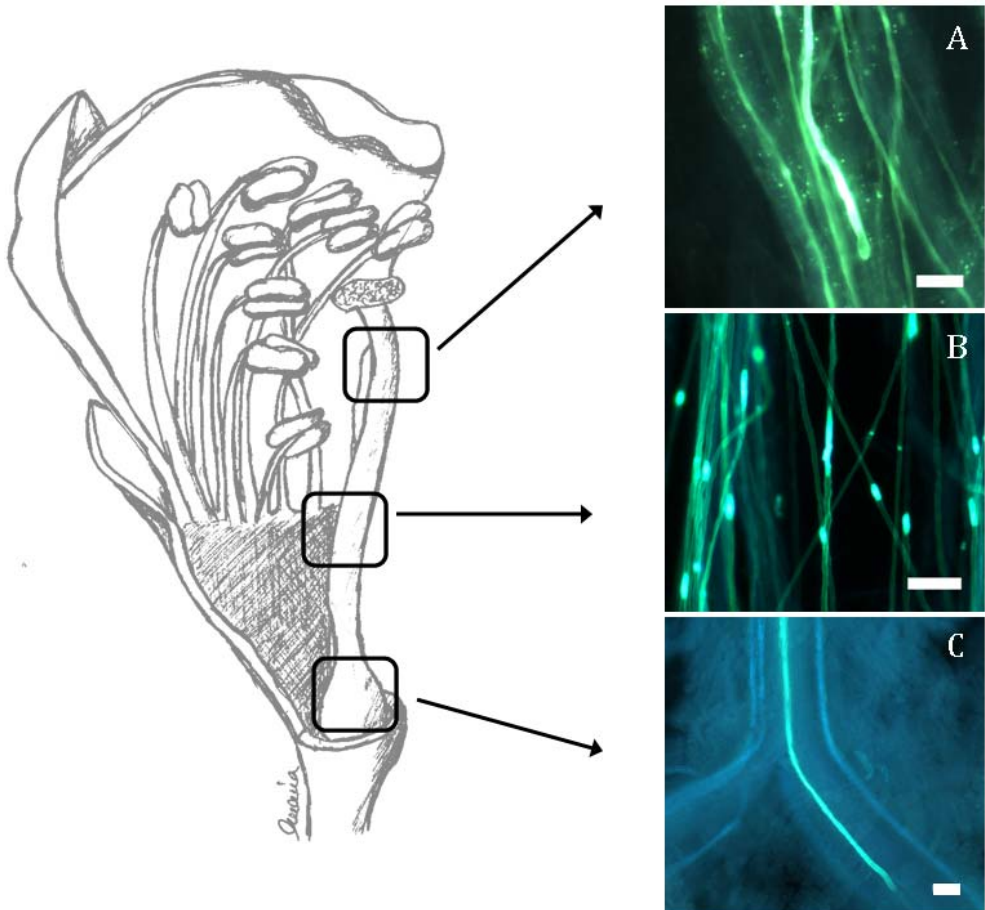
En cada cruce se determinó el porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma y se siguió el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo. Se descartaron los pistilos con pocos granos de polen germinados en el estigma o con las estructuras del pistilo degeneradas. Se consideraron relaciones incompatibles cuando los tubos polínicos detuvieron su crecimiento en el tercio superior del estilo (Fig. 3.2A), y relaciones compatibles cuando los tubos polínicos

crecieron a lo largo del pistilo (Fig. 3.2B) hasta la base del estilo alcanzando la entrada del ovario (Fig. 3.2C). La germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos se observaron en un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) equipado con luz UV y epifluorescencia, con un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470 (Fig. 3.2).

### **3.2.5 Identificación de alelos *S* mediante PCR**

El ADN genómico de las 31 accesiones estudiadas, incluyendo los cultivares analizados y los polinizadores utilizados en cada plantación, fue extraído de hojas jóvenes siguiendo el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) con modificaciones (Hormaza, 2002). De cada cultivar se utilizaron 50 mg de hojas, que fueron trituradas con un mortero o con un triturador automático, en el que las muestras se trituran con la ayuda de una bola de tungsteno (TyssueLyser, Qiagen). La trituración se hizo en 400 µl de tampón de extracción (100 mM Tris HCl pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 1% PVP; 0,1% bisulfito sódico) y 0,4 µl de 2-mercaptoetanol, y posteriormente las muestras fueron incubadas durante 25 min a 65°C. A continuación se añadieron 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 10.000 G durante 15 min. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante, al que se añadieron 240 µl de isopropanol a -20°C para precipitar los ácidos nucleicos. Para recuperar el precipitado se centrifugó durante 5 min a 13.000 G y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó con un tampón de lavado [10 mM de acetato de amonio en etanol (76%)] durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente fue centrifugado a 13.000 G durante 5 min, descartando otra vez el sobrenadante. El pellet resultante fue secado mediante centrifugación y vacío durante 10 min, resuspendido en 200 µl de MTE (10 mM Tris HCl, 0,1 mM EDTA a pH 8) y almacenado a 4°C hasta su utilización. El ADN obtenido fue cuantificado con un espectrofotómetro y diluido a una concentración de 10 ng/µl antes de la amplificación mediante PCR. Las reacciones de PCR se realizaron y analizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 4, utilizando los cebadores PruT2-PCER y PruC2-PCER (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2001). Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta. La estimación de

los tamaños de los fragmentos se realizó usando un marcador de tamaño de 1 kb y el programa de análisis de imagen Quantity One 1-Analysis 4.6.2 (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.).



**Figura 3.2.** Diagrama de una flor de ciruelo japonés y observación del crecimiento de tubos polínicos en el estilo. Tubo polínico parado en el tercio superior del estilo en un cruce incompatible (A). Tubos polínicos creciendo en mitad del estilo en un cruce compatible (B). Tubo polínico en la base del estilo alcanzando la entrada del ovario en un cruce compatible (C). Barras: 50µm.

### **3.3. RESULTADOS**

#### **3.3.1 Observación del crecimiento de los tubos polínicos**

Todos los pistilos de los ensayos de polinización libre presentaron granos de polen germinados en el estigma (Capítulo 2), pero únicamente en cuatro de las 15 accesiones estudiadas [Earliqueen, Friar, Golden Globe, Larry Ann (Extremadura)] los tubos polínicos alcanzaron la base del estilo, en un porcentaje de flores variable para cada cultivar (43%, 50%, 11% y 50% respectivamente) (Tabla 3.1).

Para determinar la auto(in)compatibilidad de cada cultivar y la (in)compatibilidad de cada cruce, se observó el crecimiento de los tubos polínicos en pistilos procedentes de polinizaciones controladas de campo y laboratorio. Se pudo seguir el crecimiento de los tubos polínicos en pistilos de diez de las 12 autopolinizaciones y de 20 de los 27 cruces analizados (Tabla 3.1), descartándose los pistilos del resto de autopolinizaciones y cruces realizados por no observarse en los pistilos granos de polen germinados en el estigma o presentar las estructuras del pistilo degeneradas.

En los pistilos autopolinizados de 9 cultivares [Blackamber, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Fortune, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann (Aragón y Extremadura) y Songold (Aragón y Extremadura)], los tubos polínicos se detuvieron en el primer tercio del estilo y no llegaron al ovario (Fig. 3.2A). Únicamente en el cultivar Friar se observaron tubos polínicos en la base del estilo en el 69% de los pistilos autopolinizados observados. En los otros dos cultivares analizados, Angeleno (Aragón y Extremadura) y Black Diamond, no se pudo observar el comportamiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas por no haber germinado los granos de polen adecuadamente en ninguno de los pistilos analizados.

En flores de 15 cruces se observaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo en un porcentaje de pistilos variable (17-100%) ['Blackamber' x 'Black Diamond'; 'Black Gold' x 'Fortune'; 'Black Star' x 'Black Diamond'; 'Black Star' x 'Larry Ann'; 'Earliqueen' x 'Ambra'; 'Earliqueen' x 'Angeleno'; 'Friar' x 'Golden Japan'; 'Friar' x 'Larry Ann'; 'Golden Globe' x 'Angeleno'; 'Golden Globe' x 'Fortune'; 'Larry Ann' x 'Angeleno' (Aragón y Extremadura); 'Songold' x 'Blackamber'; 'Songold' x 'Fortune'; 'Songold' x 'Golden Plumza'] (Tabla 3.1). Por otro lado, en cinco cruces ('Blackamber' x

'Fortune'; 'Black Gold' x 'Black Diamond'; 'Golden Japan' x 'Ambra'; 'Golden Japan' x 'Friar' y 'Larry Ann' x 'Nubiana') los tubos polínicos no alcanzaron la base del estilo en ninguno de los pistilos analizados (Tabla 3.1). En la mayoría de los pistilos de estos cruces, la parada de los tubos polínicos se observó en el tercio superior del estilo, mientras que en algunos pistilos de los cruces 'Golden Japan' x 'Friar' y 'Larry Ann' x 'Nubiana' se observaron tubos polínicos alcanzando el 60% de la longitud del estilo.

El comportamiento de los tubos polínicos se correspondió con los resultados de cuajado en la mayoría de cruces (Tabla 3.1). Por un lado, en 14 cruces entre cultivares se obtuvo cuajado en campo y se observaron pistilos con tubos polínicos en la base ['Blackamber' x 'Black Diamond'; 'Black Gold' x 'Fortune'; 'Black Star' x 'Black Diamond'; 'Black Star' x 'Larry Ann'; 'Earliqueen' x 'Angeleno'; 'Earliqueen' x 'Ambra'; 'Friar' x 'Golden Japan'; 'Friar' x 'Larry Ann'; 'Golden Globe' x 'Angeleno'; 'Larry Ann' x 'Angeleno' (Aragón y Extremadura); 'Songold' x 'Blackamber'; 'Songold' x 'Golden Plumza'; 'Songold' x 'Fortune'] (Tabla 3.1). Por otro lado, en tres cruces ('Blackamber' x 'Fortune', 'Black Gold' x 'Black Diamond' y 'Larry Ann' x 'Nubiana') no se observaron pistilos con tubos polínicos alcanzando la base del estilo ni se obtuvo cuajado en campo. En los otros tres cruces, el comportamiento de los tubos polínicos no se correspondió con los resultados de cuajado. En el cruce 'Golden Globe' x 'Fortune' no se obtuvo cuajado en campo pero se observaron tubos polínicos en la base del estilo en dos de los 11 los pistilos analizados, mientras que en los cruces 'Golden Japan' x 'Ambra' y 'Golden Japan' x 'Friar' sí se obtuvo cuajado en campo pero no se observaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo en ninguno de los pistilos observados.

**Tabla 3.1.** Ensayos de polinización realizados sobre 12 cultivares de ciruelo japonés (2007-2010). Año de ensayo, localización de la plantación, cultivar analizado, tratamiento, porcentaje de cuajado (Capítulo 2), porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo en ensayos de campo y ensayos de laboratorio, y genotipo *S*. E: Emasculación; S: Polinización suplementaria.

Año	Localización (Plantación) Cultivar Tratamiento	Cuajado (%)	Pistilos con tubos polínicos entrando en el ovario (%)		Genotipo <i>S</i>
			Ensayos de campo	Ensayos de laboratorio	
2007	Aragón (Calatorao)				
	Blackamber				<i>SbSc</i>
	Polinización libre	2,6	0		
	Autopolinización (E)	0,8	0	0	<i>SbSc</i> x <i>SbSc</i>
	x Black Diamond (E)	7,4	40	-	<i>SbSc</i> x <i>SeSh</i>
	x Fortune (E)	0	0	-	<i>SbSc</i> x <i>SbSc</i>
	Songold				<i>ShSk</i>
	Polinización libre	0,5	0		
	Autopolinización (E)	0,3	0	0	<i>ShSk</i> x <i>ShSk</i>
	x Blackamber (E)	3,3	-	75	<i>ShSk</i> x <i>SbSc</i>
	x Golden Plumza (E)	1,6	20	-	<i>ShSk</i> x <i>SbSc</i>
	Extremadura (Valdivia)				
	Songold				<i>ShSk</i>
	Polinización libre	4,1	0		
	Autopolinización (E)	0	0	0	<i>ShSk</i> x <i>ShSk</i>
x Golden Plum (E)	1,9	-	-	<i>ShSk</i> x <i>SbSc</i>	
x Fortune (E)	9,8	40	83	<i>ShSk</i> x <i>SbSc</i>	
2008	Aragón (Albalate de Cinca)				
	Angeleno				<i>ScSh</i>
	Polinización libre	3,7	0		
	Autopolinización (E)	0	-	-	<i>ScSh</i> x <i>ScSh</i>
	x Larry Ann (E)	0,2	-	-	<i>ScSh</i> x <i>SbSh</i>
	Larry Ann				<i>SbSh</i>
	Polinización libre	1,2	0		
	Autopolinización (E)	0	0	0	<i>SbSh</i> x <i>SbSh</i>
	x Angeleno (E)	1,5	29	22	<i>SbSh</i> x <i>ScSh</i>
	x Nubiana <sup>■</sup> (E)	1,5	-	-	<i>SbSh</i> x <i>SbSc</i>
	Extremadura (Guareña)				
	Angeleno				<i>ScSh</i>
	Polinización libre	5,7	0		
	Autopolinización (E)	0	-	-	<i>ScSh</i> x <i>ScSh</i>
	x Larry Ann (E)	3	-	-	<i>ScSh</i> x <i>SbSh</i>
Larry Ann				<i>SbSh</i>	
Polinización libre	0,7	50			
Autopolinización (E)	0,2	0	0	<i>SbSh</i> x <i>SbSh</i>	
x Angeleno (E)	7,3	50	67	<i>SbSh</i> x <i>ScSh</i>	
x Nubiana <sup>■</sup> (E)	0,2	0	-	<i>SbSh</i> x <i>SbSh</i>	



Año	Localización (Plantación) Cultivar Tratamiento	Cuajado (%)	Pistilos con tubos polínicos entrando en el ovario (%)		Genotipo S	
			Ensayos de campo	Ensayos de laboratorio		
2009	Aragón (La Almunia de Doña Godina)					
	Black Diamond					
						<i>SeSh</i>
		Polinización libre	1,2	-		
		Autopolinización (S)	0	-	-	<i>SeSh x SeSh</i>
		x Fortune (S)	4,1	-	-	<i>SeSh x SbSc</i>
	Fortune					
		Polinización libre	2	0		
		Autopolinización (S)	0	0	-	<i>SbSc</i>
		x Ambra (S)	3,3	-	-	<i>SbSc x SbSo</i>
		x Black Diamond (S)	5	-	-	<i>SbSc x SeSh</i>
	Extremadura (Pueblonuevo del Guadiana)					
	Earliqueen					
		Polinización libre	2,9	43		<i>SeSh</i>
		Autopolinización (S)	0,1	0	-	<i>SeSh x SeSh</i>
		x Ambra (S)	3,2	82	63	<i>SeSh x SbSo</i>
		x Angeleno (S)	5,2	100	50	<i>SeSh x ScSh</i>
Extremadura (Alcazaba)						
Golden Globe*						
	Polinización libre	3,6	11		<i>SbSc</i>	
	Autopolinización (S)	0,3	0	0	<i>SbSc x SbSc</i>	
	x Angeleno (S)	5,1	30	91	<i>SbSc x ScSh</i>	
	x Fortune (S)	0,2	18	-	<i>SbSc x SbSc</i>	
2010	Aragón (La Almunia de Doña Godina)					
	Friar*					
		Polinización libre	1	50		<i>SbSh</i>
		Autopolinización (S)	1,7	69	-	<i>SbSh x SbSh</i>
		x Golden Japan (S)	6,6	93	36	<i>SbSh x SfSg</i>
		x Larry Ann (S)	1,3	17	-	<i>SbSh x SbSh</i>
	Golden Japan					
		Polinización libre	1,9	-		<i>SfSg</i>
		Autopolinización (S)	0,3	0	0	<i>SfSg x SfSg</i>
		x Friar* (S)	9,8	0	0	<i>SfSg x SbSh</i>
		x Ambra (S)	11,5	-	0	<i>SfSg x SbSo</i>
	Extremadura (Valdelacalzada)					
	Black Gold					
		Polinización libre	2,5	0		<i>SeSh</i>
		Autopolinización (S)	0,2	-	0	<i>SeSh x SeSh</i>
		x Black Diamond (S)	0,2	-	0	<i>SeSh x SeSh</i>
		x Fortune (S)	6	64	91	<i>SeSh x SbSc</i>
Black Star						
	Polinización libre	0,8	0		<i>SeSf</i>	
	Autopolinización (S)	0,2	0	0	<i>SeSf x SeSf</i>	
	x Larry Ann (S)	6,5	-	75	<i>SeSf x SbSh</i>	
	x Black Diamond (S)	3,2	-	50	<i>SeSf x SeSh</i>	

\*Cultivares con genotipo diferente al determinado en otros trabajos: Friar [*ShSk* (Halász *et al.*, 2007)]; Golden Globe [*SbSf* (Capítulo 4)].

▪ Cultivar con distinto genotipo en las dos accesiones analizadas.

### 3.3.2 Identificación de alelos *S* mediante PCR

Se identificaron los alelos *S* de incompatibilidad de los 31 genotipos analizados, que incluyen 15 genotipos de cultivares utilizados en los ensayos de polinización libre, autopolinización y cruces, y 16 cultivares utilizados como polinizadores (Tabla 3.1). Se identificaron ocho alelos de incompatibilidad distintos, *Sb*, *Sc*, *Se*, *Sf*, *Sg*, *Sh*, *Sk* y *So* (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Capítulo 4), que conformaron nueve genotipos diferentes (Tabla 3.2). El genotipo *S* de cada accesión fue utilizado para incluirla en su correspondiente grupo de incompatibilidad (II, IV, VII, VIII, IX, X, XI, XIII y XVII) (Halász *et al.*, 2007; Capítulo 4) (Tabla 3.2).

En seis de los cultivares en los que se analizaron muestras de plantaciones distintas (Ambra, Angeleno, Black Diamond, Fortune, Larry Ann y Songold) se identificó el mismo genotipo *S* para las distintas accesiones. En el caso de ‘Nubiana’, la muestra analizada de la plantación de Aragón presentó el genotipo *SbSc*, mientras que el genotipo de la muestra de la plantación de Extremadura fue *SbSh*.

**Tabla 3.2.** Grupo de incompatibilidad (G.I.) y genotipo *S* de los cultivares analizados.

G.I.	Genotipo <i>S</i>	Cultivar
II	<i>SbSc</i>	Blackamber, Fortune, Golden Globe, Golden Plumza, Nubiana <sup>■</sup> , Golden Plum
IV	<i>SbSh</i>	Friar, Larry Ann, Nubiana <sup>■</sup>
IX	<i>SfSg</i>	Golden Japan
VII	<i>ScSh</i>	Angeleno
VIII	<i>SeSh</i>	Black Diamond, Black Gold, Earliqueen
X	<i>ShSk</i>	Songold
XI	<i>ScSe</i>	Santa Rosa
XIII	<i>SeSf</i>	Black Star
XVII	<i>SbSo</i>	Ambra

■ Cultivar con distinto genotipo en las dos accesiones procedentes de dos plantaciones distintas.

### 3.4. DISCUSIÓN

Las observaciones del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio han permitido determinar la autoincompatibilidad de 9 de los 12 cultivares estudiados (Blackamber, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Fortune, Golden Globe, Golden Japan, Larry Ann y Songold) y la autocompatibilidad de Friar. En los otros dos cultivares, Angeleno y Black Diamond, los resultados no han sido concluyentes. La determinación molecular del genotipo *S* de los distintos cultivares analizados, junto con el seguimiento del crecimiento de los tubos polínicos, ha permitido establecer las relaciones de (in)compatibilidad polen-pistilo entre los cultivares estudiados. Estos resultados han corroborado los resultados que se atisbaron en los ensayos de cuajado (Capítulo 2).

La ausencia de tubos polínicos en la base del estilo en la mayoría de los pistilos procedentes de flores dejadas a polinización libre ha confirmado que la falta de cuajado observada en los cultivares y plantaciones analizados se debe a problemas de autoincompatibilidad. La auto(in)compatibilidad no ha sido analizada en muchos cultivares de ciruelo japonés, aunque se conoce que la especie *P. salicina* es autoincompatible (Dorsey, 1919; Ramming y Cociu, 1990) y tradicionalmente la incompatibilidad polen-pistilo se ha considerado como un importante condicionante del cultivo (Okie, 2006). En algunos cultivares se han realizado estudios de auto(in)compatibilidad, pero únicamente mediante observaciones de cuajado en campo, lo que ha producido resultados contradictorios en algunos de los cultivares que se han determinado como autoincompatibles en este trabajo ('Fortune', 'Golden Globe' y 'Songold'). 'Fortune' (Ramming y Tanner, 1993) y 'Golden Globe' (Ramming, 1994) han sido descritos tanto como autoincompatibles y también como parcialmente autocompatibles (Montagnon, 2002), y 'Songold' se ha descrito como parcialmente autocompatible (Montagnon, 2002) y autoincompatible (Hurter, 1972). Así, en este trabajo se ha establecido por primera vez la autoincompatibilidad de los cultivares Blackamber, Black Gold, Black Star, Earliqueen, Golden Japan y Larry Ann y se ha aclarado que Fortune, Golden Globe y Songold también son autoincompatibles.

Aunque la mayoría de cultivares de ciruelo japonés se han considerado autoincompatibles, también se conocen algunos autocompatibles, como 'Santa Rosa'

(Crane y Lawrence, 1929), 'Laetitia' (Ramming y Cociu, 1990), 'Beauty', 'Honey Rosa', 'Late Santa Rosa' y 'Rio' (Beppu *et al.*, 2005). Mediante el análisis de la herencia de los alelos en descendencias de los cultivares 'Beauty', 'Honey Rosa', 'Late Santa Rosa', 'Rio' y 'Santa Rosa', se ha correlacionado el carácter de autocompatibilidad con la presencia en el genotipo del alelo *Se* (Beppu *et al.*, 2005, 2010b). Sin embargo, tres cultivares estudiados en este trabajo que se comportaron como autoincompatibles [Black Gold (*SeSh*), Black Star (*SeSf*) y Earliqueen (*SeSh*)] tienen el alelo *Se*. Hasta el momento no se han determinado las causas por las que unos genotipos con alelo *Se* se comportan como autocompatibles y otros como autoincompatibles. Una posible explicación es que algunos cultivares tengan una versión no mutada del alelo *Se* que no sea autocompatible. Otra posibilidad es que un alelo de tamaño parecido al alelo *Se* esté siendo identificado erróneamente como *Se*. Para esclarecer esta situación sería necesario el clonado y secuenciación de estos alelos con el fin de identificar diferencias que puedan ser correlacionadas con el fenotipo.

Los resultados de este trabajo indican que 'Friar' es autocompatible, aunque con anterioridad se ha descrito tanto como autocompatible (Ramming y Cociu, 1990) como autoincompatible (Brooks y Olmo, 1997). Las oscilaciones de cuajado observadas en plantaciones de este cultivar podrían no deberse a problemas de autoincompatibilidad, sino a otros factores (Capítulo 2). El hecho de que este cultivar no presenta el alelo *Se* confirma la posible existencia de otras fuentes de autocompatibilidad distintas al alelo *Se* en ciruelo japonés (Capítulo 4; Guerra *et al.*, 2009; Beppu *et al.*, 2010b).

En los dos cultivares en los que no se ha podido determinar su auto(in)compatibilidad, 'Angelino' y 'Black Diamond', tampoco existen resultados concluyentes en otros trabajos. Mientras 'Angelino' se ha considerado parcialmente autocompatible (Montagnon, 2002), 'Black Diamond' se ha considerado tanto autocompatible (Crane y Lawrence, 1929) como autoincompatible (Calzoni y Speranza, 1998). Sería necesario analizar el comportamiento de flores autopolinizadas de ambos cultivares en nuevos ensayos para determinar su auto(in)compatibilidad.

En los cruces realizados entre cultivares con al menos un alelo *S* diferente se obtuvo cuajado en los ensayos de campo, salvo en el cruce 'Angelino' x 'Larry Ann' en la finca de Aragón. Sin embargo, este cruce sí presentó cuajado en la finca de

Extremadura, lo que indica que la falta de cuajado en este caso podría deberse a factores diferentes a la incompatibilidad polen-pistilo. En los pistilos de los cruces entre cultivares de diferente genotipo *S* también se observaron tubos polínicos en la base del estilo, con la excepción de los dos cruces realizados sobre flores del cultivar 'Golden Japan' ('Golden Japan' x 'Ambra' y 'Golden Japan' x 'Friar'), en los que no se observó ningún pistilo con tubos polínicos alcanzando la base del estilo. Sin embargo, en algunos de los pistilos de este cultivar se observaron tubos polínicos alcanzando el 60% del estilo, lo que indica que podrían haber superado la barrera de incompatibilidad y no habrían alcanzado la base del estilo por otros factores diferentes a la incompatibilidad.

Por otro lado, en los cruces entre cultivares autoincompatibles con el mismo genotipo *S* y que por tanto serían incompatibles entre sí, no se obtuvo cuajado en campo ni se observaron pistilos con tubos polínicos alcanzando la base del estilo, lo que confirma los resultados esperados. Sin embargo, en los cruces 'Friar' x 'Larry Ann' y en 'Golden Globe' x 'Fortune' se obtuvo cuajado a pesar de que los dos cultivares de cada cruce presentaron el mismo genotipo *S*. En el primer caso, al ser 'Friar' autocompatible, es esperable que exista cuajado a pesar de que ambos cultivares tengan el mismo genotipo. En el otro cruce, 'Golden Globe' x 'Fortune', sólo se observaron tubos polínicos en la base del estilo en dos pistilos procedentes del ensayo de campo, por lo que podría tratarse de un problema de contaminación de algunas flores con polen procedente de otro cultivar compatible. En este caso sería necesario realizar nuevos ensayos para confirmar o descartar la incompatibilidad del cruce.

En algunas autopolinizaciones y cruces no se pudo observar el comportamiento de los tubos polínicos, ya que se descartaron todos los pistilos polinizados, tanto en campo como en laboratorio, por no tener granos de polen germinados en el estigma ni por tanto tubos polínicos en el estilo. La falta de germinación del polen podría deberse a problemas de viabilidad del polen utilizado o a problemas de receptividad de los pistilos. Sin embargo, el hecho de que el polen de la mayoría de los cultivares utilizados en 2009 y 2010 fuera viable (Capítulo 2) apunta a un problema de falta de receptividad de los pistilos. Esta situación se centra principalmente en los cruces y autopolinizaciones realizados en 'Angelino', 'Black Diamond' y 'Fortune'. En dos de estos cultivares, Black Diamond y Fortune, se ha visto

que la emasculación de las flores produce una degeneración prematura de los óvulos que impide la fecundación (Capítulo 7). Aunque no se ha analizado en este trabajo, las flores de estos cultivares podrían verse afectadas por el manejo de los pistilos en las polinizaciones controladas, por lo que sería necesario aumentar el número de flores analizadas u optimizar el proceso de preparación y polinización de pistilos para poder caracterizar el comportamiento de los tubos polínicos en las flores de estos cultivares. En los cruces en los que no se pudo determinar el comportamiento de los tubos polínicos fue necesaria la combinación de los datos de cuajado en campo con la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad para determinar las relaciones de (in)compatibilidad. Esta situación realza la complementariedad de las distintas aproximaciones utilizadas en este trabajo, combinando ensayos de campo, de microscopía y de marcadores moleculares, para poder establecer las relaciones de compatibilidad entre algunos cultivares.

El genotipo *S* de los cultivares analizados coincidió con lo descrito en otros trabajos para distintas accesiones de los mismos cultivares (Beppu *et al.*, 2002; Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Capítulos 4 y 5), excepto en ‘Nubiana’, ‘Friar’ y ‘Golden Globe’. En el caso del cultivar Nubiana, se ha analizado material vegetal procedente de dos plantaciones diferentes, identificándose como *SbSc* en la plantación de Aragón y *SbSh* en la de Extremadura. Este cultivar proviene del cruce de ‘Gaviota’, de alelos desconocidos, y ‘Eldorado’ (Brooks y Olmo, 1997). Ya que los alelos de ‘Eldorado’ son *SbSh* (Capítulos 4 y 5), ambos genotipos detectados en ‘Nubiana’ podrían ser correctos. Sin embargo, ‘Nubiana’ también se ha descrito como *SbSh* en otra accesión (Capítulo 4), por lo que sus alelos más probables serían *SbSh*, pudiendo ser la accesión de Aragón otro cultivar diferente. El cultivar Friar ha sido descrito como *SbSh* en este trabajo, mientras que otros autores lo han descrito como *ShSk* (Halász *et al.*, 2007). Este cultivar proviene del cruce de ‘Gaviota’, cuyos alelos no se conocen, y ‘Nubiana’, que se ha descrito como *SbSh* y *SbSc* (Capítulos 4 y 5), por lo que no se puede descartar ninguno de los dos posibles genotipos ni deducir cuál es la accesión correcta de ‘Friar’ a partir de la información de sus alelos de incompatibilidad. La posible denominación de distintos genotipos con el mismo nombre explicaría que se hayan obtenido resultados contradictorios en los ensayos de auto(in)compatibilidad realizados en este cultivar (Ramming y Cociu, 1990; Capítulo 4). Sería por tanto de

interés dilucidar cuál es el genotipo correcto de 'Friar' mediante su comparación con material vegetal de referencia. El cultivar Golden Globe, descrito en este trabajo como *SbSc*, ha sido identificado como *SbSf* en una accesión de otra procedencia (Capítulo 4). Ya que los parentales de este cultivar son 'Queen Ann' (*SbSh*) y 'Laroda' (*SbSc*) (Ramming, 1994), sus alelos más probables serían *SbSc*, lo que indica que el genotipo correcto de 'Golden Globe' podría ser el analizado en este trabajo.

La observación del crecimiento de tubos polínicos ha permitido establecer la autoincompatibilidad de 9 cultivares, lo que explica los problemas de cuajado observados en esos cultivares en las plantaciones estudiadas. La determinación de las relaciones de (in)compatibilidad mediante la identificación de los alelos *S* y la observación del comportamiento de los tubos polínicos ha permitido seleccionar para cada cultivar autoincompatible al menos un cultivar polinizador compatible y coincidente en floración en cada plantación estudiada. Una vez identificada la incompatibilidad polen-pistilo como causa de los problemas de cuajado observados en los principales cultivares, en el siguiente capítulo se van a estudiar los alelos *S* de incompatibilidad de la mayoría de los cultivares de ciruelo japonés cultivados en la actualidad.





A black and white micrograph showing a cross-section of plant tissue. A needle is inserted into the tissue, likely for a specific procedure. The tissue shows various cellular structures, including what appears to be a large, circular structure in the upper left. The overall texture is fibrous and layered.

**PARTE II**

**IDENTIFICACION DE GENOTIPOS S  
Y  
GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD**



#### 4. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO S Y ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD MEDIANTE PCR Y ENSAYOS DE POLINIZACIÓN EN CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS <sup>1</sup>

##### RESUMEN

La mayoría de cultivares de ciruelo japonés son autoincompatibles y necesitan polinización cruzada para asegurar el cuajado. En este trabajo se ha identificado el genotipo *S* de 68 cultivares de ciruelo japonés mediante amplificación de sus *SRNasas* por PCR, lo que ha permitido asignarlos a sus correspondientes grupos de incompatibilidad. Los alelos de *SRNasas* de 50 de estos cultivares han sido analizados por primera vez en este trabajo, y se han descrito cinco nuevos alelos de incompatibilidad (*So*, *Sp*, *Sq*, *Sr* y *Ss*). Los resultados obtenidos, junto con la información obtenida en otros trabajos, han permitido describir 12 nuevos grupos de incompatibilidad (VIII-XIX). La auto(in)compatibilidad de 23 de los cultivares y las relaciones de (in)compatibilidad entre los distintos grupos de incompatibilidad se analizaron mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos en flores procedentes de ensayos de autopolinización y polinización cruzada. Cinco cultivares se comportaron como autocompatibles, pero dos de ellos no tienen el alelo *Se* que ha sido correlacionado con el carácter de autocompatibilidad. Por lo tanto, otras fuentes de autocompatibilidad diferentes al alelo *Se* parecen estar involucradas en la autocompatibilidad en ciruelo japonés.

---

<sup>1</sup>Guerra, M.E., Rodrigo, J., López-Corrales, M., Wunsch, A. (2009) *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding*, 128, 304-311. doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01552.x. (Anexo 1).

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las ciruelas cultivadas para consumo en fresco pertenecen principalmente a dos especies, el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) y el ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.). La producción mundial de ciruela alcanzó los diez millones y medio de toneladas en 2009 (FAOSTAT, 2011), siendo España el octavo productor. Aunque el ciruelo japonés es originario de China, su cultivo se inició en Japón (Yoshida, 1987), desde donde fue introducido en Estados Unidos a finales del siglo XIX. En Estados Unidos, genotipos de *P. salicina* fueron utilizados en programas de mejora e hibridados con otros ciruelos diploides como *P. americana*, *P. hortelana*, *P. munsoniana*, *P. simonii* y *P. cerasifera* (Okie y Weinberger, 1996), dando lugar a un grupo heterogéneo de ciruelos diploides que provienen de la hibridación interespecífica de estas especies y que hoy en día se identifican con el término 'ciruelo japonés'.

La mayoría de los cultivares de ciruelo de tipo japonés son autoincompatibles (Okie y Weinberger, 1996; Capítulo 3), y por lo tanto es necesario interplantar cultivares polinizadores para asegurar el cuajado. La autoincompatibilidad es un mecanismo de las plantas que previene la autofecundación (De Nettancourt, 2001). Otras especies del género *Prunus* incluidas en la familia de las Rosáceas, como almendro (*P. dulcis*), albaricoquero (*P. armeniaca*) o cerezo (*P. avium*), también presentan autoincompatibilidad de tipo gametofítica (GSI; De Nettancourt, 2001). La reacción de autoincompatibilidad gametofítica está genéticamente controlada por el locus multialélico *S*, que codifica dos genes ligados que determinan el fenotipo del polen y del pistilo (Kao y Tsukamoto, 2004). En este mecanismo, cuando el alelo *S* del grano de polen (haploide), es diferente de los dos alelos *S* del tejido del estilo (diploide), el tubo polínico generado por ese grano de polen puede crecer a través del estilo y fecundar el óvulo. Por otra parte, cuando el alelo *S* expresado en el polen es igual a alguno de los expresados en el pistilo, el tubo polínico se detiene en el estilo, impidiendo así la fecundación. En las especies autoincompatibles de la familia de las Rosáceas, el determinante *S* del pistilo es una ribonucleasa, SRNasa (Tao *et al.*, 1997, 1999), que inhibe el crecimiento del tubo polínico por degradación de su ARN (McCubbin y Kao, 2000). Por otro lado, el determinante *S* del polen es una proteína F-

box, SFB (Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003), que parece estar involucrada en una ruta de degradación de proteínas (Ushijima *et al.*, 2003).

Una polinización adecuada es necesaria para la obtención de cuajado en ciruelo japonés (Capítulo 2), por lo que el conocimiento del grupo de incompatibilidad al que pertenece cada cultivar es esencial para el diseño de nuevas plantaciones. Existen diferentes métodos para la determinación de la compatibilidad entre cultivares, como los ensayos de polinización y cuajado en campo y la observación del crecimiento de tubos polínicos en flores provenientes de cruces controlados. La clonación y caracterización de los factores del locus *S* en distintas especies de frutales de la familia de las Rosáceas han permitido el desarrollo de métodos de PCR que han acelerado la identificación de los alelos *S* sin la necesidad de disponer de flores. La caracterización de las *SRNasas* en ciruelo japonés (Yamane *et al.*, 1999) permitió el desarrollo de métodos de PCR basados en *SRNasas* (Beppu *et al.*, 2002, 2003), de forma similar a lo desarrollado en otras especies autoincompatibles de *Prunus* como el almendro (Tamura *et al.*, 2000), el cerezo (Tao *et al.*, 1999) o el albaricoquero japonés (Yaegaki *et al.*, 2001). En ciruelo japonés, 'Sordum' fue el primer cultivar en el que se caracterizó el locus *S* (Yamane *et al.*, 1999). Más tarde, se determinaron las *SRNasas* de los alelos de 36 cultivares mediante PCR, y se identificaron 14 alelos (*Sa-Sn*) (Beppu *et al.*, 2002, 2003). Cinco *SRNasas* (*S<sub>1</sub>, S<sub>3</sub>-S<sub>6</sub>*) fueron clonadas posteriormente por Sapir *et al.*, (2004). Posteriormente se determinaron los alelos *S* de otros 10 cultivares y se estableció la correspondencia entre las dos nomenclaturas descritas hasta el momento, alfabética y numérica (Halász *et al.*, 2007). Estos estudios dieron como resultado el genotipado de 49 cultivares, que fueron asignados a siete grupos de incompatibilidad diferentes (Halász *et al.*, 2007).

Aunque la mayoría de los cultivares de ciruelo japonés son autoincompatibles, también existen algunos autocompatibles como 'Black Diamond' (Crane y Lawrence, 1929), 'Friar', 'Laetitia' y 'Santa Rosa' (Ramming y Cociu, 1990). El carácter de autocompatibilidad se ha correlacionado con la presencia del alelo *Se* en los cultivares Beauty (*ScSe*), Late Santa Rosa (*ScSe*), Rio (*SaSe*) y Santa Rosa (Beppu *et al.*, 2005, 2010b). La autocompatibilidad en el haplotipo *Se* parece estar causada por una insuficiente acumulación de la *SRNasa* del alelo *Se* debido al bajo nivel de transcripción de ésta en el pistilo (Watari *et al.*, 2007).

El objetivo de este estudio es determinar las relaciones de (in)compatibilidad de los principales cultivares de ciruelo japonés cultivados en la actualidad. Para ello, se ha establecido el genotipo de la *SRNasa* de 68 cultivares mediante PCR. Para confirmar los resultados obtenidos mediante PCR y para analizar el carácter de auto(in)compatibilidad de los cultivares analizados y la (in)compatibilidad entre los cultivares pertenecientes a los diferentes grupos, también se han realizado observaciones al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos de flores autopolinizadas y de flores provenientes de polinizaciones cruzadas.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Material vegetal**

Para el análisis de las *SRNasas* y los ensayos de polinización, se utilizaron muestras de hojas y flores de 68 cultivares de ciruelo de tipo japonés (Tabla 4.1), que fueron recogidas en diferentes colecciones, parcelas de experimentación y fincas comerciales de Extremadura, Aragón, Cataluña y Japón (Anexo 2).

### **4.2.2 Análisis de alelos S mediante PCR**

El ADN genómico de los 68 cultivares fue extraído de hojas jóvenes, siguiendo el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) con modificaciones (Hormaza, 2002) (Capítulo 3). El ADN obtenido fue cuantificado y diluido a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l antes de la amplificación mediante PCR. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, en 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM  $Cl_2Mg$ , 0,1 mM de cada dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada cebador, 40 ng de ADN genómico y 0,45 U de *Taq* ADN polimerasa, usando el siguiente programa de temperaturas: un paso inicial de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C y 3 min a 72°C, y un paso final de 7 min a 72°C. La combinación de cebadores usados para la amplificación por PCR fue PruT2-PCER, PruC2-PCER, y PruC2-C5rev (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2001; Wünsch y Hormaza, 2004). Los fragmentos amplificados se separaron usando electroforesis en geles de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron

con luz ultravioleta. La estimación de los tamaños de los fragmentos se realizó usando un marcador de tamaño de 1 kb y un transiluminador, que permitió determinar el tamaño de los fragmentos usando el programa de análisis de imagen Quantity One 1-Analysis 4.6.2 (Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.).

### 4.2.3 Ensayos de polinización

Para establecer la auto(in)compatibilidad y confirmar las relaciones de (in)compatibilidad entre los diferentes cultivares, se realizaron en el laboratorio 23 autopolinizaciones (Tabla 4.2) y 35 polinizaciones cruzadas (Tabla 4.3); en una segunda fase (datos no incluidos en Guerra *et al.*, 2009) se realizaron 77 cruces y 7 autopolinizaciones adicionales (Anexo 6). En flores de todos los cruces y autopolinizaciones se observó el crecimiento de los tubos polínicos mediante microscopía de fluorescencia. Para ello, se recogieron flores de cada cultivar en estado de botón globoso un día antes de la antesis, se emascularon para evitar la autopolinización y se colocaron sobre espuma de florista húmeda a temperatura ambiente (Apartado 3.2.3, Capítulo 3). Se utilizaron entre 20 y 25 flores por cruce, que 24 h después de la emasculación fueron polinizadas manualmente con el polen correspondiente. Para la obtención del polen se recogieron flores en estado de botón globoso de cada cultivar, se extrajeron las anteras y fueron colocadas sobre papel a temperatura ambiente durante 24 h o hasta que se produjo la dehiscencia de las mismas (Apartado 2.2.2, Capítulo 2). El polen fue colado usando una malla fina (con luz de malla de 0,26 mm) y almacenado a -20°C hasta su uso. Setenta y dos horas después de la polinización, los pistilos fueron fijados en FAA [etanol (70%): ácido acético: formaldehído (18:1:1, v/v/v) (Johansen, 1940)]. Cada cruce fue repetido al menos durante dos años.

Para preparar las muestras para su observación al microscopio, los pistilos fijados se lavaron tres veces durante una hora con agua destilada y se dejaron en sulfito sódico al 5% a 4°C durante 24 h. Al día siguiente, los pistilos fueron autoclavados a 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 8 min en sulfito sódico al 5% para ablandar los tejidos (Jefferies y Belcher, 1974), y teñidos con azul de anilina al 0,1% en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N (v/v) para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957). El crecimiento de los tubos

polínicos a lo largo del estilo fue observado en un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) con epifluorescencia para luz ultravioleta, usando un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1 Determinación de alelos S mediante análisis de PCR**

En el análisis de PCR se han usado cebadores de las regiones conservadas de las *SRNasas* de cerezo y ciruelo, con los que se ha identificado el genotipo de los 68 cultivares de ciruelo japonés analizados (Tabla 4.1). Inicialmente se analizaron cultivares de los que se conocía su genotipo para determinar el tamaño de los fragmentos correspondientes a los alelos *Sa-Sf*, *Sh* y *Sk*, utilizando los cebadores PruT2-PCER y PruC2-PCER (Tabla 4.4). Esta información se utilizó para determinar los alelos *S* del resto de cultivares (Fig. 4.1).

Posteriormente, el alelo *Sg* fue detectado en 'Golden Japan', ya que el tamaño amplificado en este cultivar coincidía con el descrito previamente en el cultivar White Plum (Beppu *et al.*, 2002) (Tabla 4.4). La amplificación de fragmentos de tamaño diferente a los ya descritos fueron considerados como correspondientes a nuevos alelos, identificándose cinco nuevos alelos (*So*, *Sp*, *Sq*, *Sr*, *Ss*) en los cultivares Ambra (*So*), October Red (*Sp*), Mitard (*Sq*) y Joana Red (*SrSs*) (Tabla 4.4). Estos nuevos alelos se nombraron usando la nomenclatura alfabética de forma consecutiva a los previamente descritos (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003). En total se identificaron 14 alelos *S* distintos en los 68 cultivares analizados (Tabla 4.4).

Tres alelos (*Sg*, *Sr*, *Ss*) únicamente fueron amplificados con el par de cebadores PruC2-PCER y no con el par PruT2-PCER, por lo que se utilizó un tercer par de cebadores, PruC2-C5rev. Con estos cebadores fue posible amplificar fragmentos adicionales que permitieron amplificar todos los alelos *S* identificados, confirmando la amplificación de las *SRNasas* (Tabla 4.4). El uso del par de cebadores PruC2-C5rev permitió amplificar todos los alelos detectados, con la excepción de los alelos *Sg* y *Sp*. Por lo tanto, el alelo *Sg* fue únicamente amplificado con el par PruT2-PCER. Los



tamaños de los 14 alelos *S* detectados con los tres pares de cebadores se describen en la tabla 4.4.

**Tabla 4.1.** Grupos de incompatibilidad (G. I.) y alelos *S* de 68 cultivares descritos en este trabajo y 49 cultivares analizados en trabajos previos.

G. I.	Genotipo <i>S</i>	Cultivares analizados en este trabajo	Cultivares analizados en trabajos previos	Referencias				
I	<i>SaSb</i>	606 <sup>1</sup>	Burmosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003				
		Red Beaut Sordum		Beppu <i>et al.</i> , 2002 Yamane <i>et al.</i> , 1999				
II	<i>SbSc</i>	Blackamber Black Beaut <sup>1</sup> Delbartazur <sup>1</sup>	Flavor Granade	Halász <i>et al.</i> , 2007				
		Fortune <sup>1</sup> Golden Plumza <sup>1</sup> Green Sun <sup>1,3</sup> Laroda October Sun		Beppu <i>et al.</i> , 2002 Halász <i>et al.</i> , 2007				
		TC Sun Zanzi Sun <sup>1</sup>		Oishinakata Super Giant Taiyo Halász <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2002 Halász <i>et al.</i> , 2007				
		Frontier Golden Globe <sup>1</sup>		Beppu <i>et al.</i> , 2003				
				Gran Colle Verna Delicious Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003				
		IV		<i>SbSh</i>	Eldorado <sup>1</sup> Freedom <sup>1</sup> Friar <sup>1,3</sup>	Heibaoshi	Zhang <i>et al.</i> , 2007	
					Hirome Red <sup>1</sup> Larry Ann <sup>1</sup> Nubiana <sup>1</sup>			
					Owen T <sup>1</sup> Queen Ann Songria 10 <sup>1</sup>			Qiuji Zhang <i>et al.</i> , 2007
								Beppu <i>et al.</i> , 2002
								Yonemomo Beppu <i>et al.</i> , 2002
V	<i>SbSi</i>		Bakemonosumomo Kasahara Hatankyou	Beppu <i>et al.</i> , 2002 Beppu <i>et al.</i> , 2003				
		VI	<i>SfSh</i>	Abundance Kelsey <sup>3</sup> Kelsey Paulista Younai	Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Zhang <i>et al.</i> , 2007			

*Genotipo S y grupos de incompatibilidad*

<b>G. I.</b>	<b>Genotipo S</b>	<b>Cultivares analizados en este trabajo</b>	<b>Cultivares analizados en trabajos previos</b>	<b>Referencias</b>
VII	<i>ScSh</i>	Angelenex <sup>1</sup> Angeleno  Queen Rosa Ruby Crunch <sup>1</sup>	Green Sun <sup>3</sup> Nvgelei	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Halász <i>et al.</i> , 2007 Halász <i>et al.</i> , 2007 Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2003
VIII <sup>2</sup>	<i>SeSh</i>	Black Diamond Black Gold <sup>1</sup> Black Late <sup>1</sup> Diamex <sup>1</sup> Earliqueen <sup>1</sup> Extremagold <sup>1</sup>  John W <sup>1</sup> Laetitia <sup>1</sup> Showtime <sup>1</sup> Souvenir <sup>1</sup>	Huangjiazuanishi	Sapir <i>et al.</i> , 2004          Zhang <i>et al.</i> , 2007
IX <sup>2</sup>	<i>SfSg</i>	Golden Japan <sup>1</sup>	Jinshali White Plum	Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2002
X <sup>2</sup>	<i>ShSk</i>	31-SG-6 <sup>1</sup>  Golden Plum <sup>1,3</sup> Howard Sun <sup>1</sup>  Songgold <sup>1</sup>	Friar <sup>3</sup>  Redgold	Halász <i>et al.</i> , 2007   Zhang <i>et al.</i> , 2007
XI <sup>2</sup>	<i>ScSe</i>	Autum Giant <sup>1</sup>  Black Splendor <sup>1</sup> Casselman <sup>1</sup>  Royal Zee Royal Garner <sup>1</sup> Santa Rosa	Beauty  Late Santa Rosa Meiguili  Sweet Autum	Beppu <i>et al.</i> , 2002       Beppu <i>et al.</i> , 2002; Halász <i>et al.</i> , 2007 Halász <i>et al.</i> , 2007
XII <sup>2</sup>	<i>SbSe</i>	Pioneer <sup>1</sup> Sapphire <sup>1</sup>	Flavor King	Halász <i>et al.</i> , 2007
XIII <sup>2</sup>	<i>SeSf</i>	Black Star <sup>1</sup> Primetime <sup>1</sup>		
XIV <sup>2</sup>	<i>SaSc</i>	87-91 <sup>1</sup> Crimson Glo <sup>1</sup>		
XV <sup>2</sup>	<i>SgSh</i>	30-AN-7 <sup>1</sup>	Bonnie	Beppu <i>et al.</i> , 2003
XVI <sup>2</sup>	<i>SfSk</i>	Kelsey <sup>1,3</sup>	Weikeshum Wickson	Zhang <i>et al.</i> , 2007 Sapir <i>et al.</i> , 2004
XVII <sup>2</sup>	<i>SbSo</i>	Ambra <sup>1</sup> Olinda <sup>1</sup>		

G. I.	Genotipo S	Cultivares analizados en este trabajo	Cultivares analizados en trabajos previos	Referencias
XVIII <sup>2</sup>	<i>SaSf</i>		Ozarkpremier Terada	Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2002
XIX <sup>2</sup>	<i>SbSd</i>		Formosa Furongli Gaixiandali	Beppu <i>et al.</i> , 2003 Zhang <i>et al.</i> , 2007 Zhang <i>et al.</i> , 2007
0	<i>S7Sf</i> <i>SaSe</i> <i>SaSh</i> <i>SaSm</i> <i>SaSn</i> <i>SbSg</i> <i>SbSk</i> <i>SbSl</i> <i>ScSd</i> <i>ScSf</i> <i>ScSo</i> <i>SeS10</i> <i>SeSk</i> <i>SfSj</i> <i>SgSk</i> <i>SgSl</i> <i>ShSp</i> <i>SrSs</i>	Songria 15 <sup>1</sup>        Oishiwasesumomo  Red Heart <sup>1</sup>  Simka    October Red <sup>1</sup> Joana Red <sup>1</sup>	Huangpili Rio  Botan Superior Honey Rosa Harypickstone Lantz Summer Queen  Xiangjiabli  Tecumseh Starkgold Combination	Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2002  Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2002 ; Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2003  Zhang <i>et al.</i> , 2007 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003 Beppu <i>et al.</i> , 2003  Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>Sq</i> <i>Sh</i> <i>Sh</i> <i>Sf</i>	Mitard <sup>1</sup> 26-BD-10 <sup>1</sup> Gaia <sup>1</sup>	Shiro	

<sup>1</sup> Genotipos S descritos por primera vez en este trabajo.

<sup>2</sup> Grupos de incompatibilidad descritos por primera vez en este trabajo.

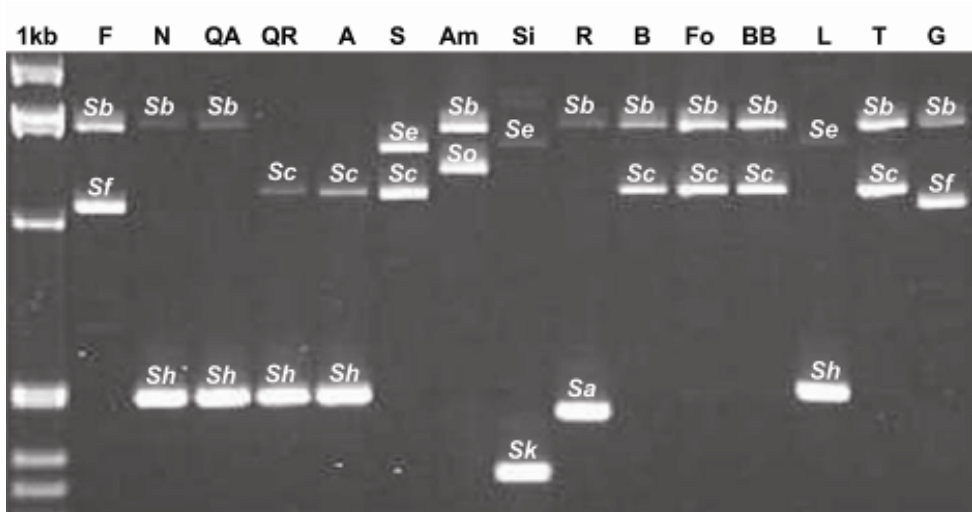
<sup>3</sup> Cultivares cuyo genotipo S descrito aquí difiere del descrito en otros estudios.

**Tabla 4.2.** Cultivares de ciruelo japonés autopolinizados, genotipo S, grupo de incompatibilidad (G.I.) al que pertenecen y porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo.

G.I.	Genotipo S	Cultivar	Pistilos (%)
II	<i>SbSc</i>	Blackamber	0
	<i>SbSc</i>	Fortune	0
	<i>SbSc</i>	Laroda	0
	<i>SbSc</i>	Zanzi Sun	17
	<i>SbSc</i>	Green Sun	0
III	<i>SbSf</i>	Frontier	0
	<i>SbSf</i>	Golden Globe	0
IV	<i>SbSh</i>	Eldorado	0
	<i>SbSh</i>	Friar	0
	<i>SbSh</i>	Nubiana	36
	<i>SbSh</i>	Queen Ann	0
	<i>SbSh</i>	Freedom	0
VII	<i>ScSh</i>	Angeleno	0
	<i>ScSh</i>	Queen Rosa	0
VIII	<i>SeSh</i>	Laetitia	55
IX	<i>SfSg</i>	Golden Japan	0
X	<i>ShSk</i>	Songold	0
	<i>ShSk</i>	Howard Sun	0
	<i>ShSk</i>	Golden Plum	0
XI	<i>ScSe</i>	Casselman	44
	<i>ScSe</i>	Santa Rosa	36
XVII	<i>SbSo</i>	Ambra	0
0	<i>SeSk</i>	Simka	56

**Tabla 4.3.** Cruces entre cultivares de distintos grupos de incompatibilidad y porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base de estilo en cada cruce.

G.I.		II	III	IV	VII	VIII	IX	X	XI
	♀ ♂	Fortune	Frontier	Friar	Angeleno	Black Diamond	Golden Japan	Songold	Santa Rosa
II	Fortune			42	83	50	83	17	42
III	Frontier					50	86		
IV	Friar	83					92	28	
VII	Angeleno					17	31	40	67
VIII	Black Diamond	58		100				67	100
IX	Golden Japan	92		75	50	44		33	43
X	Songold	41		17	4	33	17		42
XI	Santa Rosa		18		50	56		75	



**Figura. 4.1.** Amplificación mediante PCR, con los cebadores PruC2-PCER, de los cultivares de ciruelo japoneses: Frontier (F), Nubiana (N), Queen Ann (QA), Queen Rosa (QR), Angeleno (A), Santa Rosa (S), Ambra (Am), Simka (Si), Red Beaut (R), Blackamber (B), Fortune (Fo), Black Beaut (BB), Laetitia (L), TC Sun (T) y Golden Globe (G). 1kb: estándar de tamaño.

**Tabla 4.4.** Tamaño de los fragmentos de PCR, en pares de bases, de los alelos *S* amplificados con las diferentes combinaciones de cebadores.

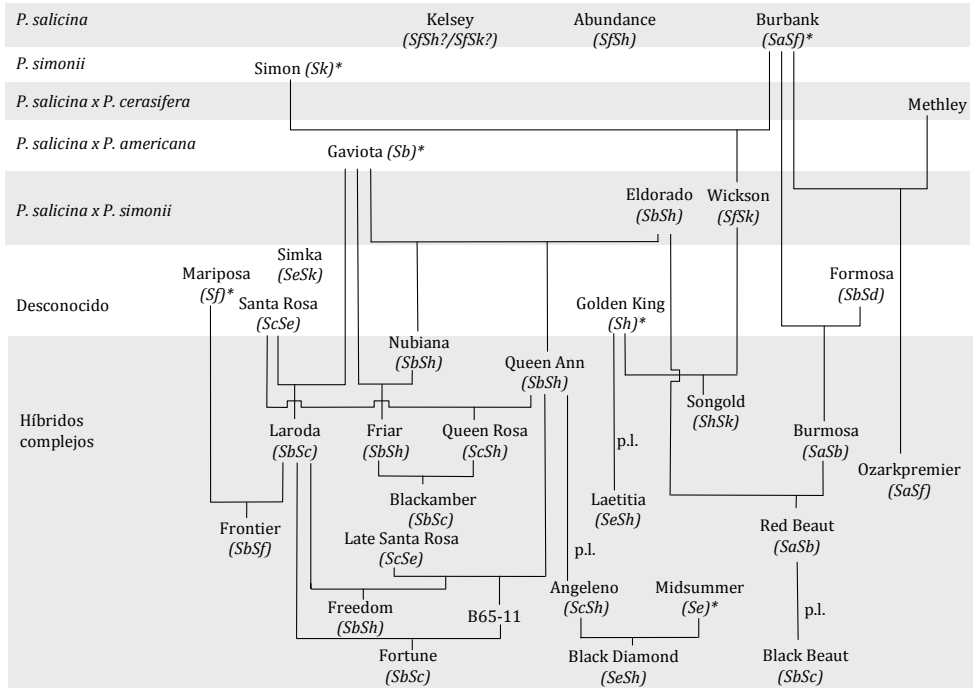
Alelo <i>S</i>	Cultivar	PruT2- PCER	PruC2-PCER	PruC2-C5rev
<i>Sa</i>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	936	466	692
<i>Sb</i>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	1993	1580	1870
<i>Sc</i>	Oishiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	1606	1166	1485
<i>Sd</i>	Oishiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	1780	1290	1600
<i>Se</i>	Santa Rosa ( <i>ScSe</i> )	1865	1441	1680
<i>Sf</i>	Frontier ( <i>SbSf</i> )	1542	1098	1410
<i>Sg</i>	Golden Japan ( <i>SfSg</i> )	n.a	1243	n.a
<i>Sh</i>	Queen Ann ( <i>SbSh</i> )	965	508	750
<i>Sk</i>	Simka ( <i>SeSk</i> )	820	393	630
<i>So</i> <sup>1</sup>	Ambra ( <i>SbSo</i> )	1277	1304	1550
<i>Sp</i> <sup>1</sup>	October Red ( <i>ShSp</i> )	1040	600	n.a
<i>Sq</i> <sup>1</sup>	Mitard ( <i>Sq</i> )	1520	1270	1540
<i>Sr</i> <sup>1</sup>	Joana Red ( <i>SrSs</i> )	n.a	760	1000
<i>Ss</i> <sup>1</sup>	Joana Red ( <i>SrSs</i> )	n.a	580	820

<sup>1</sup>Alelos *S* identificados por primera vez en este trabajo. n.a: no amplificado.

### *Genotipo S y grupos de incompatibilidad*

Los genotipos analizados en este trabajo incluyen 50 cultivares cuyos genotipos *S* no habían sido descritos previamente y 18 cultivares cuyos alelos eran ya conocidos (Tabla 4.1). Además se ha completado el genotipo de algún cultivar, como 'Black Diamond', en el que sólo se había descrito el alelo  $S_5$  (Sapir *et al.*, 2004), que sería posteriormente renombrado como *Se* (Halász *et al.*, 2007), y cuya composición alélica completa detectada en este trabajo es *SeSh*. La información obtenida en este trabajo, junto con el genotipo *S* de 49 cultivares descritos previamente (Tabla 4.1), ha permitido establecer 12 nuevos grupos de incompatibilidad (VIII-XIX). Estos nuevos grupos han sido enumerados en orden consecutivo siguiendo la nomenclatura establecida previamente (Halász *et al.*, 2007). Mientras que 59 de los cultivares analizados han sido asignados a 15 grupos diferentes de incompatibilidad, otros 6 han sido incluidos en el grupo 0, ya que su genotipo no coincide con los descritos en otros cultivares analizados (Tabla 4.1). Los tres restantes no han sido asignados a ningún grupo de incompatibilidad, ya que únicamente se pudo amplificar uno de los alelos (Tabla 4.1).

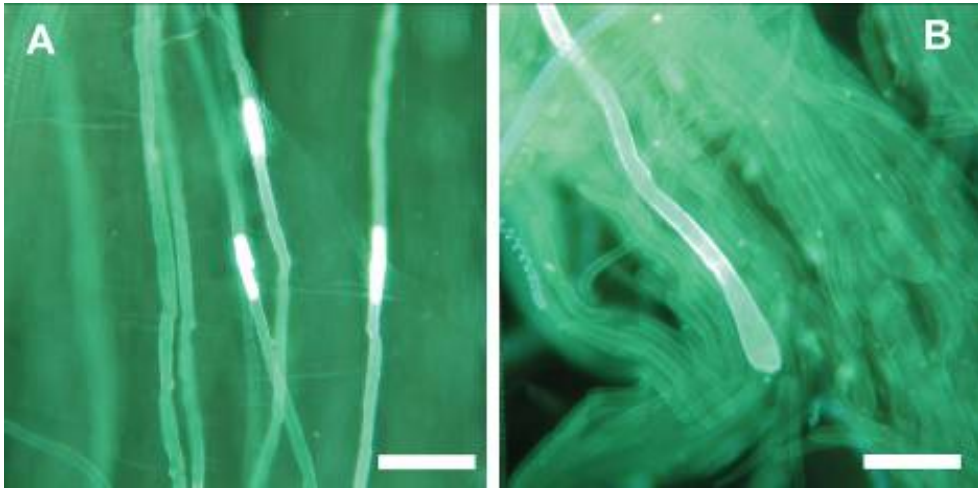
Para confirmar los genotipos *S* obtenidos, la información obtenida en éste y otros trabajos previos se ha incorporado a un árbol genealógico en el que se han incluido los genotipos de los parentales de algunos cultivares relevantes de ciruelo japonés (Fig. 4.2). Los genotipos *S* incluidos en esta figura han sido confirmados mediante la herencia de los alelos *S*, como en el caso de 'Freedom', 'Fortune' o 'Black Beaut'.



**Figura. 4.2.** Pedigrí (Byrne, 1989; Okie y Weinberger, 1996; Boonprakob *et al.*, 2001; Goulão *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2004) y genotipo *S* (Beppu *et al.*, 2002, 2003; Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; este trabajo) de algunos de los principales cultivares de ciruelo japonés. p.l.: Polinización libre; \*: Alelos *S* esperados.

### 4.3.2 Ensayos de polinización

Se observó el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo en flores de 23 cultivares autopolinizados, para determinar su auto(in)compatibilidad (Tabla 4.2). Seis cultivares autopolinizados, Casselman, Laetitia, Nubiana, Santa Rosa, Simka y Zanzi Sun (Tabla 4.2), presentaron porcentajes variables de pistilos con tubos polínicos creciendo a lo largo del pistilo (Fig. 4.3A) y alcanzando la base del estilo. En los 17 cultivares autopolinizados restantes, el crecimiento de los tubos polínicos se detuvo en el pistilo (Fig. 4.3B) y ningún tubo polínico alcanzó la base del estilo (Tabla 4.2).



**Figura. 4.3.** Crecimiento de tubos polínicos en el estilo en un cruce compatible (A). Tubo polínico parado en el estilo en un cruce incompatible (B). Barras = 50  $\mu$ m.

Para confirmar los resultados de (in)compatibilidad entre cultivares obtenidos mediante PCR, se observó el crecimiento de los tubos polínicos en flores de cruces realizados entre cultivares de distintos grupos de incompatibilidad (Tabla 4.3). El comportamiento de los tubos polínicos confirmó los resultados obtenidos mediante PCR. Como se esperaba, los pistilos provenientes de la polinización cruzada entre cultivares de diferentes grupos de incompatibilidad (GI), como por ejemplo ‘Fortune’ (GI II) x ‘Golden Japan’ (GI IX), ‘Friar’ (GI IV) x ‘Fortune’ (GI II) o ‘Angeleno’ (GI VII) x ‘Santa Rosa’ (GI XI), presentaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo (Tabla 4.3).

Para corroborar y completar estos resultados, en una segunda fase (datos no incluidos en Guerra *et al.*, 2009) se observó el crecimiento de los tubos polínicos en flores de otras siete autopolinizaciones y 77 cruces entre cultivares (Anexo 6). Todos los cultivares autopolinizados en esta segunda fase, con la excepción de Rubirosa (Capítulo 6), resultaron autoincompatibles (Anexo 6). Asimismo, todos los cruces entre cultivares autoincompatibles y pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad resultaron compatibles, mientras que los cruces entre cultivares del mismo grupo de incompatibilidad resultaron incompatibles. Únicamente en algunos cruces de cultivares dentro del mismo grupo de incompatibilidad se observaron



relaciones compatibles, lo que generalmente coincidió con cultivares autocompatibles (Anexo 6).

#### 4.4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha identificado el genotipo *S* de 68 cultivares de ciruelo japonés, 50 de los cuales se describen por primera vez. Esta información ha permitido asignar cada cultivar a su correspondiente grupo de incompatibilidad y constituir 12 nuevos grupos de incompatibilidad (VIII-XIX). El análisis de cultivares que no se habían analizado previamente ha permitido identificar cinco nuevos alelos de incompatibilidad (*So*, *Sp*, *Sq*, *Sr*, *Ss*). Además, se han determinado las relaciones de compatibilidad entre los grupos así como el fenotipo de auto(in)compatibilidad de algunos cultivares mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos a lo largo del estilo.

Los resultados obtenidos confirman los genotipos *S* de 15 cultivares descritos previamente. Sin embargo, el genotipo *S* de los cultivares Kelsey (*SfSk*), Green Sun (*SbSc*) y Friar (*SbSh*) difieren de los resultados descritos en trabajos anteriores. El cultivar Kelsey ha sido descrito previamente como *SfSh* (Beppu *et al.*, 2002), y Green Sun y Friar como *ScSh* y *ShSk* respectivamente (Halász *et al.*, 2007). Los dos genotipos identificados en 'Kelsey', *SfSh* (Beppu *et al.*, 2003) y *SfSk* (este trabajo), concuerdan con la posible herencia de los alelos *S* (Fig. 4.2). Por otro lado, de acuerdo con la posible herencia de los alelos *S*, el genotipo de 'Friar' más probable es *SbSh* (Fig. 4.2). Análisis adicionales y la comparación de estos cultivares con otras muestras de los mismos cultivares serían necesarios para clarificar el genotipo *S* de estos cultivares.

Aunque se identificaron dos alelos en la mayoría de los cultivares analizados, en algunos cultivares sólo se pudo identificar un alelo. Esto puede ser debido a una amplificación ineficiente de la PCR en los alelos no detectados debido a diferencias entre los cebadores y las secuencias, o a una amplificación preferencial del alelo detectado. Otra posibilidad puede ser que alelos amplificados de tamaño similar se solapen, dificultando la diferenciación de los alelos. Ensayos de polinización adicionales, así como trabajos moleculares enfocados a la caracterización del locus *S*

de estos genotipos serían necesarios para identificar alelos de *SRNasas* no detectados en este trabajo.

Ocho cultivares autopolinizados resultaron ser autocompatibles. Cuatro de ellos, 'Casselman' (*ScSe*), 'Laetitia' (*SeSh*), 'Santa Rosa' (*ScSe*) y 'Simka' (*SeSk*), tienen el alelo *Se*, y confirman resultados previos que correlacionan el alelo *Se* con la autocompatibilidad (Beppu *et al.*, 2005; Capítulo 6). De forma similar, estos resultados corroboran resultados anteriores que describen la autocompatibilidad de 'Santa Rosa' y 'Laetitia' por Crane y Lawrence (1929) y Ramming y Cociu (1990). Sin embargo, los dos cultivares restantes que se comportaron como autocompatibles, 'Nubiana' (*SbSh*) y 'Zanzi Sun' (*SbSc*), no tienen el alelo *Se*. Se están realizando ensayos adicionales de cuajado para confirmar estos resultados y determinar el origen de la autocompatibilidad en estos genotipos, pero estos resultados sugieren que fuentes adicionales de autocompatibilidad distintas a *Se*, operan en cultivares de ciruelo japonés. Curiosamente ambos cultivares autocompatibles son *Sb*. Este alelo podría estar correlacionado con la autocompatibilidad únicamente en algunos genotipos, ya que descendientes de 'Nubiana' que son también *Sb*, como 'Friar' o 'Blackamber', no se han comportado como autocompatibles en este trabajo. También podría tratarse de que estos cultivares tengan un alelo autocompatible diferente a *Sb* pero de tamaño similar.

Los ensayos de polinización realizados han mostrado que los cultivares de ciruelo japonés presentan un porcentaje variable de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y que el número de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo es en general inferior al observado en otras especies de *Prunus* (Hormaza y Herrero, 1996a; Rodrigo y Herrero, 1996; Burgos *et al.*, 1997; Dicenta *et al.*, 2002; Alonso y Socías i Company, 2005; Hedhly *et al.*, 2005, 2007; Milatović y Nikolić, 2007; Rodrigo *et al.*, 2009; Julián *et al.*, 2010). Por tanto, la determinación de la (in)compatibilidad mediante la observación del crecimiento de tubo polínico no es tan clara como en otras especies de *Prunus*, probablemente debido al hecho de que la mayoría de los cultivares estudiados son híbridos complejos resultantes de la hibridación de más de dos especies de ciruelos diploides, en cuyo caso la reacción de compatibilidad en el estilo puede no ser tan clara como en otros cruces intraespecíficos. Experimentos adicionales de autopolinización, polinización cruzada y cuajado, podrían

complementar esta información para clarificar la reacción de auto(in)compatibilidad en algunos genotipos.

El análisis de los alelos *S* y el pedigrí de algunos de los principales cultivares han permitido predecir el genotipo *S* de cultivares como Burbank, Simon, Gaviota y Mariposa, identificar posibles relaciones genéticas y especular acerca del origen de algunos alelos *S*. Así, los alelos *S* de 'Burbank' serían *SaSf*, de acuerdo a la herencia de los alelos de 'Burmosa' y 'Wickson'. De forma similar, 'Simon' podría ser *Sk*, y 'Gaviota' *Sb*. Ya que el alelo *Sk* únicamente se ha confirmado en el linaje de 'Simon', podría esperarse una relación genética entre 'Simon' y 'Simka', que es también *Sk*. Igualmente, también podría existir una relación entre 'Simka' y 'Santa Rosa'. Se desconoce el pedigrí de estos dos cultivares (Byrne, 1989), pero ambos son autocompatibles y ambos contribuyen con el alelo *Se* en la mejora del ciruelo japonés. La presencia de los alelos *Sh*, *Sf* y *Sa* en los genotipos originales de *P. salicina* y en todos sus descendientes sugiere que estos alelos pueden derivar de los genotipos de *P. salicina*, mientras que la presencia del alelo *Sk* únicamente en los descendientes de 'Simon' podría indicar que este alelo tiene su origen en *P. simonii*. El genotipado *S* de otros cultivares permitirá clarificar y complementar la información disponible del pedigrí.

La identificación de los alelos *S* ha permitido asignar un gran número de cultivares de ciruelo japonés a sus correspondientes grupos de incompatibilidad y la observación del crecimiento de tubos polínicos en flores autopolinizadas ha permitido determinar el comportamiento autocompatible o autoincompatible de algunos cultivares. Esta información puede ser de utilidad para la selección de parentales en programas de mejora y para la elección adecuada de cultivares polinizadores en plantaciones comerciales. Con el fin de disponer de una metodología más eficiente y sensible para la determinación del genotipo *S*, en el siguiente capítulo se describe la puesta a punto y validación de una metodología de PCR para detección de alelos *S* mediante electroforesis capilar y su aplicación en el estudio de nuevos cultivares.



## **5. DETECCIÓN DEL GENOTIPO S DE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS MEDIANTE PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR**

### RESUMEN

La elección de cultivares polinizadores compatibles es esencial para un diseño adecuado de plantaciones de especies autoincompatibles como el ciruelo japonés, por lo que es de gran importancia conocer el genotipo S de los cultivares. En este trabajo se ha desarrollado y validado una metodología para la identificación de alelos S de ciruelo japonés mediante PCR y electroforesis capilar, en 105 cultivares, 33 de ellos analizados por primera vez. Esta técnica permite una determinación más precisa de los tamaños de amplificación y por tanto una mejor diferenciación de los distintos alelos de autoincompatibilidad, así como la automatización de la detección ya que ésta se realiza en un analizador genético. La metodología desarrollada ha resultado eficaz para la detección de alelos de los genes del locus S, *SRNasa* y *SFB*, ha permitido conocer los tamaños de amplificación de 13 alelos diferentes y el genotipo S de 105 cultivares, que han sido asignados a 11 grupos de incompatibilidad. Se han definido 2 nuevos grupos de incompatibilidad (XX y XXI), aumentando el número de grupos descritos de 19 a 21.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un notable incremento en la producción mundial y nacional de ciruelo japonés (FAOSTAT, 2011). Como consecuencia del creciente interés en el cultivo de esta especie, en la actualidad se están introduciendo un gran número de nuevos cultivares que paulatinamente se están implantando en el mercado. La elección de cultivares polinizadores compatibles es esencial para el diseño adecuado de nuevas plantaciones, por lo que la identificación del genotipo *S* de los cultivares, y especialmente de los de reciente introducción, es de gran importancia para el diseño de las plantaciones.

El ciruelo japonés presenta autoincompatibilidad gametofítica (De Nettancourt, 2001). Este mecanismo está genéticamente controlado por un locus multialélico, *S*, que codifica dos genes que determinan el fenotipo del polen y del pistilo (Kao y Tsukamoto, 2004). El determinante del pistilo en especies del género *Prunus* es una ribonucleasa, *S*-RNasa (Tao *et al.*, 1997, 1999), y el determinante del polen es una proteína con una caja *F*, denominada SFB (*S*-haplotype-specific *F*-box gen; Ushijima *et al.*, 2003; Yamane *et al.*, 2003). La clonación y caracterización de estos factores en especies del género *Prunus* ha permitido el desarrollo de métodos bioquímicos y moleculares como RT-PCR (Zhang *et al.*, 2007) y Dot-blot (Kithashiba *et al.*, 2008), además de otros basados en la PCR (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Halász *et al.*, 2007; Sapir *et al.*, 2004, 2007, 2008a, b; Zhang *et al.*, 2008), que permiten la determinación de los alelos *S* de los cultivares sin necesidad de realizar cruzamientos.

En ciruelo japonés, se ha descrito el genotipo *S* de un elevado número de cultivares mediante métodos basados en técnicas de PCR, principalmente de las *SRNasas* (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Sapir *et al.* 2004; Halász *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2009; Capítulos 3, 4 y 6). Estos trabajos han permitido establecer 19 grupos de incompatibilidad y diferenciar 36 alelos *S* distintos. De estos alelos, 19 fueron nombrados alfabéticamente *Sa* a *Ss* (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Halász *et al.*, 2007; Guerra *et al.*, 2009), cinco de ellos también fueron nombrados con números [*Sa* (=S<sub>1</sub>); *Sc* (=S<sub>4</sub>); *Se* (=S<sub>5</sub>); *Sf* (=S<sub>6</sub>); *Sk* (=S<sub>3</sub>); Sapir *et al.*, 2004]; los 17 restantes se enumeraron como *S*<sub>7</sub>, *S*<sub>8</sub>, *S*<sub>10</sub> a *S*<sub>11</sub> y *S*<sub>15</sub> a *S*<sub>27</sub> (Zhang *et al.*, 2008). Las secuencias de 31 de los 36 alelos de la *SRNasa* descritos hasta el momento

han sido publicadas parcial o totalmente por distintos autores (Beppu *et al.*, 2002, 2003; Zhang *et al.*, 2008) (Tabla 5.1). Las secuencias de siete alelos de *SFB* (*SFB-b*, *-c*, *-e*, *-f*, *-g*, *-h* y *-k*) fueron caracterizadas por Sapir *et al.*, (2007). Simultáneamente, Zhang *et al.*, (2007) caracterizaron los mismos alelos de *SFB*, excepto *SFB-k*, y otros tres adicionales (*SFB-a*, *-7* y *-10*) (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Alelos de *SRNasa* y *SFB* secuenciados en ciruelo japonés.

Gen	Alelo	Accesión	Referencia
<i>SRNasa</i>	<i>Sa, Sb, Sc, Sd, Se, Sf, Sh, Si</i>	AB084142, AB084143, AB084144, AB084145, AB084146, AB084147, AB084148, AB084149	Beppu <i>et al.</i> , 2002
<i>SRNasa</i>	<i>Sg, Sj, Sk, Sl, Sm, Sn</i>	AB093131, AB093132, AB093133, AB093134, AB093135, AB093136	Beppu <i>et al.</i> , 2003
<i>SRNasa</i>	<i>S7, S8, S10, S11, S15, S16, S17, S18, S19, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S27</i>	AY781290, AY902455, DQ003310, DQ512908, EF177346, EF177347, EF177348, EF177349, EU113259, EU113260, EU113261, EU113262, EU113263, EU113264, EU113265, EU113266, EU113267	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>SFB</i>	<i>Sb, Sc, Se, Sf, Sg, Sh, Sk</i>	DQ64688, DQ646489, DQ64690, DQ989578, DQ989579, DQ646491, DQ992485	Sapir <i>et al.</i> , 2007
<i>SFB</i>	<i>Sa, S7, S10, Sb, Sc, Se, Sf, Sh</i>	DQ849087, DQ849085, DQ849090, DQ849088, DQ849084, DQ849086, DQ849089, DQ849118	Zhang <i>et al.</i> , 2007

El método molecular más usado en la identificación de alelos *S* en ciruelo japonés ha sido la amplificación mediante PCR de los intrones de la *SRNasa*, utilizando combinaciones diferentes de cebadores complementarios a zonas conservadas de los exones. Después de la amplificación, la determinación de los alelos se realiza mediante la correlación de los tamaños de los fragmentos amplificados, detectados en geles de agarosa mediante electroforesis, con los diferentes alelos [Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2001; Halász *et al.*, 2007; Guerra *et al.*, 2009; (Capítulo 4)]. Para la determinación específica de algunos alelos *S* también se han utilizado cebadores específicos de las secuencias de cada alelo (Sapir *et al.*, 2004, 2008a; Halász *et al.*, 2007, 2008a; Beppu *et al.*, 2010b). Trabajos y metodologías similares han sido utilizados en otras especies del género *Prunus*, como cerezo (Tao *et al.*, 1999), almendro (Tamura *et al.*, 2000) o albaricoquero japonés (Yaegaki *et al.*, 2001), con el objetivo de identificar los diferentes alelos *S* de cada especie. En cerezo, además se ha puesto a punto una metodología que

utiliza la amplificación mediante PCR y la detección de fragmentos mediante electroforesis capilar para identificar los alelos de *SRNasa* y *SFB*, utilizando cebadores de zonas conservadas que flanquean el primer intrón de la *SRNasa* y el intrón de *SFB* de cerezo (Sonneveld *et al.*, 2003, 2006; Vaughan *et al.*, 2005). Esta metodología permite una detección más precisa del tamaño de los fragmentos y por lo tanto una mejor identificación de los alelos, permitiendo además la diferenciación de un mayor número de alelos.

En este trabajo se han utilizado los cebadores diseñados para la detección de alelos S de cerezo mediante electroforesis capilar (Vaughan *et al.*, 2005; Sonneveld *et al.*, 2006) para el análisis de cultivares de ciruelo japonés, con el objetivo de poner a punto en esta especie un método de identificación de alelos S automatizado y más preciso que los métodos de PCR utilizados hasta el momento. Este método permitiría además, como se ha hecho en cerezo, analizar fragmentos de ambos genes del locus S, *SRNasa* y *SFB*.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1 *Material vegetal***

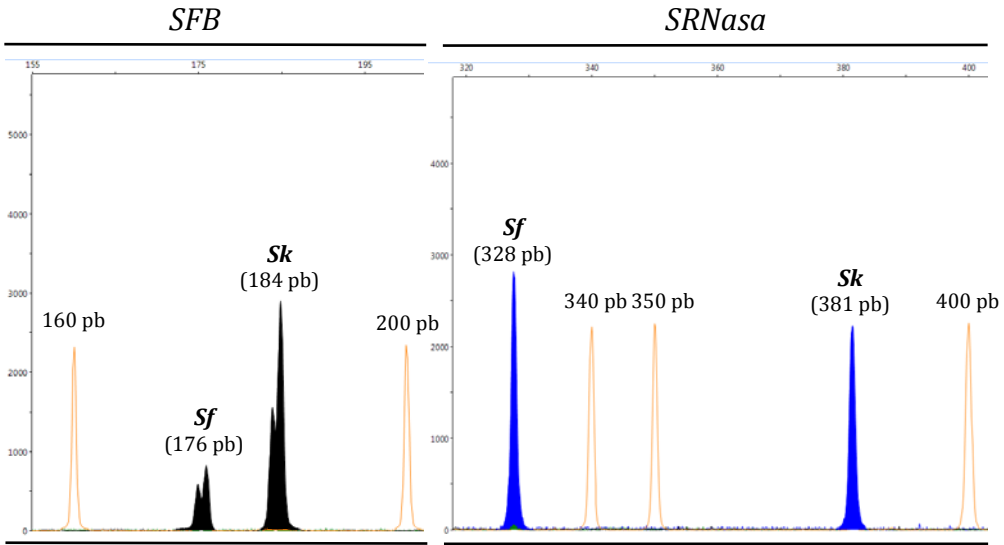
En este trabajo se han analizado 105 cultivares de ciruelo de tipo japonés (Tabla 5.2) procedentes de diferentes colecciones, viveros y fincas comerciales de España, EE.UU. y Japón (Anexo 2). Se incluyen los cultivares más utilizados en la actualidad, otros cultivares de reciente introducción y otros más antiguos pero muy utilizados en programas de mejora.

### **5.2.2 *Identificación del genotipo S mediante PCR y electroforesis capilar***

El ADN genómico de 105 cultivares de ciruelo de tipo japonés fue extraído de hojas jóvenes siguiendo el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) modificado por Hormaza (2002), cuantificado y diluido a una concentración de 10 ng/μl (Apartado 3.2.5, Capítulo 3). El ADN de cada muestra fue utilizado para la identificación de su genotipo S mediante amplificación por PCR de los genes del locus S, *SRNasa* y *SFB*,



utilizando los cebadores desarrollados en cerezo PaConsIF y PaConsIR2 (Sonneveld *et al.*, 2006) para la *SRNasa* y Fbox5'A y FboxIntronR (Vaughan *et al.*, 2005) para el *SFB*. Las reacciones de PCR del gen de la *SRNasa* se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, siguiendo el protocolo de PCR descrito en el capítulo 3 (Apartado 3.2.3). Para las reacciones de PCR del gen *SFB*, las condiciones de amplificación fueron las mismas que para el gen de *SRNasa*, excepto para la temperatura de la fase de anillamiento de la PCR, que se realizó a 55°C en lugar de a 56°C y para la extensión a 72°C, que únicamente se realizó durante 2 min y 30 s. Los cebadores 'forward' utilizados para la amplificación de ambos genes, *SRNasa* y *SFB*, fueron marcados con fluorescencia 6-FAM y NED, respectivamente, y los productos de la PCR fueron detectados mediante electroforesis capilar usando el analizador genético ABI PRISM 310 y/o 3130xl (Applied Biosystems) (Figura 5.1). La estimación de los tamaños de los fragmentos obtenidos se realizó utilizando el software (Peak Scanner™ Software 1.0, Applied Biosystems) y el estándar de tamaño GeneScan™ 500 LIZ ® (Applied Biosystems). Ocho cultivares (Tabla 5.3) de los 105 analizados (Tabla 5.2) fueron elegidos como control para el establecimiento de los tamaños de los diferentes alelos *S* presentes en estos cultivares [Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Sapir *et al.*, 2004; Guerra *et al.*, 2009 (Capítulo 4)] utilizando ambos analizadores genéticos.



**Figura 5.1.** Electroferogramas del analizador genético ABI310 (Applied Biosystems) de fragmentos de PCR de *SFB* (NED, negro) y *SRNasa* (6-FAM, azul) del cultivar Kelsey (*SfSk*). En naranja el estándar de tamaño (500-LIZ, Applied Biosystems).

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.3.1 Detección de alelos *S* mediante electroforesis capilar

En este trabajo se ha desarrollado un método de detección del genotipo *S* en ciruelo japonés que permite una detección más precisa que los métodos de PCR utilizados hasta el momento. El análisis de los cultivares control con dos analizadores genéticos permitió establecer el tamaño de los fragmentos de cada alelo para cada gen, *SRNasa* y *SFB* (Tabla 5.3). Posteriormente, se determinó el genotipo *S* de los 97 cultivares restantes (Tabla 5.2), usando los tamaños correspondientes a cada alelo definidos en los cultivares de control (Tabla 5.3).

La combinación de cebadores PaConsIF-PaConsIR2 (Sonneveld *et al.*, 2006) y Fbox5'A- FboxIntronR (Vaughan *et al.*, 2005) ha sido utilizada por primera vez en ciruelo japonés en este trabajo. Ambos pares de cebadores amplificaron dos fragmentos por cada gen en cada cultivar control, excepto en 'Golden Japan' y 'Joana Red' (Tabla 5.3). En 'Golden Japan', cuyo genotipo es *SfSg* (Capítulo 4), la *SRNasa* del alelo *Sg* no

pudo ser amplificada, pero sí *SFB*, mientras que en 'Joana Red', *SrSs* (Capítulo 4), sólo se amplificó el alelo *Sr*. De este modo, 13 de los 14 alelos *S* descritos en los cultivares control pudieron ser identificados. La identificación únicamente de *SFB* en el alelo *Sg* es probable que esté causada por una baja complementariedad de los cebadores utilizados para la *SRNasa* en este alelo. Por otro lado, la identificación de un único alelo en el cultivar Joana Red, plantea dudas sobre la identidad de este alelo (*Sr*). Es posible que la secuencia complementaria a los cebadores no esté conservada, y que por tanto la PCR sea ineficiente, pero resulta improbable que esto suceda en ambos genes del locus *S* simultáneamente. Serían necesarios nuevos ensayos de cruzamientos junto a la clonación y secuenciación de este alelo para confirmar su especificidad y clarificar su identidad.

Los tamaños de amplificación de los fragmentos en cada cultivar control fueron correlacionados con los 13 alelos (*Sa-Sh, Sk, So-Sr*) descritos en estos cultivares (Tabla 5.3). El rango de tamaño de los fragmentos de la *SRNasa* amplificados para estos alelos fue de 204 a 423 pb, y de 171 pb a 190 pb para *SFB* (Tabla 5.4) en el analizador ABI 310, siendo de 206 a 424pb para *SRNasa* y de 172 a 191 para *SFB* en el analizador ABI 3130xl. Debido al bajo polimorfismo del intrón de *SFB*, la variabilidad de este gen es mucho menor que el de las *SRNasas* y se confirma que es necesario el uso de un método sensible de detección para diferenciar los alelos de *SFB*. A pesar de ello, la combinación de tamaños de ambos genes de *SRNasa* y *SFB* permite una diferenciación inequívoca de los 13 alelos identificados (Tabla 5.3). Los resultados obtenidos en ambos equipos indican una variación en el tamaño detectado de los fragmentos de cada alelo, que varía entre +1 y +2 pb cuando se utiliza el analizador ABI 3130xl. Esta variación debe ser tenida en cuenta, ya que dada la poca variabilidad del intrón de *SFB*, puede llevar a equívocos si se comparan resultados de ambos equipos conjuntamente.

**Tabla 5.2.** Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo *S* de los 105 cultivares de ciruelo japonés analizados en este trabajo.

G. I.	Genotipo <i>S</i>	Cultivar	Referencia
I	<i>SaSb</i>	Burmosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003
		Red Beaut	Beppu <i>et al.</i> , 2002
		Sordum	Yamane <i>et al.</i> , 1999
		606	Capítulo 4
II	<i>SbSc</i>	Blackamber	Halász <i>et al.</i> , 2007
		Black Beaut	Capítulo 4
		Delbartazur	Capítulo 4
		Early Sun <sup>3</sup>	Este trabajo
		Fortune	Capítulo 4
		Golden Globe ( <i>SbSf</i> ) <sup>1</sup>	Capítulo 4
		Golden Plum	Capítulo 4
		Golden Plumza	Capítulo 4
		Green sun	Capítulo 4
		Laroda	Beppu <i>et al.</i> , 2002
		October Sun	Halász <i>et al.</i> , 2007
		SGPR3318 <sup>3</sup>	Este trabajo
		SGPR3726 <sup>3</sup>	Este trabajo
		TC Sun	Halász <i>et al.</i> , 2007
		Zanzi Sun	Capítulo 4
3556 <sup>3</sup>	Este trabajo		
3726 <sup>3</sup>	Este trabajo		
III	<i>SbSf</i>	AU Amber <sup>3</sup>	Este trabajo
		AU Road side <sup>3</sup>	Este trabajo
		Frontier	Beppu <i>et al.</i> , 2003
IV	<i>SbSh</i>	Eldorado	Capítulo 4
		Freedom	Capítulo 4
		Friar	Capítulo 4
		Hiromi Red	Capítulo 4
		Larry Ann	Capítulo 4
		Nubiana	Capítulo 4
		Owen T	Capítulo 4
		Quenn Ann	Beppu <i>et al.</i> , 2002
		Songria 10	Capítulo 4
		E137 <sup>3</sup>	Este trabajo
		E316 <sup>3</sup>	Este trabajo
PR34 <sup>3</sup>	Este trabajo		
VI	<i>SfSh</i>	Black Ruby <sup>3</sup>	Este trabajo
		Mariposa <sup>3</sup>	Este trabajo
VII	<i>ScSh</i>	Angeleno	Sapir <i>et al.</i> , 2004
		Gaia ( <i>Sh</i> ) <sup>2</sup>	Capítulo 4
		Queen Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003
		Ruby Crunch	Capítulo 4

<b>G. I.</b>	<b>Genotipo S</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Referencia</b>
Cont. VII		Sweet August	Capítulo 6
		Royal Diamond <sup>3</sup>	Este trabajo
		Ruby Queen <sup>3</sup>	Este trabajo
		30-an-71 ( <i>SgSh</i> ) <sup>1</sup>	Capítulo 4
		3485 <sup>3</sup>	Este trabajo
VIII	<i>SeSh</i>	Black Diamond	Sapir <i>et al.</i> , 2004
		Black Gold	Capítulo 4
		Black Late	Capítulo 4
		Earliqueen	Capítulo 4
		John W.	Capítulo 4
		Laetitia	Capítulo 4
		PR9 <sup>3</sup>	Este trabajo
		Showtime	Capítulo 4
		Souvenir	Capítulo 4
		26-bd-10 ( <i>Sh</i> ) <sup>2</sup>	Capítulo 4
		3517 <sup>3</sup>	Este trabajo
		3530 <sup>3</sup>	Este trabajo
3575 <sup>3</sup>	Este trabajo		
IX	<i>SfSg</i>	Golden Japan	Capítulo 4
X	<i>ShSk</i>	Howard sun	Capítulo 4
		Songold	Capítulo 4
		31-sg-6	Capítulo 4
		3611 <sup>3</sup>	Este trabajo
		3989 <sup>3</sup>	Este trabajo
XI	<i>ScSe</i>	AU Rosa <sup>3</sup>	Este trabajo
		Autum Giant	Capítulo 4
		Black Splendor	Capítulo 4
		Casselman	Capítulo 4
		Champion	Capítulo 6
		Royal Garnet	Capítulo 4
		Royal Zee	Sapir <i>et al.</i> , 2004
		Rubirosa	Capítulo 6
		Santa Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2002
		Sybarite	Capítulo 6
		E326 <sup>3</sup>	Este trabajo
		3527 <sup>3</sup>	Este trabajo
XII	<i>SbSe</i>	Black Jewell	Capítulo 6
		Freya <sup>3</sup>	Este trabajo
		Pioneer	Capítulo 4
		Saphire	Capítulo 4
		SGPR551 <sup>3</sup>	Este trabajo
		Sparkly <sup>3</sup>	Este trabajo
XIII	<i>SeSf</i>	Black Star	Capítulo 4
		Morris <sup>3</sup>	Este trabajo
		Primetime	Capítulo 4

G. I.	Genotipo <i>S</i>	Cultivar	Referencia
XIV	<i>SaSc</i>	Crimson Glo	Capítulo 4
XV	<i>SgSh</i>	Ruby Sweet <sup>3</sup>	Este trabajo
XVI	<i>SfSk</i>	Kelsey ( <i>SfSh</i> ) <sup>1</sup> Wickson	Beppu <i>et al.</i> , 2003 Sapir <i>et al.</i> , 2004
XVII	<i>SbSo</i>	Ambra	Capítulo 4
XVIII	<i>SaSf</i>	Ozarkpremier	Zhang <i>et al.</i> , 2007
XIX	<i>SbSd</i>	Formosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003
XX <sup>4</sup>	<i>SbSk</i>	3442 <sup>3</sup>	Este trabajo
XXI <sup>4</sup>	<i>SeSk</i>	Simka Simon <sup>3</sup>	Beppu <i>et al.</i> , 2003 Este trabajo
0	<i>SaSk</i> <i>ShSr</i> <i>Sr</i> <i>SqSf</i> <i>ShSp</i> <i>ScSd</i> <i>SaSh</i> <i>Se</i>	Abundance ( <i>SfSh</i> ) <sup>1</sup> Byron Gold <sup>3</sup> Joana Red ( <i>SrSs</i> ) Mitard ( <i>Sq</i> ) <sup>2</sup> October Red Oishiwasesumomo Songria 15 3458 <sup>3</sup>	Beppu <i>et al.</i> , 2003 Este trabajo Capítulo 4 Capítulo 4 Capítulo 4 Capítulo 4 Capítulo 4 Capítulo 4 Este trabajo

<sup>1</sup>: Cultivares que presentaron distinto genotipo *S* al descrito previamente.

<sup>2</sup>: Cultivares cuyo genotipo *S* ha sido completado en este trabajo.

<sup>3</sup>: Cultivares descritos por primera vez en este trabajo.

<sup>4</sup>: Grupos de incompatibilidad descritos por primera vez en este trabajo.

Con el analizador ABI 310 se detectaron dos alelos, *Sa* y *Sh*, con tamaños iguales (388 pb) para la *SRNasa* (Tabla 5.3). Sin embargo, para *SFB* estos alelos presentaron tamaños diferentes, de 174 y 187pb, respectivamente, lo que permitió su diferenciación. De forma similar, el tamaño de los alelos *Sk* y *Sp* (184 pb), *Sb* y *Sr* (185pb), *Sq* y *Sg* (190pb) coincidieron para *SFB*, pero fueron fácilmente diferenciables para el gen de la *SRNasa*. Con el analizador ABI 3130*xl* se identificaron tamaños distintos para todos los alelos detectados de la *SRNasa*, pero para *SFB* se encontraron tamaños iguales para los alelos *Sb* y *Sp* (186pb), *Sc* y *Sg* (190pb), *Sd* y *So* (172 pb) y *Se*, *Sk* y *Sr* (187pb). La diferenciación entre los alelos *Sd* y *So* es compleja, ya que para ambos alelos el tamaño amplificado de *SFB* fue 171 pb en el ABI 310 y 172 pb en el ABI 3130*xl*, y además el tamaño de sus *SRNasas* fue bastante próximo en ambos secuenciadores y alelos, 423/424 pb y 421/422 pb, respectivamente (Tabla 5.3). Esta diferencia en ambos genes, de sólo 2 pb, puede llevar a equívocos si se comparan resultados de diferentes experimentos, por lo que para la diferenciación de estos alelos sería necesario

complementar la identificación utilizando cebadores consenso adicionales (Capítulo 4) o cebadores específicos.

**Tabla 5.3.** Tamaños de productos de PCR (pb) detectados mediante electroforesis capilar con los cebadores PaConsIF-PaConsIR2 (Sonneveld *et al.*, 2006) para *SRNasa* y Fbox5'A-FboxIntronR (Vaughan *et al.*, 2005) para *SFB* en los alelos *S* identificados en los cultivares control con los analizadores genéticos ABI 310 y ABI 3130xl.

Alelos <i>S</i>	Cultivares	Referencia	<i>SFB</i>	<i>SRNasa</i>
			ABI 310 / ABI 3130xl	ABI 310 / ABI 3130xl
<i>Sa</i> ( <i>S</i> <sub>1</sub> ) <sup>1</sup>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	Yamane <i>et al.</i> , 1999	174 /176	388/389
<i>Sb</i>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	Yamane <i>et al.</i> , 1999	185/186	367/369
<i>Sc</i> ( <i>S</i> <sub>4</sub> ) <sup>1</sup>	Oishiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	Beppu <i>et al.</i> , 2002	188/190	343/343
<i>Sd</i>	Oishiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	Beppu <i>et al.</i> , 2002	171/172	423/424
<i>Se</i> ( <i>S</i> <sub>5</sub> ) <sup>1</sup>	Simka ( <i>SeSk</i> )	Beppu <i>et al.</i> , 2003	186/187	372/373
<i>Sf</i> ( <i>S</i> <sub>6</sub> ) <sup>1</sup>	Golden Japan ( <i>SfSg</i> )	Capítulo 4	176/178	328/328
<i>Sg</i>	Golden Japan ( <i>SfSg</i> )	Capítulo 4	190/190	n.a./n.a.
<i>Sh</i>	October Red ( <i>ShSp</i> )	Capítulo 4	187/189	388/390
<i>Sk</i> ( <i>S</i> <sub>3</sub> ) <sup>1</sup>	Simka ( <i>SeSk</i> )	Beppu <i>et al.</i> , 2003	184/187	381/354
<i>So</i>	Ambra ( <i>SbSo</i> )	Capítulo 4	171/172	421/422
<i>Sp</i>	October Red ( <i>ShSp</i> )	Capítulo 4	184/186	370/370
<i>Sq</i>	Mitard ( <i>SfSq</i> )	Capítulo 4	190/191	204/206
<i>Sr</i>	Joana Red ( <i>SrSs</i> )	Capítulo 4	185/187	206/208

<sup>1</sup> Nomenclatura numérica (Sapir *et al.*, 2004). n.a.: no se obtuvo amplificación.

Utilizando las secuencias publicadas de la *SRNasa* se ha podido calcular el tamaño de amplificación esperado con los cebadores PaConsIF y PaConsIR2 para cuatro alelos detectados en este trabajo [*Sa* (AB252411), *Sb* (AB252413), *Sc* (AB280791) y *Se* (AB280793)], cuyos tamaños serían 388, 369, 341 y 372 pb, respectivamente. Estos tamaños coinciden con los tamaños detectados en este trabajo para estos alelos, con una diferencia máxima de +2 pb (Tabla 5.4), corroborando la correcta amplificación de la *SRNasa* con los cebadores utilizados. Con el fin de establecer una correlación de los alelos detectados en este trabajo con otros alelos que tienen nomenclatura numérica (Zhang *et al.*, 2008), también se han estimado los tamaños esperados de *SRNasa* para los alelos *S*<sub>21</sub>, *S*<sub>22</sub>, *S*<sub>24</sub>, *S*<sub>25</sub> y *S*<sub>26</sub> (372, 194, 393, 348 y 314 pb, respectivamente) a partir de las secuencias publicadas. El tamaño esperado para el alelo *S*<sub>21</sub> (372 pb) es el mismo que el

detectado para el alelo *Se* en 'Simka' (Tabla 5.3); sin embargo, se pudo observar que la secuencia genómica de ambos genes es distinta y por tanto se trata de alelos diferentes pero con el mismo tamaño en este fragmento. También se estimó el tamaño esperado de *SFB* con los cebadores Fbox5'A - FboxIntronR en las secuencias registradas de este gen. Únicamente se pudo estimar el tamaño de los alelos cuya secuencia publicada abarca el fragmento de ambos cebadores. En este caso, *Se* (DQ646490) y *Sh* (DQ646491) (187 y 188 pb, respectivamente), cuyos tamaños esperados coincidieron con los tamaños obtenidos para estos alelos en este trabajo (Tabla 5.3). Esta comprobación permitió establecer que los cebadores utilizados estaban amplificando efectivamente los genes deseados.

### **5.3.2 Genotipado S de cultivares de ciruelo japonés**

Una vez establecido el tamaño y diferenciación de alelos *S* mediante electroforesis capilar con los cebadores utilizados, se procedió a analizar el resto de cultivares, hasta un total de 105, utilizando esta metodología. Entre los cultivares analizados se incluyeron los principales cultivares utilizados en la actualidad, cultivares antiguos de gran interés en programas de mejora y cultivares de más reciente introducción. El análisis permitió asignar cada cultivar a su correspondiente grupo de incompatibilidad (Tabla 5.2). Los resultados permitieron completar la determinación del genotipo *S* de 3 cultivares cuyo genotipo había sido descrito parcialmente, Gaia (*Sh*), 26-BD-10 (*Sh*) y Mitard (*Sq*) (Capítulo 4), siendo definidos en este trabajo como *ScSh*, *SeSh* y *SqSf*, respectivamente (Tabla 5.2).

De los 105 genotipos analizados, en 73 de ellos el locus *S* ya había sido descrito previamente por otros autores mediante diferentes métodos (Yamane *et al.*, 1999; Beppu *et al.*, 2002, 2003; Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Capítulo 4), mientras que los 33 cultivares restantes han sido analizados por primera vez en este trabajo (Tabla 5.5). La comparación de los genotipos identificados en los 73 cultivares descritos previamente con los identificados en este trabajo ha permitido validar la metodología, ya que el genotipo fue el mismo en 69 de ellos. Además, en todos los genotipos analizados, los alelos identificados para cada gen, *SFB* y *SRNasa*, fueron los mismos, lo que confirma la ausencia de recombinación entre estos genes. Los 33 cultivares



analizados por primera vez en este trabajo han sido incluidos en 11 de los 19 grupos de incompatibilidad descritos hasta el momento (Halász *et al.*, 2007; Capítulo 4). Se han incorporado dos cultivares al grupo 0 y se han conformando 2 nuevos grupos de incompatibilidad (Tabla 5.2), que se han enumerado de forma consecutiva a los ya descritos, XX (*SbSk*) y XXI (*SeSk*).

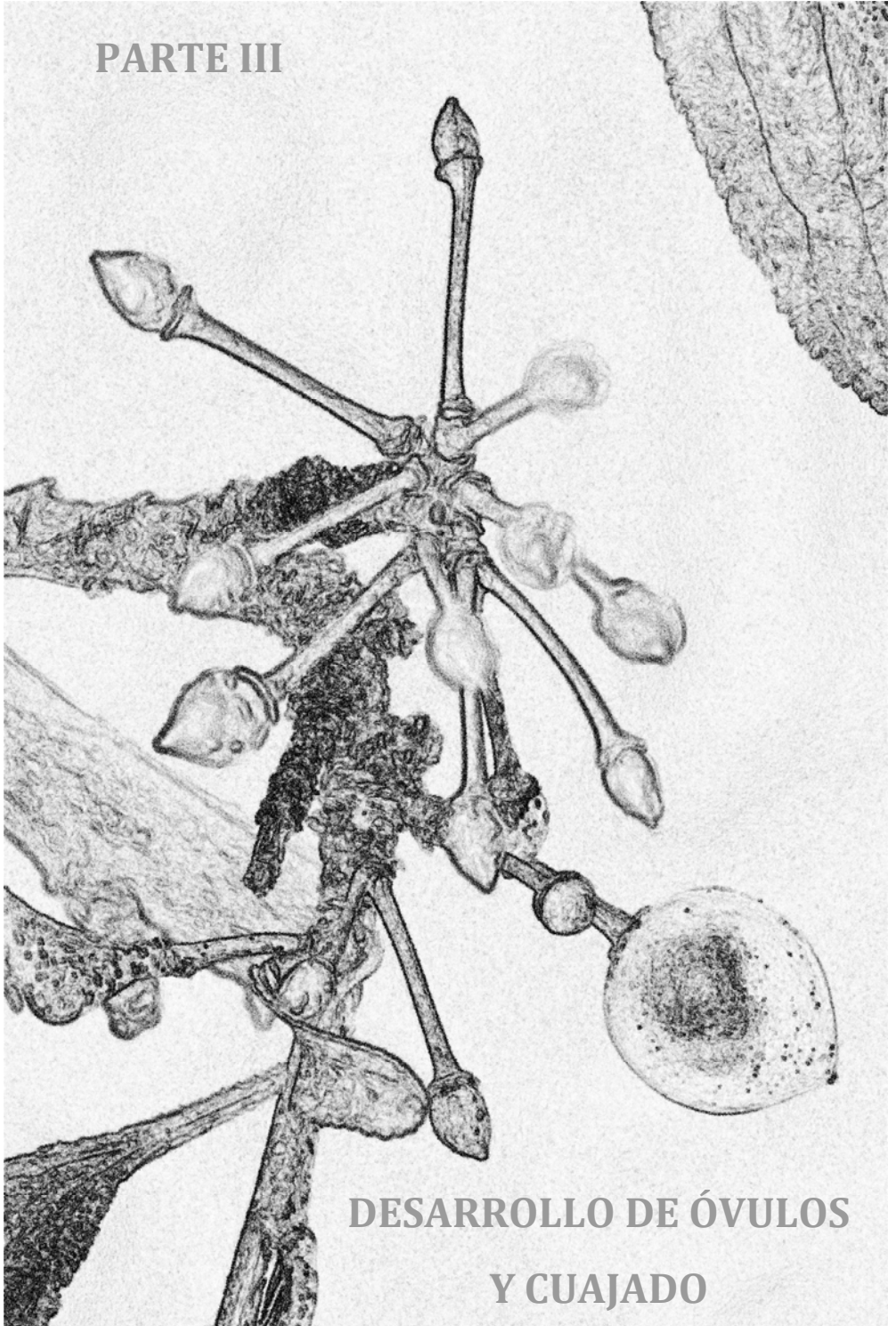
Los cuatro cultivares descritos anteriormente en los que en este trabajo se detectó un genotipo distinto fueron Abundance (*SfSh*; Beppu *et al.*, 2003), Golden Globe (*SbSf*; Capítulo 4), Kelsey (*SfSh*; Beppu *et al.*, 2003) y 30-an-7 (*SgSh*; Capítulo 4), cuyo genotipo en este trabajo fue *SaSk*, *SbSc*, *SfSk* y *ScSh*, respectivamente. Los cultivares Golden Globe y 30-an-7, cuyo genotipo descrito en el capítulo 4 fue diferente al identificado en este capítulo, son muestras de material vegetal que proceden de distinto origen, por lo que es posible que una de las accesiones no esté denominada correctamente. La diferencia en los resultados en 'Abundance' y 'Kelsey' también podría ser debida al distinto origen de las muestras de material vegetal empleadas en los distintos trabajos, por lo que sería necesario analizar cultivares de referencia que permitan establecer cuál es el genotipo correcto de cada cultivar.

En este trabajo se ha puesto a punto y validado una metodología de alta sensibilidad para la identificación del genotipo *S* en ciruelo japonés. Esta técnica ha permitido la caracterización del genotipo *S* de 33 nuevos cultivares y se ha confirmado el de 69 cultivares adicionales. La identificación del genotipo *S* de nuevos cultivares, así como el establecimiento de sus grupos de incompatibilidad, supone una notable ayuda para los agricultores, viveristas y mejoradores de esta especie, ya que permite realizar una selección adecuada de cultivares compatibles en plantaciones o cruzamientos.

Las relaciones de compatibilidad entre cultivares, factor determinante del cuajado, han sido analizadas hasta el momento mediante cruces en campo y laboratorio (Capítulos 2 y 3), mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos con microscopía de fluorescencia (Capítulos 3 y 4) y mediante PCR (Capítulos 3, 4 y 5), lo que ha permitido agilizar la determinación de las relaciones de compatibilidad. A pesar de ello, algunos cultivares genéticamente compatibles estudiados presentaron problemas de cuajado aparentemente no asociados a incompatibilidad, por lo que en los siguientes capítulos se planteó el estudio de otros factores que pudieran afectar a la falta de cuajado.



PARTE III



DESARROLLO DE ÓVULOS  
Y CUAJADO



## 6. DEGENERACIÓN DE ÓVULOS Y FALTA DE CUAJADO EN DOS NUEVOS CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS

### RESUMEN

Algunos cultivares de ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.) son particularmente propensos a los cuajados erráticos, mostrando cuajados muy bajos e incluso nulos por razones que se desconocen. En este trabajo se ha evaluado el proceso reproductivo en dos nuevos cultivares de ciruelo japonés, Sweet August y Rubirosa, para analizar las causas de su falta de cuajado. Para ello se han realizado ensayos de autopolinización y polinizaciones cruzadas con diferentes cultivares en condiciones reales de cultivo y se ha caracterizado el cuajado y la caída de flores y frutos hasta la maduración. Para determinar qué factores del proceso reproductivo podrían estar relacionados con la falta de cuajado, se realizó el seguimiento al microscopio de la germinación del polen, el crecimiento de tubos polínicos, la incompatibilidad polen-pistilo y el desarrollo de óvulos en flores de cada autopolinización y de cada cruce. Los mismos ensayos se realizaron sobre el cultivar productivo Simka, que se usó como control. Los resultados permitieron descartar la viabilidad del polen, el transporte de polen al estigma y la incompatibilidad polen-pistilo como causas de la falta de cuajado en los dos cultivares analizados. Sin embargo, se identificó la degeneración prematura de los dos óvulos de la flor como causa de la esterilidad femenina y por lo tanto de la falta de cuajado en estos cultivares. La falta de cuajado en situaciones de cultivo con condiciones meteorológicas adversas es tradicionalmente estudiada mediante el análisis del proceso de polinización y las relaciones de incompatibilidad polen-pistilo, pero el estado de desarrollo de los óvulos no suele ser considerado como condicionante del proceso reproductivo. La metodología usada en este trabajo puede resultar útil para situaciones de falta de cuajado en otros cultivares y especies, lo que podría ayudar a identificar las causas de la degeneración prematura de óvulos.

## **6.1. INTRODUCCIÓN**

El ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.) se cultiva en zonas templadas de todo el mundo desde su introducción en California procedente de Japón a finales del siglo XIX (Faust y Surányi, 1999). El término 'ciruelo japonés' se utilizaba originalmente para *P. salicina*, pero hoy en día no se corresponde con una especie sino que comprende un grupo heterogéneo de genotipos de ciruelo que se cultivan para fruta de consumo en fresco y que proceden de hibridaciones interespecíficas de la especie original *P. salicina* con otras especies diploides de *Prunus* (Byrne, 1989; Faust y Surányi, 1999; Okie, 2006). La producción mundial de ciruelo japonés se ha incrementado en las últimas décadas (Okie y Hancock, 2008; Hartmann y Neumüller, 2009), y en la actualidad se está produciendo una importante renovación varietal con la introducción de nuevos cultivares procedentes de distintos programas de mejora genética (Okie y Ramming, 1999; Okie y Hancock, 2008).

Aunque el porcentaje de cuajado en ciruelo japonés es mucho menor (Capítulo 2) que en otros frutales de hueso (Dorsey, 1919; Bradbury, 1929; Harrold, 1935; Kester y Griggs, 1959; Lech y Tylus, 1983; Dicenta *et al.*, 2002; Rodrigo y Herrero, 2002a; Hedhly *et al.*, 2007), en muchos cultivares suele ser suficiente para alcanzar una producción adecuada de fruta, ya que el ciruelo japonés produce una cantidad de flores considerablemente más alta que otros *Prunus* (Okie, 2006; Hartmann y Neumüller, 2009). Sin embargo, algunos cultivares son particularmente propensos a tener cuajados erráticos, presentando algunos años un porcentaje de cuajado muy bajo o incluso nulo por razones que no están bien establecidas (Okie y Weinberger, 1996; Hartmann y Neumüller, 2009).

Cuando no se han producido condiciones ambientales adversas durante la fase de floración ni durante el desarrollo del fruto, es difícil determinar las causas que provocan la falta de cuajado, ya que muchos otros factores, tanto externos como internos, intervienen en el establecimiento del cuajado (Capítulos 2 y 3). En *Prunus*, las flores tienen un gineceo unicarpelar (Sterling, 1964), cuyo ovario contiene dos óvulos, y la fecundación de al menos uno de ellos es necesaria para que se produzca el cuajado, ya que en el género *Prunus* no se producen frutos partenocárpicos (Sedgley y Griffin, 1989; Hartmann y Neumüller, 2009). Uno de los dos óvulos, el óvulo primario,

continúa creciendo en los días siguientes a la antesis y puede ser fecundado y llegar a formar una semilla; el otro, el óvulo secundario, detiene su crecimiento y generalmente degenera (Bradbury, 1929). Numerosos factores intervienen en el proceso reproductivo que concluye en el cuajado, como la viabilidad del polen, el transporte del polen al estigma, la incompatibilidad polen-pistilo, la sincronía entre la llegada del tubo polínico al óvulo y la maduración del saco embrionario, la fecundación de al menos un óvulo y el inicio del desarrollo del cigoto (Dorsey, 1919; Bradbury, 1929; Harrold, 1935; Pimienta y Polito, 1982; Hormaza y Herrero, 1996b; Rodrigo y Herrero, 1998). Aunque estos procesos han sido analizados en otras especies de *Prunus*, la biología reproductiva en ciruelo japonés no se ha estudiado en profundidad (Okie, 2006).

Tradicionalmente, en ciruelo japonés no se ha considerado el proceso reproductivo como causa de falta de cuajado, aunque se han descrito algunos cultivares androestériles (Herrero y Salvador, 1980; Ramming, 1995; Vidiella, 2002). Sin embargo, en los últimos años se ha relacionado la polinización con problemas de cuajado en algunos cultivares y situaciones de cultivo (Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008a, b, Capítulos 2 y 3). El ciruelo japonés, como otros frutales de hueso del género *Prunus*, presenta un sistema de autoincompatibilidad de tipo gametofítico (GSI), que previene la autofecundación y promueve la polinización cruzada (De Nettancourt, 2001). Aunque se han descrito algunos cultivares autocompatibles, la mayoría de los cultivares de ciruelo de tipo japonés son autoincompatibles (Okie y Weinberger, 1996; Capítulo 3 y 4) y necesitan cultivares polinizadores compatibles interplantados en la misma plantación para asegurar el cuajado (Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007; Capítulos 3, 4 y 5).

En este trabajo se ha evaluado el proceso reproductivo en dos nuevos cultivares de ciruelo japonés, Sweet August y Rubirosa, para analizar las causas de su falta de cuajado. Se han realizado autopolinizaciones y polinizaciones cruzadas con diferentes cultivares en condiciones de cultivo y se ha caracterizado el cuajado y la caída de frutos hasta la maduración. Para determinar qué factores del proceso reproductivo pueden estar relacionados con la falta de cuajado, se han realizado observaciones al microscopio de los granos de polen, el crecimiento de los tubos polínicos, la incompatibilidad polen-pistilo y el estado de desarrollo de los óvulos en

flores de cada autopolinización y de cada cruce. Estos mismos ensayos se realizaron sobre el cultivar productivo Simka, que se usó como control.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1 Material vegetal**

Para evaluar el proceso reproductivo y la causa de la falta de cuajado en 'Rubirosa' y 'Sweet August', se realizaron ensayos de polinización usando seis cultivares polinizadores localizados en la misma plantación comercial (Black Jewell, Champion, Hiromi Red, Rubirosa, Sweet August y Sybarite) y el cultivar productivo Simka, que se usó como control y fue polinizado con Songold.

### **6.2.2 Viabilidad del polen**

Para determinar los posibles cultivares polinizadores de Rubirosa y Sweet August, se analizaron aquellos cultivares presentes en la plantación que coincidieron en floración con alguno de los dos (Black Jewell, Champion, Hiromi Red, Rubirosa, Sweet August y Sybarite). En cada uno de ellos se evaluó la viabilidad del polen y se comparó con la del cultivar Songold, polinizador de Simka. El polen se obtuvo de flores en estado de botón globoso, de las que se separaron las anteras y se colocaron en bandejas de papel a temperatura ambiente hasta su dehiscencia. El polen fue colado usando una malla de 0,26 mm de luz y se almacenó a -20°C hasta su utilización (Apartado 2.2.2, Capítulo 2). El polen de cada cultivar se sembró en un medio sólido de germinación compuesto por 0,3 M de azúcar, 0,6 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1,6 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 0,8% de agar (Hormaza *et al.*, 1996) en placas de Petri de 60 x 10 mm. El polen sembrado se dejó germinar durante 24 h a 20°C y posteriormente se congeló a -20°C para detener la germinación. Para la observación de las placas, se dejaron descongelar durante 24 h a 4°C, se tiñeron con azul de anilina en  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0,1 N al 1 % (v/v) para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957) y se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con luz ultravioleta epifluorescente con un filtro excitador BP340-390 y un



filtro de barrera LP 425. Un grano de polen se consideró viable cuando el tubo polínico germinado era mayor que su diámetro (Fig. 6.1A). La viabilidad se determinó en dos placas de Petri por cada cultivar mediante el conteo de los granos de polen viables y no viables en tres campos por placa, contándose en cada campo entre 100 y 200 granos de polen como mínimo. En los ensayos de polinización sólo se seleccionaron como cultivares polinizadores aquellos que tuvieron polen viable.

### **6.2.3 Ensayos de polinización**

Se realizaron ensayos de autopolinización y polinización cruzada sobre los dos cultivares a evaluar, Rubirosa y Sweet August, y sobre el cultivar usado como control, Simka (Tabla 6.1). Adicionalmente, se dejó en cada cultivar una población de flores a polinización libre que fueron usadas como control.

Puesto que la emasculación de flores ha sido relacionada con la falta del cuajado en diversos cultivares de ciruelo japonés (Capítulo 7), los tratamientos de polinización se realizaron sobre flores no emasculadas mediante polinización suplementaria (Williams, 1970a) en árboles cubiertos con malla (Apartado 2.2.2, Capítulo 2). Así, los ensayos de autopolinización y polinización cruzada en ‘Rubirosa’, ‘Sweet August’ y ‘Simka’ se realizaron en ramas seleccionadas de dos árboles de cada cultivar, que fueron cubiertos con malla de 0,8 mm de luz antes de la floración para evitar la llegada de los insectos polinizadores. El polen se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Las polinizaciones se realizaron manualmente usando un pincel fino y polinizando en días alternos hasta la apertura de todas las flores (Rodrigo y Herrero, 2002b). Se autopolinizaron entre 950 y 1500 flores de cada cultivar y se polinizaron entre 950 y 1450 flores por cruce. Además, se dejaron a polinización libre entre 1450 y 1550 flores de cada cultivar en árboles no cubiertos con malla (Tabla 6.1). Para caracterizar la curva de caída y determinar el cuajado final en cada ensayo, se realizaron conteos semanales de flores y frutos en desarrollo desde anthesis hasta la recolección (Williams, 1970b).

Para analizar la llegada y germinación de polen en el estigma de las flores, se recogieron entre 40 y 50 flores de cada cultivar y tratamiento de polinización. Las flores se recogieron cuatro días después de la polinización y se fijaron en etanol :

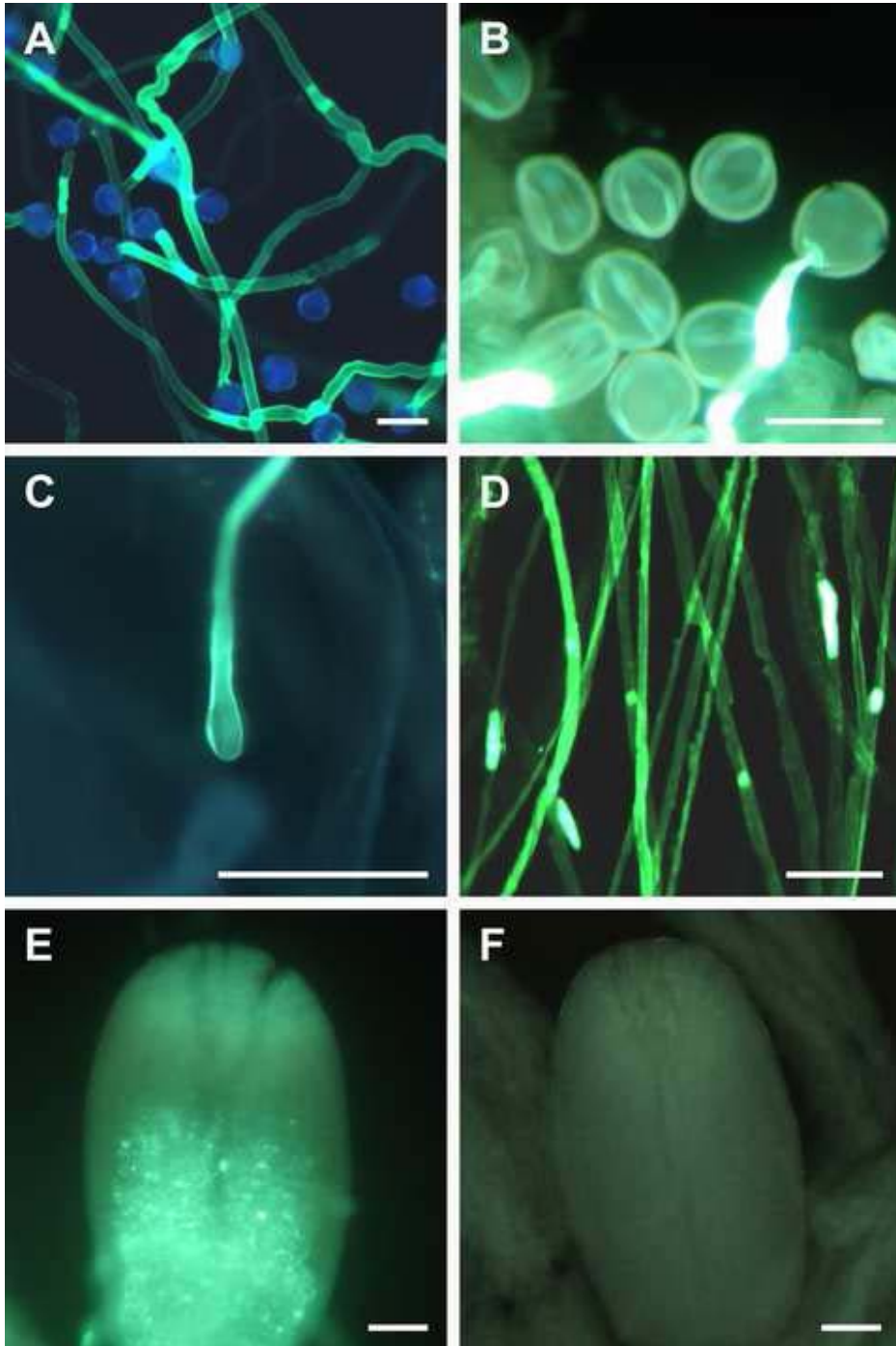
### *Degeneración de óvulos y falta de cuajado*

ácido acético (3:1) (Williams *et al.*, 1999). Para las preparaciones al microscopio, los pistilos fijados se lavaron tres veces a intervalos de una hora con agua destilada y un lavado final con sulfito sódico al 5% (p/v) durante 24 h a 4°C. A continuación, se autoclavarón durante 8 min a 1 kg/cm<sup>2</sup> en sulfito sódico al 5% para ablandar los tejidos (Jefferies y Belcher, 1974). Los granos de polen se observaron en preparaciones *squash* de los estigmas y los estilos de cada cultivar (Rodrigo *et al.*, 2009) y fueron teñidos siguiendo el protocolo usado para la determinación de la viabilidad descrito en el apartado anterior. Las observaciones se realizaron en un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) con luz UV epifluorescente usando un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470. Se calculó el porcentaje de flores con granos de polen germinados en el estigma para cada cultivar y tratamiento de polinización (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1.** Tratamientos de polinización realizados en cada cultivar, número de flores utilizadas, número de frutos obtenidos, porcentaje de cuajado, porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma, porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo, porcentaje de pistilos con los dos óvulos degenerados, y genotipo *S* de los cruces realizados.

<b>Cultivar Tratamiento</b>	<b>Flores (nº)</b>	<b>Frutos (nº)</b>	<b>Cuajado (%)</b>	<b>Pistilos con granos de polen germinados (%)</b>	<b>Pistilos con tubos polínicos en la base del estilo (%)</b>	<b>Pistilos con los dos óvulos degenerados (%)</b>	<b>Genotipo <i>S</i></b>
<b>Sweet August</b>							<i>ScSh</i>
Polinización libre	1.555	0	0	67		100	
Autopolinización	1.322	0	0	95	0	50	<i>ScSh x ScSh</i>
x Champion	1.382	10	0,7	88	66	50	<i>ScSh x ScSe</i>
x Rubirosa	1.471	19	1,3	100	91	73	<i>ScSh x ScSe</i>
<b>Rubirosa</b>							<i>ScSe</i>
Polinización libre	1.516	0	0	100		71	
Autopolinización	959	0	0	100	36	50	<i>ScSe x ScSe</i>
x Champion	1.084	0	0	99	0	78	<i>ScSe x ScSe</i>
x Hiromi Red	943	5	0,5	100	73	50	<i>ScSe x SbSh</i>
<b>Simka</b>							<i>SeSk</i>
Polinización libre	1.442	30	6	100		0	
Autopolinización	1.519	57	4	100	33	0	<i>SeSk x SeSk</i>
x Songold	1.472	28	5	100	73	0	<i>SeSk x ShSk</i>
N			14.665	185	145	74	
g.l.			10	10	7	10	
Pearson $\chi^2$			211,400	27,207	80,502	40,107	
<i>P</i>			< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001	

N, tamaño de la muestra; g.l., grados de libertad; Pearson  $\chi^2$ , Chi-cuadrado de Pearson. *P*, nivel de significación.



**Figura 6.1.** Germinación de polen, crecimiento del tubo polínico y desarrollo de óvulos en flores de ciruelo japonés. Germinación de granos de polen *in vitro* (A) y en el estigma (B). Tubo polínico parado en el estilo en un cruce incompatible (C). Tubos polínicos avanzando hacia la base del estilo en un cruce compatible (D). Óvulo degenerado con acumulación de calosa en el final de la calaza (E). Óvulo bien desarrollado (F). Barras = 50  $\mu$ m.

#### 6.2.4 Incompatibilidad polen-pistilo

Para determinar la auto(in)compatibilidad de cada cultivar usado como parental femenino y la (in)compatibilidad de cada cruce, las distintas autopolinizaciones y cruces analizados en campo también se realizaron en laboratorio (Tabla 6.1). Para ello, se recogieron flores en estado de botón globoso de cada cultivar, se llevaron al laboratorio, se emascularon y se colocaron en espuma de florista húmeda a temperatura ambiente (Rodrigo y Herrero, 1996). Aproximadamente treinta flores por tratamiento se polinizaron manualmente a las 24 h de haber sido emasculadas con polen obtenido siguiendo el método descrito anteriormente (Apartado 6.2.2). Transcurridas 72 h tras la polinización, cuando los tubos han alcanzado la base del estilo (Capítulo 4), los pistilos se fijaron y se prepararon para la observación del crecimiento de los tubos polínicos en el microscopio, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para observar la germinación del polen en los estigmas (Apartado 6.2.2). Se determinó la presencia o ausencia de tubos polínicos en la base del estilo en al menos diez pistilos por cultivar y tratamiento. Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) con luz UV epifluorescente usando un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470.

Para confirmar las relaciones de (in)compatibilidad de cada cruce, se determinó el genotipo *S* de cada cultivar mediante la identificación de sus *SRNasas*. Para ello, se aisló el ADN genómico de cada cultivar a partir de hojas jóvenes siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones de Hormaza (2002). La determinación de las *SRNasas* se realizó mediante amplificación por PCR usando los pares de cebadores Pru C2-PCER y Pru T2-PCER (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2001) siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 3 (Apartado 3.2.5).

#### 6.2.5 Degeneración de óvulos

Se examinó el desarrollo de los óvulos en flores de cada cultivar y tratamiento. Para ello, se observaron al microscopio preparaciones en *squash* de los mismos pistilos sobre los que se había evaluado la germinación del polen. En al menos

10 pistilos por cultivar y tratamiento, se analizó el desarrollo de los dos óvulos mediante la observación de depósitos de calosa en la zona de la calaza, que es un indicador de la degeneración del óvulo (Pimienta y Polito, 1982; Stösser y Anvari, 1982; Arbeloa y Herrero, 1985; Rodrigo y Herrero, 1998; Hedhly *et al.*, 2009). El desarrollo de los óvulos se observó utilizando el mismo procedimiento de tinción de la calosa con azul de anilina usado para observar la germinación del polen en los estigmas y el crecimiento de tubos polínicos (Apartados 6.2.2 y 6.2.3). Las preparaciones se observaron en un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) con luz UV epifluorescente usando un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470.

### **6.2.6 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para analizar los porcentajes de germinación de polen *in vitro* de cada cultivar, previa transformación del arcoseno de la raíz cuadrada. Cuando el ANOVA generó diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), las medias se compararon con el test de Duncan.

Se ha utilizado el test Chi-cuadrado de Pearson sobre tablas de contingencia para el análisis entre los diferentes tratamientos de polinización de los porcentajes de frutos cuajados, pistilos con granos de polen geminados en el estigma, pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y pistilos con los dos óvulos degenerados.

## **6.3. RESULTADOS**

La viabilidad del polen, evaluada a través de su germinación *in vitro* (Fig. 6.1A), presentó diferencias significativas entre cultivares ( $F = 76,431$ ; g.l.= 5;  $P < 0,001$ ; Tabla 6.2). 'Black Jewell' no mostró granos de polen en las anteras, y 'Sybarite' presentó muy pocos granos que además presentaron un porcentaje de viabilidad muy bajo, por lo que ambos cultivares se consideraron androestériles y no fueron usados en los ensayos de polinización. La viabilidad del polen de 'Hiromi Red', 'Rubirosa', 'Songold', 'Sweet August', 'Champion' y 'Simka' presentó un rango de germinación de

entre un 12,2% y un 60,6% (Tabla 6.2), por lo que se utilizaron en los ensayos de autopolinización y polinización cruzada (Tabla 6.1).

**Tabla 6.2.** Porcentaje de granos de polen germinados *in vitro* en ocho cultivares de ciruelo japonés. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de seis replicaciones. Los valores con letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Cultivar	% Viabilidad de polen
Black Jewell	*
Sybarite	*
Songold	12,2 $\pm$ 0,9 a
Sweet August	19,1 $\pm$ 2,1 b
Champion	21,7 $\pm$ 1,9 b
Simka	27,7 $\pm$ 1,5 c
Rubirosa	30,7 $\pm$ 1,3 c
Hiromi Red	60,6 $\pm$ 2,8 d

\* Cultivares sin polen en las anteras o con polen que no germinó.

Para analizar la llegada del polen al estigma, se tomaron al azar flores fijadas de los diferentes ensayos de campo y se observaron al microscopio. Como se esperaba, todas las flores polinizadas manualmente presentaron polen en el estigma. Igualmente, la mayoría de las flores dejadas a polinización libre también presentaron granos de polen en el estigma (Fig. 6.1B; Tabla 6.1).

A pesar de usar polen viable transferido adecuadamente a los estigmas, se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de cuajado de los distintos cruces realizados. Se observó una ausencia total de cuajado en los ensayos de polinización libre y autopolinización en 'Rubirosa' y 'Sweet August', mientras que en 'Simka' el porcentaje de cuajado fue de un 6% y un 4% para cada tratamiento respectivamente (Tabla 6.1). En los ensayos de polinización cruzada de 'Rubirosa' y 'Sweet August' también se observaron cuajados nulos o muy bajos, entre el 0% y el 1%, mientras que en 'Simka' el cuajado fue del 5%. Aunque la caída de flores en los ensayos de polinización libre, polinización cruzada y autopolinización en los cultivares Sweet August y Rubirosa se completó en la tercera semana después de anthesis, la

caída de las flores y frutos en desarrollo en 'Simka' continuó hasta el establecimiento final del cuajado siete semanas después de antesis (Fig. 6.2).

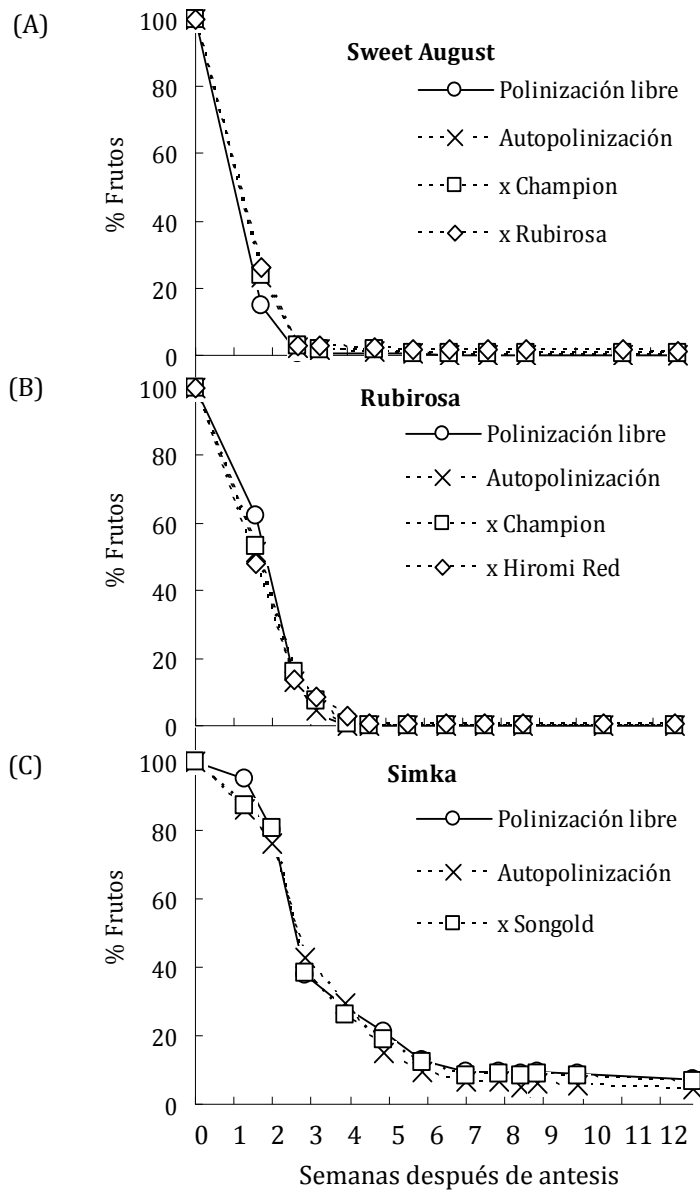
Para evaluar si la falta de cuajado en 'Rubirosa' y 'Sweet August' fue provocada por la ausencia de polen compatible, se analizó la (in)compatibilidad polen-pistilo de cada cruce. La observación del crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo se realizó en pistilos polinizados en el laboratorio con el mismo polen que se usó en los ensayos de campo. La prueba Chi-cuadrado reveló diferencias significativas entre los porcentajes de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo para los diferentes cruces (Tabla 6.1). En todas las flores autopolinizadas de 'Sweet August', los tubos polínicos se detuvieron en el estilo y ningún tubo polínico alcanzó la base del mismo (Fig. 6.1C; Tabla 6.1), indicando que este cultivar se comportó como autoincompatible. Por otro lado, se encontró un porcentaje variable de pistilos autopolinizados de 'Rubirosa' (36%) y 'Simka' (33%) que mostraban tubos polínicos creciendo a lo largo del pistilo (Fig. 6.1D) y alcanzando la base del estilo, lo que indica que estos cultivares son autocompatibles.

En los ensayos de polinización cruzada se obtuvieron porcentajes variables de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo (Tabla 6.1). Mientras que algunos pistilos de los cruces 'Sweet August' x 'Champion', 'Sweet August' x 'Rubirosa' y 'Simka' x 'Songold' presentaron tubos polínicos en la base del estilo, en ninguno de los pistilos analizados del cruce 'Rubirosa' x 'Champion' se observaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo. Por lo tanto, todos los cruces se comportaron como compatibles excepto 'Rubirosa' x 'Champion', que fue incompatible. El análisis de las *SRNasas* mediante PCR confirmó la compatibilidad de todos los cruces realizados, ya que las combinaciones de parentales presentaban distinto genotipo *S* (Tabla 6.1), y sólo el cruce de 'Rubirosa' x 'Champion' indicó una relación incompatible al presentar ambos cultivares el mismo genotipo *S*.

Se analizó el desarrollo de los óvulos en el microscopio usando pistilos provenientes de todos los cruces realizados en campo. En un porcentaje variable (50 - 100%) de pistilos provenientes de los ensayos de autopolinización, polinización cruzada y polinización libre de 'Rubirosa' y 'Sweet August', los dos óvulos aparecieron degenerados, mostrando calosa en la zona de la calaza (Fig. 6.1E; Tabla 6.1). Sin embargo, todos los pistilos de 'Simka' presentaron al menos un óvulo bien



desarrollado sin calosa en la calaza (Fig. 6.1F; Tabla 6.1). La prueba Chi-cuadrado reveló diferencias significativas entre los porcentajes de pistilos con ambos óvulos degenerados de los diferentes cruces (Tabla 6.1).



**Figura 6.2.** Curva de caída en tres cultivares de ciruelo japonés con diferentes tratamientos de polinización: polinización libre, autopolinización y polinización cruzada. Porcentaje de frutos a partir del número inicial de flores durante las 12 semanas siguientes a la antesis en ‘Sweet August’ (A), ‘Rubirosa’ (B) y ‘Simka’ (C).

#### **6.4. DISCUSIÓN**

El estudio de diferentes factores que intervienen en el proceso reproductivo ha permitido descartar la viabilidad del polen, el transporte de polen al estigma y la incompatibilidad polen-pistilo como causas de la falta de cuajado en los dos cultivares de ciruelo de tipo japonés evaluados. Sin embargo, se ha identificado la degeneración prematura de los dos óvulos de la flor como el factor causante de la esterilidad femenina y por lo tanto de la falta de cuajado en estos cultivares.

El porcentaje de cuajado en 'Rubirosa' y 'Sweet August' fue muy bajo o nulo en todos los tratamientos de polinización y más bajo de los que presentan habitualmente los cultivares de ciruelo japonés (Beppu *et al.*, 2005, 2010b; Jia *et al.*, 2008; Sapir *et al.*, 2008b; Capítulos 2 y 7), y reflejó la ausencia de cuajado observada en estos cultivares en años anteriores. La caída de flores en estos cultivares también fue más rápida de lo esperado. Ya que la polinización con polen compatible o incompatible no afecta al patrón de caída (Capítulos 2 y 7), el diferente comportamiento en estos cultivares sugiere que existen otros factores distintos de la polinización que podrían estar relacionados con la dinámica de la caída y la falta de cuajado.

Los cultivares Black Jewell y Sybarite se comportaron como androestériles y por lo tanto no fueron usados como polinizadores. Se han descrito diferentes cultivares de ciruelo japonés androestériles, como 'First Beaut' (Ramming, 1995) o 'Red Beaut' (Herrero y Salvador, 1980), y también se han observado algunas descendencias androestériles (Ontivero *et al.*, 2006). Mientras que 'Black Jewell' no mostró granos de polen en las anteras, como le ocurre a 'Red Beaut' (Herrero y Salvador, 1980), 'Sybarite' presentó muy pocos granos de polen y con una viabilidad muy baja. Aunque estos dos cultivares resultaron androestériles, en la misma plantación había otros cultivares que coincidían en floración con 'Rubirosa' y 'Sweet August' y que tenían polen viable que fue adecuadamente transportado a los estigmas. Por lo tanto la viabilidad del polen y el transporte del mismo no parecen ser las causas de falta de cuajado en los cultivares analizados.

La observación del crecimiento de los tubos polínicos y la caracterización de los alelos *S* mediante PCR mostraron que 'Rubirosa' y 'Sweet August' tenían al menos un cultivar polinizador compatible y coincidente en floración en la misma plantación,

lo que ha permitido descartar la incompatibilidad polen-pistilo como la causa de falta de cuajado en ambos cultivares. En este trabajo se han descrito por primera vez los genotipos *S* de los cultivares Champion (*ScSe*), Rubirosa (*ScSe*) y Sweet August (*ScSh*). Los genotipos *S* de 'Simka', 'Songold' y 'Hiromi Red' analizados en este trabajo se correspondieron con los descritos en otros trabajos previos (Beppu *et al.*, 2003; Sapir *et al.*, 2008a; Capítulo 3). 'Sweet August' se comportó como autoincompatible, ya que no se observó ningún tubo polínico alcanzando la base del estilo en flores autopolinizadas. Por otro lado, algunos pistilos de 'Rubirosa' y 'Simka' mostraron tubos polínicos alcanzando el ovario, por lo que estos cultivares parecen ser autocompatibles, lo que se corresponde con la presencia en ambos cultivares del alelo *Se*, que ha sido relacionado con el carácter de autocompatibilidad en otros cultivares (Beppu *et al.*, 2005; 2010b; Guerra *et al.*, 2009; Capítulos 3, 4 y 5).

La observación del crecimiento de los tubos polínicos indicó que 'Sweet August' es compatible con los dos cultivares polinizadores utilizados ('Champion' y 'Rubirosa'), y que 'Rubirosa' es compatible con 'Hiromi Red' e incompatible con 'Champion'. Estos resultados se corresponden con los genotipos *S*, ya que los alelos *S* son diferentes en los cultivares de los cruces compatibles y coinciden en los cultivares cuyo cruce resultó incompatible ('Rubirosa' y 'Champion'). Sin embargo, puesto que 'Rubirosa' parece ser autocompatible y ambos cultivares presentan el alelo *Se*, el cruce debería ser compatible. Este resultado plantea la necesidad de hacer nuevos ensayos de polinización así como análisis genéticos para esclarecer esta situación.

Una vez descartados otros factores involucrados en el proceso reproductivo, la presencia de los dos óvulos degenerados en flores provenientes de cruces sin cuajado y la ausencia de óvulos degenerados en flores de cruces con cuajado permitió identificar la degeneración de los óvulos como la causa de la falta de cuajado en estos dos cultivares en las condiciones de cultivo analizadas. En otros *Prunus*, la degeneración del óvulo secundario se ha relacionado con la acumulación de calosa en la zona del final de la calaza de la nucela del óvulo, que posteriormente muestra claros síntomas de degeneración (Pimienta y Polito, 1982; Stösser y Anvari, 1982; Arbeloa y Herrero, 1991; Rodrigo y Herrero, 1998; Cerović y Mičić, 1999; Cerović *et al.*, 2000). La mayoría de las flores de 'Rubirosa' y 'Sweet August' mostraron ambos óvulos degenerados, por lo que no se pudo producir la fecundación. Sin embargo, todas las

flores analizadas de 'Simka', que presentó un cuajado normal, tenían al menos un óvulo bien desarrollado.

En *Prunus*, las implicaciones de la esterilidad femenina en el cuajado son más graves que las causadas por esterilidad masculina, ya que los cultivares androestériles pueden producir cuajado si se polinizan con polen compatible de otros cultivares, mientras que los cultivares con esterilidad femenina no pueden cuajar ya que no son partenocárpicos (Sedgley y Griffin, 1989; Hartmann y Neumüller, 2009). Aunque en los programas de mejora se descartan los genotipos estériles, se han descrito algunos cultivares de *Prunus* que presentan problemas de esterilidad femenina, aunque no están claros los factores que están involucrados en la degeneración prematura de los óvulos. La esterilidad femenina ha sido considerada como una característica varietal en el cultivar de cerezo 0900 Ziraat (Mert y Soyly, 2007), sin embargo los dos cultivares de ciruelo japonés estudiados en este trabajo producen de forma adecuada en otras plantaciones, por lo que en ambos cultivares se puede descartar que la esterilidad femenina sea una característica genética. En el cultivar de albaricoquero Trevatt Blue, la esterilidad femenina ha sido atribuida a una posible mutación de yema del árbol original del que se cogieron las varetas para su propagación (Lillecrapp *et al.*, 1999). Esto podría explicar la situación expuesta en este trabajo, aunque parece poco probable que esta situación pudiese ocurrir simultáneamente en dos cultivares diferentes. Parece más probable que la degeneración prematura de óvulos en estos dos cultivares fuera causada por factores externos.

En otros *Prunus*, la esterilidad femenina como causa de falta cuajado ha sido relacionada con condiciones ambientales adversas, como heladas de primavera (Rodrigo, 2000) o altas temperaturas antes (Rodrigo y Herrero, 2002b) y después de la floración (Hedhly *et al.*, 2007, 2009). Sin embargo, no se registraron condiciones ambientales adversas durante el desarrollo de las flores en la plantación donde se realizó este trabajo. La esterilidad femenina en *Prunus* puede ser también inducida por la aplicación de diferentes tratamientos químicos externos (Stösser y Anvari, 1982; Morenol *et al.*, 1992; Herrero, 2000; Beppu *et al.*, 2001). Independientemente de los factores causantes de la degeneración de los óvulos, parece ser que no afectan de la misma forma a todos los genotipos, ya que otros cultivares de ciruelo japonés en la misma plantación tuvieron cuajados normales (datos no mostrados).

Los resultados revelaron una alta incidencia de la degeneración prematura de los óvulos en el cuajado final de los dos cultivares estudiados. La falta de cuajado en condiciones de cultivo sin aparentes condiciones ambientales adversas es un problema que tradicionalmente se ha abordado estudiando el proceso de polinización y las relaciones de incompatibilidad polen-pistilo, pero el estado de desarrollo de los óvulos no se suele considerar. La metodología usada en este trabajo puede resultar útil para analizar situaciones de falta de cuajado en otros cultivares y especies, lo que podría facilitar la identificación de las causas que provocan la degeneración prematura de los óvulos.



## 7. LA EMASCULACIÓN DE FLORES COMO CAUSA DE FALTA DE CUAJADO EN CRUCES ENTRE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS<sup>2</sup>

### RESUMEN

La emasculación de flores es un método muy usado en los programas de mejora de frutales para la realización de cruces entre cultivares. En algunos cruces realizados sobre flores emasculadas en ciruelo japonés (*P. salicina* Lindl.) se han obtenido cuajados bajos o nulos sin que las causas estén claras. En este trabajo se ha evaluado la influencia de la emasculación de flores en el cuajado en cuatro cultivares de ciruelo japonés, comparando ensayos de polinización cruzada realizados en flores emasculadas y sin emascular. En cada ensayo se ha caracterizado el cuajado y la caída de flores y frutos hasta la maduración. Para determinar qué factores del proceso reproductivo podrían estar relacionados con la falta de cuajado, se ha determinado la (in)compatibilidad en cada cruce mediante la observación del crecimiento de tubos polínicos al microscopio y mediante marcadores moleculares. También se ha observado en el microscopio el estado de desarrollo de los óvulos en flores emasculadas y sin emascular. El análisis de los diferentes tratamientos de polinización y el estudio de las relaciones de (in)compatibilidad permitió descartar otros factores como causantes de la falta de cuajado e identificar la emasculación de las flores como la causa de la degeneración prematura de los óvulos y su implicación en el establecimiento del cuajado.

---

<sup>2</sup>Guerra, M.E., Wunsch, A., López-Corrales, M., Rodrigo, J. (2010). Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(6)1-7. (Anexo 1).

## **7.1. INTRODUCCIÓN**

La emasculación de flores se utiliza habitualmente en los programas de mejora genética de frutales de hueso para realizar cruzamientos (Layne, 1983). Esta técnica también se usa en estudios citológicos y genéticos (Okie y Hancock, 2008), y en diferentes ensayos en los que una polinización controlada es imprescindible para evitar la interferencia de polen no deseado (Hedhly *et al.*, 2009).

En los programas de mejora, la emasculación de flores es una técnica muy útil para llevar a cabo polinizaciones controladas cuando el parental femenino es autocompatible, ya que se evita la autofecundación y se asegura el cruce entre cultivares. El proceso de emasculación consiste en eliminar manualmente los pétalos y estambres de la flor antes de su dehiscencia (Layne, 1983), por lo que las flores dejan de ser atractivas para los insectos polinizadores (Free, 1964) y se pueden realizar polinizaciones manuales sin la interferencia de polen no deseado procedente de las propias anteras de la flor o de otras flores transportado por insectos polinizadores. El estado más favorable de la flor para realizar la emasculación en frutales de hueso es el de botón globoso un día antes de antesis (Bailey y Hough, 1975). En *Prunus* también existen otras técnicas para realizar polinizaciones cruzadas. Por ejemplo, los dos árboles parentales se pueden cubrir con una cabina de malla colocando colmenas en su interior. También se puede cubrir únicamente el árbol femenino, introduciendo en la cabina árboles en maceta o ramas del parental masculino. Sin embargo, un problema habitual de estas técnicas es la falta de sincronía en la floración de los dos cultivares (Okie y Weinberger, 1996), por lo que la emasculación de flores es muy usada en los programas de mejora de *Prunus*, incluyendo los de ciruelo japonés (Weinberger, 1975; Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008).

Aunque muchos cultivares de ciruelo japonés son el resultado de mutaciones o de polinizaciones accidentales, otros proceden de cruces dirigidos (Weinberger, 1975; Byrne, 1989; Okie y Weinberger, 1996; Okie y Ramming, 1999; Boonprakob *et al.*, 2001). Sin embargo, muchos cruces realizados mediante emasculación han producido cuajados muy bajos o incluso ausencia total de frutos (Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008). Un efecto negativo de la emasculación de flores en el cuajado también se ha observado en otros *Prunus* como almendro (*Prunus dulcis*



Batsch.; Kester *et al.*, 1994), guindo (*Prunus cerasus* L.; Brown *et al.*, 1996) y cerezo (*Prunus avium* L.; Hedhly *et al.*, 2009).

Se han sugerido varios factores como causas de la falta de cuajado en flores emasculadas de *Prunus*, como las condiciones ambientales adversas durante y después de la fase de floración (Okie y Weinberger, 1996), un estado de desarrollo de la yema inadecuado cuando se lleva a cabo la emasculación (Hjeltnes y Stanys, 1998), la pérdida de funciones nutritivas y protectoras del perianto tras la emasculación (Badr y Crane, 1965), posibles daños en el pistilo durante la emasculación (Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008) o la aceleración del proceso de degeneración de los óvulos tras la emasculación (Hedhly *et al.*, 2009). Sin embargo, las causas de la falta de cuajado en algunos cruces de ciruelo japonés no están claras.

En este trabajo se ha evaluado la influencia de la emasculación de flores en el cuajado en cuatro cultivares de ciruelo japonés. Para ello, se han comparado ensayos de polinización cruzada realizados en flores emasculadas y sin emasculadas en condiciones reales de cultivo. Para determinar qué factores del proceso reproductivo podrían estar relacionados con la falta de cuajado, se realizaron además observaciones al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos y del estado de desarrollo de los óvulos, y se relacionaron con el comportamiento de flores y frutos en desarrollo en el árbol.

## 7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2.1 *Material vegetal*

Se han utilizado seis cultivares de ciruelo de tipo japonés localizados en diferentes plantaciones comerciales de Aragón y Extremadura: 'Ambra', 'Angeleno', 'Black Diamond', 'Earliqueen', 'Fortune' y 'Golden Globe', con los que se realizaron varios ensayos de polinización. 'Black Diamond', 'Earliqueen', 'Fortune' y 'Golden Globe' fueron usados como parentales femeninos mientras que 'Ambra', 'Angeleno', 'Black Diamond' y 'Fortune' fueron usados como polinizadores (Tabla 7.1).

### **7.2.2 Ensayos de polinización en campo**

En cada parental femenino se realizaron polinizaciones cruzadas usando flores emasculadas y no emasculadas. Además se dejó una población de flores a polinización libre en cada cultivar, que fueron utilizadas como control (Tabla 7.1). El polen utilizado en cada cruce se obtuvo de flores en estado de botón globoso (Fig. 7.1A), en las que se separaron las anteras y se esparcieron en bandejas de papel a temperatura ambiente durante 24 h hasta su dehiscencia. El polen fue colado usando una malla de 0,26 mm de luz y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Los ensayos de polinización cruzada en flores no emasculadas se realizaron mediante polinización suplementaria (Williams, 1970a) en árboles bajo malla. Para evitar la llegada de insectos polinizadores, se cubrieron dos árboles de cada parental femenino con cabinas de malla de 0,8 mm de luz antes de la floración (Apartados 2.2.2 y 6.2.3). En estos árboles se seleccionaron entre 120 y 1560 flores por cultivar, en las que se realizó la polinización cruzada (Tabla 7.1) manualmente usando un pincel fino en días alternos hasta la apertura de todas las flores (Rodrigo y Herrero, 2002a), usando el polen previamente obtenido de los polinizadores elegidos en los cruces. Para la polinización de las flores emasculadas (Layne, 1983), se eliminaron las flores más adelantadas y las yemas más retrasadas de las ramas seleccionadas, dejando únicamente las yemas en estado de botón globoso (Fig. 7.1A). Entre 200 y 560 flores por cultivar y cruce se emascularon (Fig. 7.1B) y se polinizaron 24 h después usando un pincel limpio con el polen correspondiente

Ya que los cruces en flores no emasculadas se realizaron mediante polinización suplementaria sin eliminar las anteras de las flores, se analizó la posible autocompatibilidad de estos cultivares para determinar la posible influencia del propio polen en el cuajado. Para ello se realizaron autopolinizaciones mediante polinización suplementaria usando entre 1000 y 1760 flores no emasculadas de los mismos árboles cubiertos por la malla (Tabla 7.1). Las autopolinizaciones se realizaron con el polen de sus propias anteras mediante un pincel limpio en días alternos hasta la apertura de todas las flores.

Adicionalmente, un grupo de entre 1500 y 1830 flores de cada parental femenino se dejó a polinización libre como control en árboles sin cubrir con malla (Tabla 7.1).



**Figura. 7.1.** Flores de ciruelo japonés en estado de botón globoso (A) y después de la emasculación (B).

Para caracterizar la curva de caída y determinar el cuajado final en cada tratamiento, se realizaron conteos semanales de flores y frutos en desarrollo desde antesis hasta la recolección (Williams, 1970*b*).

### **7.2.3 Incompatibilidad polen-pistilo**

Para determinar la auto(in)compatibilidad de cada cultivar usado como parental femenino y la (in)compatibilidad de cada cruce, los mismos tratamientos de polinización que se realizaron en el campo también se realizaron en laboratorio. Se analizaron pistilos de cada tratamiento mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos usando microscopía de fluorescencia. Para ello, se recogieron flores en estado de botón globoso de cada cultivar, se llevaron al laboratorio, se emascularon y se colocaron en espuma de florista húmeda a temperatura ambiente (Rodrigo y Herrero, 1996). Al menos treinta flores por tratamiento fueron polinizadas

manualmente 24 h después de la emasculación con polen obtenido siguiendo el método descrito anteriormente (Apartados 2.2.2 y 6.2.2). Transcurridas 72 h tras la polinización, cuando los tubos polínicos han podido alcanzar la base del estilo (Capítulo 4), los pistilos fueron fijados en etanol : ácido acético (3:1) (Williams *et al.*, 1999) y almacenados a 4°C.

Para las preparaciones al microscopio, los pistilos fijados se lavaron tres veces con agua destilada a intervalos de una hora, con un lavado final con sulfito sódico al 5% (p/v) durante 24 h a 4°C. A continuación se autoclavaron durante 8 min a 1 kg/cm<sup>2</sup> en sulfito sódico al 5% para ablandar los tejidos (Jefferies y Belcher, 1974). Los pistilos fueron teñidos en preparaciones *squash* con una solución de azul de anilina en K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1N al 0,1% (v/v) para teñir la calosa (Linskens y Esser, 1957). El crecimiento de los tubos polínicos fue observado en un microscopio Olympus BH2 con luz UV epifluorescente usando un filtro excitador BP 355/425 y un filtro de barrera LP 470 (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) en al menos diez pistilos por cultivar y cruce. Se calculó el porcentaje de flores con tubos polínicos alcanzando la base del estilo para cada cultivar y tratamiento de polinización.

Para confirmar las relaciones de (in)compatibilidad de cada cruce, se identificó el genotipo *S* de cada cultivar mediante amplificación por PCR de sus *SRNasas*. El ADN genómico de cada cultivar fue extraído de hojas jóvenes siguiendo el protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones de Hormaza (2002). La identificación de los alelos *S* fue realizada utilizando los cebadores PruC2-PCER y PruT2-PCER (Tao *et al.*, 1999; Yamane *et al.*, 2001) siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 4 (Apartado 4.2.2).

#### **7.2.4 Desarrollo de óvulos**

Para la observación del estado de desarrollo de los óvulos con el microscopio, se recogieron entre 40 y 50 flores de cada cultivar y tratamiento 4 días después de la polinización y se fijaron en etanol : ácido acético (3:1). Se analizó el desarrollo de los dos óvulos de cada flor mediante la observación de depósitos de calosa en la zona de la calaza, que es un indicador de la degeneración del óvulo (Pimienta y Polito, 1982; Stösser y Anvari, 1982; Arbeloa y Herrero, 1985; Rodrigo y Herrero, 1998; Hedhly *et*

al., 2009), en al menos 10 pistilos por cultivar y tratamiento. El desarrollo de los óvulos se observó utilizando el mismo procedimiento de tinción con azul de anilina usado para observar el crecimiento de los tubos polínicos (Apartado 7.2.3). Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 equipado con luz UV epifluorescente con un filtro excitador BP340-390 y un filtro de barrera LP 425 (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Alemania).

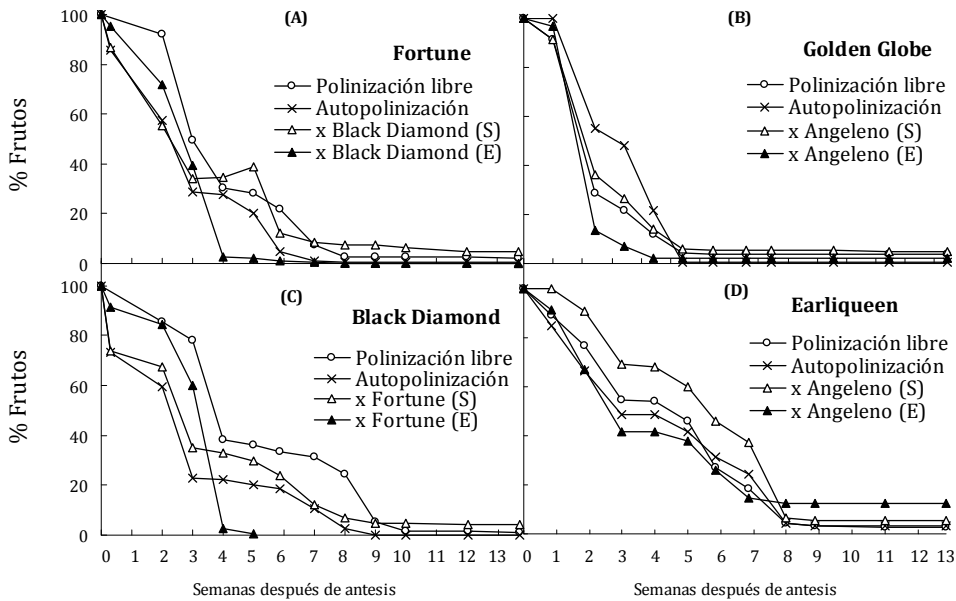
### **7.2.5 Análisis estadístico**

Se utilizó el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) para los análisis estadísticos. Se evaluó la asociación entre la emasculación de flores y el porcentaje de cuajado de frutos por un lado, y entre la emasculación de flores y el porcentaje de flores con los dos óvulos degenerados por otro. Los valores se analizaron con tablas de contingencia 2x2, utilizando el test Chi-cuadrado con la corrección de Yates o el estadístico exacto de Fisher, según los casos. Se consideró significación estadística para  $P < 0,05$ .

## **7.3. RESULTADOS**

### **7.3.1 Cuajado y caída de frutos**

El porcentaje de cuajado en las flores dejadas a polinización libre osciló entre 1,2 y 3,6 %. En ninguna de las cuatro autopolinizaciones se obtuvo cuajado (Tabla 7.1), lo que indicó la posible autoincompatibilidad de estos cultivares. Mientras que la caída de flores autopolinizadas en 'Fortune' (Fig. 7.2A) y 'Golden Globe' (Fig. 7.2B) se completó en las 6 semanas después de antesis, en 'Black Diamond' (Fig. 7.2C) y 'Earliqueen' (Fig. 7.2D) un grupo de flores autopolinizadas se mantuvieron en los árboles hasta la octava o novena semana después de antesis.



**Figura. 7.2.** Curvas de caída en distintos tratamientos de polinización realizados en cultivares de ciruelo japonés: Polinización libre, autopolinización y polinización cruzada, en flores emasculadas y no emasculadas. Porcentaje de flores y frutos que permanecen en el árbol respecto al número original de flores durante trece semanas después de antesis: 'Fortune' (A), 'Golden Globe' (B), 'Black Diamond' (C) y 'Earliqueen' (D).

El cuajado obtenido en los ensayos de polinización cruzada realizados con polinización suplementaria de flores no emasculadas osciló entre 0,1 y 5,1 % (Tabla 7.1) y fue mayor que el cuajado obtenido en los ensayos de polinización libre de cada cultivar, excepto en el caso de 'Golden Globe' x 'Fortune', en el que no se obtuvieron frutos (Tabla 7.1). La caída de flores de los cruces se estabilizó al mismo tiempo que las flores autopolinizadas completaron su caída. Sin embargo, para cada cruce, las flores emasculadas cayeron entre una y dos semanas antes que las flores sin emasculadas (Fig. 7.2).

**Tabla 7.1.** Tratamientos de polinización realizados, número de flores utilizadas, número de frutos cuajados, porcentaje de cuajado y porcentaje de pistilos con ambos óvulos degenerados en diferentes cultivares de ciruelo japonés.

Cultivar/ Cruce	Flores (nº)	Frutos (nº)	Cuajado (%)	Pistilos con los dos óvulos degenerados (%)
Black Diamond				
Polinización libre	1622	20	1,2	0
Autopolinización	1763	0	0,0	0
x Fortune (S)	517	17	3,3 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>
x Fortune (E)	531	0	0 <sup>2</sup>	78 <sup>2</sup>
Fortune				
Polinización libre	1514	30	2,0	0
Autopolinización	1016	0	0,0	0
x Ambra (S)	396	13	3,3 <sup>2</sup>	0 <sup>2</sup>
x Ambra (E)	559	1	0,2 <sup>2</sup>	80 <sup>2</sup>
x Black Diamond (S)	121	5	4,1 <sup>2</sup>	0 <sup>2</sup>
x Black Diamond (E)	535	1	0,2 <sup>2</sup>	100 <sup>2</sup>
Golden Globe				
Polinización libre	1611	58	3,6	0
Autopolinización	1222	4	0,3	0
x Angeleno (S)	1559	79	5,1 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>
x Angeleno (E)	206	5	2,4 <sup>1</sup>	44 <sup>1</sup>
x Fortune (S)	1539	4	0,3 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>
x Fortune (E)	211	0	0,0 <sup>1</sup>	22 <sup>1</sup>
Earliqueen				
Polinización libre	1831	54	2,9	0
Autopolinización	1562	2	0,1	0
x Ambra (S)	577	18	3,1 <sup>2</sup>	9 <sup>2</sup>
x Ambra (E)	450	48	10,7 <sup>2</sup>	70 <sup>2</sup>
x Angeleno (S)	540	28	5,2 <sup>2</sup>	0 <sup>1</sup>
x Angeleno (E)	527	65	12,3 <sup>2</sup>	30 <sup>1</sup>

E, Emasculación; S, Polinización suplementaria. <sup>1</sup> No significativo. <sup>2</sup> Significativo para  $P < 0,05$ . Asociación entre la emasculación de flores y el porcentaje de cuajado, y entre la emasculación de flores y el porcentaje de flores con los dos óvulos degenerados para cada cruce. Valores analizados con tablas de contingencia 2x2 utilizando el test Chi-cuadrado con corrección de Yates o el estadístico exacto de Fisher según los casos.

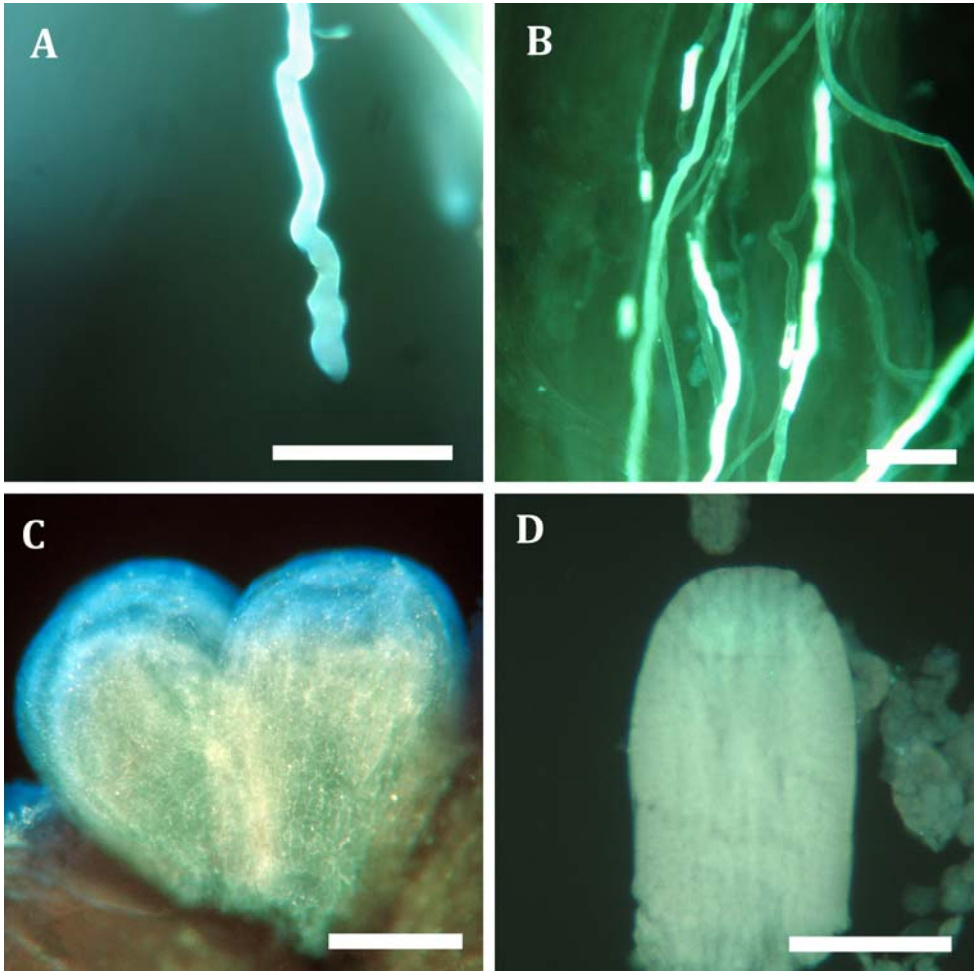
Dependiendo del cruce, la emasculación de flores afectó de diferente manera al cuajado respecto al obtenido en flores con polinización suplementaria (Tabla 7.1). La prueba Chi-cuadrado reveló una asociación significativa entre la emasculación y la falta de cuajado en 'Black Diamond' x 'Fortune' (N = 1048, Yates'  $\chi^2 = 15,748$ , g.l. = 1,  $P < 0,001$ ), 'Fortune' x 'Ambra' (N = 955, Yates'  $\chi^2 = 13,386$ , g.l. = 1,  $P < 0,001$ ) y 'Fortune' x 'Black Diamond' (N = 656, Yates'  $\chi^2 = 12,875$ , g.l.= 1,  $P < 0,001$ ). Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre la emasculación de flores y una reducción del cuajado en 'Golden Globe' x 'Angeleno' (N = 1765, Yates'  $\chi^2 = 2,246$ , g.l.= 1,  $P = 0,134$ ) ni 'Golden Globe' x 'Fortune' (N = 1750, Yates'  $\chi^2 < 0,001$ , g.l.= 1,  $P = 1$ ). El cruce 'Golden Globe' x 'Fortune' no produjo frutos, ni en flores emasculadas ni en flores con polinización suplementaria, indicando una posible incompatibilidad entre los dos cultivares. Por otro lado, el cuajado en flores emasculadas fue significativamente mayor que el cuajado en flores con polinización suplementaria en los cruces donde 'Earlqueen' fue el parental femenino: 'Earlqueen' x 'Ambra' (N = 1027, Yates'  $\chi^2 = 22,708$ , g.l.= 1,  $P < 0,001$ ) y 'Earlqueen' x 'Angeleno' (N = 1067, Yates'  $\chi^2 = 16,245$ , g.l.= 1,  $P < 0,001$ ) (Tabla 7.1).

### **7.3.2 Auto(in)compatibilidad y relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares**

En las flores de los cuatro cultivares autopolinizados, 'Black Diamond', 'Earlqueen', 'Fortune' y 'Golden Globe', los tubos polínicos detuvieron su crecimiento en el estilo (Fig. 7.3A) y ningún tubo polínico alcanzó la base del mismo (Tabla 7.2).

En los ensayos de polinización cruzada se obtuvieron porcentajes variables de pistilos con tubos polínicos creciendo a lo largo del pistilo (Fig. 7.3B) y alcanzando la base del estilo (Tabla 7.2). Mientras que en los cruces 'Black Diamond' x 'Fortune', 'Fortune' x 'Black Diamond', 'Earlqueen' x 'Ambra', 'Earlqueen' x 'Angeleno' y 'Golden Globe' x 'Angeleno' se observaron flores con tubos polínicos alcanzando la base del estilo, no se observó ningún tubo polínico llegando a la base del estilo en las flores analizadas del cruce 'Golden Globe' x 'Fortune'. Por lo tanto, los cuatro cultivares analizados se comportaron como autoincompatibles, mientras que todos los cruces excepto 'Golden Globe' x 'Fortune' fueron compatibles.

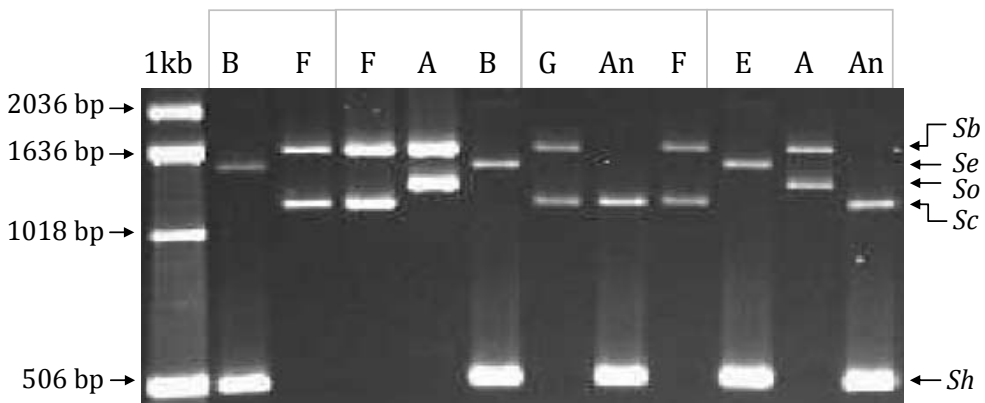




**Figura. 7.3.** Crecimiento de los tubos polínicos y estado de desarrollo de los óvulos en flores de ciruelo japonés: Tubo polínico detenido en el estilo en un cruce incompatible (A) (Barra = 50  $\mu\text{m}$ ), tubos polínicos avanzando hacia la base del estilo en un cruce compatible (B) (Barra = 50  $\mu\text{m}$ ), los dos óvulos degenerados con acumulación de calosa en la calaza (C) (Barra = 100  $\mu\text{m}$ ), óvulo bien desarrollado (D) (Barra = 100  $\mu\text{m}$ ).

**Tabla 7.2.** Tratamientos de polinización, porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y genotipo *S* de los diferentes cultivares de ciruelo japonés utilizados en polinizaciones realizadas en laboratorio.

Cultivar /Cruce	Pistilos con tubos	Genotipo <i>S</i>
Black Diamond		<i>SeSh</i>
Autopolinización	0	<i>SeSh</i> x <i>SeSh</i>
x Fortune	59	<i>SeSh</i> x <i>SbSc</i>
Fortune		<i>SbSc</i>
Autopolinización	0	<i>SbSc</i> x <i>SbSc</i>
x Ambra	-	<i>SbSc</i> x <i>SbSo</i>
x Black Diamond	50	<i>SbSc</i> x <i>SeSh</i>
Golden Globe		<i>SbSc</i>
Autopolinización	0	<i>SbSc</i> x <i>SbSc</i>
x Angeleno	91	<i>SbSc</i> x <i>ScSh</i>
x Fortune	0	<i>SbSc</i> x <i>SbSc</i>
Earliqueen		<i>SeSh</i>
Autopolinización	0	<i>SeSh</i> x <i>SeSh</i>
x Ambra	36	<i>SeSh</i> x <i>SbSo</i>
x Angeleno	27	<i>SeSh</i> x <i>ScSh</i>



**Figura 7.4.** Amplificación mediante PCR de los alelos de la *SRNasa*, usando los cebadores PruC2-PCER, en los cultivares de ciruelo japonés: Black Diamond (B), Fortune (F), Earliqueen (E), Ambra (A), Angeleno (An) y Golden Globe (G) procedentes de las diferentes fincas de ensayo. 1 kb : Estándar de tamaño.

El genotipo *S* de todos los cultivares utilizados en los ensayos de polinización se determinó mediante amplificación por PCR de sus *SRNasas* (Tabla 7.2; Fig. 7.4). Todos los cultivares analizados presentaron los alelos *S* descritos previamente (Sapir *et al.*, 2004; Capítulos 3 y 4), excepto el cultivar Golden Globe, que presentó alelos diferentes a los identificados en el Capítulo 4. Los análisis de PCR confirmaron la compatibilidad de todos los cruces, excepto ‘Golden Globe’ x ‘Fortune’, en el que ambos parentales presentaron los mismos alelos *S* y resultó incompatible.

### 7.3.3 Degeneración de óvulos

Para determinar las causas del distinto comportamiento observado entre flores emasculadas y no emasculadas del mismo cruce, se analizó en el microscopio el desarrollo de los óvulos en los dos tipos de flores de cada cruce realizado en campo. Los dos óvulos aparecieron degenerados (Fig. 7.3C) en un porcentaje variable (22 - 100%) de pistilos de los cruces realizados sobre flores emasculadas (Tabla 7.2). Sin embargo la mayoría de las flores sin emasculadas (90 - 100%) de los mismos cruces, todas las autopolinizadas y todas las dejadas a polinización libre presentaron al menos un óvulo bien desarrollado (Fig. 7.3D; Tabla 7.1). El número de flores con los dos óvulos degenerados fue significativamente mayor en las flores emasculadas que en las no emasculadas en los cruces ‘Black Diamond’ x ‘Fortune’ (N = 19, Yates’  $\chi^2 = 6,363$ , g.l.= 1,  $P = 0,005$ ), ‘Fortune’ x ‘Ambra’ (N = 18, Yates’  $\chi^2 = 8,508$ , g.l.= 1,  $P = 0,001$ ), ‘Fortune’ x ‘Black Diamond’ (N = 15, Yates’  $\chi^2 = 11,251$ , g.l.= 1,  $P < 0,001$ ) y ‘Earliqueen’ x ‘Ambra’ (N = 21, Yates’  $\chi^2 = 4,033$ , g.l.= 1,  $P = 0,024$ ). Sin embargo, no se encontró asociación significativa entre la emasculación de flores y la degeneración de óvulos en los cruces ‘Golden Globe’ x ‘Angeleno’ (N = 17, Yates’  $\chi^2 = 2,508$ , g.l.= 1,  $P = 0,082$ ), ‘Golden Globe’ x ‘Fortune’ (N = 19, Yates’  $\chi^2 = 0,685$ , g.l.= 1,  $P = 0,211$ ) y ‘Earliqueen’ x ‘Angeleno’ (N = 21, Yates’  $\chi^2 = 1,859$ , g.l.= 1,  $P = 0,104$ ).

#### **7.4. DISCUSIÓN**

La emasculación de flores causó la degeneración prematura de los óvulos y condicionó el cuajado en los cultivares de ciruelo de tipo japonés analizados. El análisis de los diferentes ensayos de polinización realizados en campo y el estudio de las relaciones de compatibilidad entre los cultivares permitió descartar otros factores del proceso reproductivo como causa de los bajos cuajados e identificar la degeneración prematura de ambos óvulos como la causa responsable de la esterilidad femenina observada en las flores emasculadas.

El porcentaje de cuajado obtenido en los ensayos de polinización libre fue representativo del cuajado de ciruelo japonés en condiciones de cultivo (Capítulos 2 y 6). La polinización suplementaria de flores aumentó el cuajado en la mayoría de cruces, y sólo en las autopolinizaciones y en un cruce incompatible no se obtuvo cuajado. Sin embargo, la emasculación de flores tuvo un efecto variable en el cuajado dependiendo del parental femenino de cada cruce. En otros trabajos se ha observado que la emasculación de flores provoca un aumento del cuajado en diferentes especies de *Prunus* como melocotonero (Arbeloa y Herrero, 1991), cerezo (Theiler-Hedtrich, 1994), albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002b; Rodrigo *et al.*, 2009), almendro (Sociás i Company *et al.*, 2005), o en cruces interespecíficos (Arbeloa *et al.*, 2006). Este aumento de cuajado en flores emasculadas puede ser explicado por el hecho de que antes de la emasculación se eliminan aquellas flores que presentan alguna anomalía o que tienen el pistilo mal desarrollado, polinizándose únicamente las flores que se encuentran en buen estado de desarrollo. Igualmente, la polinización manual de las flores emasculadas puede aumentar sus posibilidades de cuajar, ya que se asegura la llegada de polen compatible al estigma. Sin embargo, la emasculación de flores también ha sido relacionada con una reducción significativa del cuajado en algunos cultivares de almendro (Kester *et al.*, 1994), cerezo (Hedhly *et al.*, 2009) y ciruelo japonés (Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008).

Los resultados de este trabajo muestran que la emasculación de flores en ciruelo japonés tuvo una clara influencia en el cuajado, causando un incremento, reducción o incluso la ausencia de cuajado, dependiendo del cultivar. Aunque en 'Earlqueen' la emasculación de las flores provocó un aumento del cuajado, en los

otros cultivares el cuajado se redujo drásticamente ('Golden Globe') o incluso no se obtuvo cuajado ('Black Diamond' y 'Fortune'). Además, el patrón de caída en 'Earliqueen' fue diferente al de los otros cultivares analizados. Así, la caída de flores emasculadas en 'Earliqueen' siguió el mismo patrón que en las flores con polinización suplementaria y en ambas poblaciones la caída no se completó hasta la novena semana después de la polinización. Sin embargo, en los otros cultivares la caída de las flores emasculadas se completó en la quinta semana después de la polinización, varias semanas antes del establecimiento del cuajado en las flores polinizadas con polinización suplementaria.

El diferente comportamiento observado entre los distintos cultivares analizados, tanto en el efecto de la emasculación en el cuajado como en el patrón de caída, podría estar relacionado con el diferente origen de cada cultivar. En la actualidad, el término "ciruelo japonés" no se corresponde a una especie pura, sino que comprende un grupo heterogéneo de ciruelos diploides que proceden de la hibridación interespecífica de la especie original, *P. salicina*, con otros ciruelos diploides como *P. americana*, *P. hortulana*, *P. munsoniana*, *P. simonii*, *P. nigra*, *P. besseyi*, *P. angustifolia* y *P. cerasifera* (Byrne, 1989; Faust y Suranyi, 1999; Okie, 2006).

La observación del crecimiento de los tubos polínicos confirmó la autoincompatibilidad de 'Black Diamond', 'Earliqueen', 'Fortune' y 'Golden Globe', ya que no se observó ningún tubo polínico en la base del estilo en las flores autopolinizadas de estos cultivares y tampoco se obtuvo cuajado en las autopolinizaciones realizadas en campo. Por otro lado, todos los cruces analizados fueron compatibles, excepto 'Golden Globe' x 'Fortune', en cuyas flores no se observaron tubos polínicos en la base del estilo. El porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo en los cruces compatibles fue menor que el observado en otros *Prunus*, pero similar al observado en otros cultivares de ciruelo japonés (Capítulo 4).

La identificación de los alelos *S* de los seis cultivares analizados complementó los resultados de cuajado en campo y de crecimiento de tubos polínicos. En todos los cruces, las relaciones de compatibilidad se correspondieron con los datos de cuajado de flores con polinización suplementaria y permitieron descartar la incompatibilidad como causa de falta de cuajado en los cruces realizados en flores emasculadas. Los

resultados confirmaron el genotipo *S* de 'Ambra', 'Angeleno', 'Black Diamond', 'Earliqueen' y 'Fortune' descritos en otros trabajos (Sapir *et al.*, 2004; Capítulo 4). Sin embargo, el genotipo *S* de 'Golden Globe', identificado en este trabajo como *SbSc*, resultó diferente al descrito previamente (*SbSf*) (Capítulo 4). Puesto que este cultivar es descendiente del cruce entre los cultivares Laroda (*SbSc*) y Queen Ann (*SbSh*) (Ramming, 1994), parece probable que el genotipo de 'Golden Globe' sea *SbSc*. La existencia de homonimias en éste y otros cultivares de ciruelo japonés podría explicar situaciones de falta de cuajado en fincas comerciales en las que los cultivares polinizadores aparentemente compatibles pueden tener una denominación incorrecta.

Los resultados de los ensayos de campo y laboratorio indicaron que los cuatro cultivares son autoincompatibles. Sin embargo, 'Black Diamond' y 'Earliqueen' tienen el alelo *Se* en su genotipo, el cual ha sido correlacionado con el carácter de autocompatibilidad en algunos cultivares de ciruelo japonés (Beppu *et al.*, 2005, 2010b; Capítulo 4). Sería necesario realizar nuevos ensayos, tanto de cuajado y crecimiento de tubos polínicos como de análisis molecular, para confirmar que el alelo *Se* está correlacionado con la autocompatibilidad en otros cultivares.

El alto porcentaje de flores emasculadas que mostraron calosa en los dos óvulos, en los que por tanto no se pudo producir la fecundación, está correlacionado con la gran reducción de cuajado en los cultivares afectados. Las flores de *Prunus* presentan dos óvulos en un único carpelo, y la fecundación de al menos un óvulo es necesaria para el cuajado. Uno de los dos óvulos, el óvulo primario, puede ser fecundado y llegar a semilla; el otro, el óvulo secundario, generalmente aborta (Bradbury, 1929). Los dos óvulos presentes en cada flor presentan un tamaño similar en antesis, pero mientras que el óvulo primario continúa creciendo en los días siguientes, el óvulo secundario detiene su crecimiento y degenera. La degeneración del óvulo secundario ha sido relacionada con la aparición de calosa, que comienza a acumularse en el extremo de la calaza en la nucela, y desde allí se extiende por todo el óvulo (Pimienta y Polito, 1982; Stösser y Anvari, 1982; Arbeloa y Herrero, 1991; Rodrigo y Herrero, 1998; Cerović y Mičić, 1999; Cerović *et al.*, 2000). Aunque la degeneración prematura de uno de los dos óvulos forma parte del proceso normal de desarrollo de las flores de *Prunus*, la degeneración simultánea de los dos óvulos ha

sido asociada a esterilidad femenina en diferentes especies de *Prunus* (Lillecrapp *et al.*, 1999; Mert y Soylu, 2007; Capítulo 6). Igualmente, la degeneración de los óvulos se ha relacionado con la reducción del cuajado en flores emasculadas en algunos cultivares de cerezo (Hedhly *et al.*, 2009). Los resultados de este trabajo muestran que la degeneración de los óvulos causada por la emasculación también puede reducir e incluso impedir el cuajado en algunos cultivares de ciruelo japonés.

La emasculación de flores como causa de la degeneración de óvulos y la falta de cuajado fue clara en tres de los cultivares analizados en este trabajo. Esta situación podría explicar situaciones de falta de descendencia en algunos cruces realizados en programas de mejora sin causas aparentes (Okie y Weinberger, 1996; Okie y Hancock, 2008). Como alternativa, los cruces con cultivares en los que la emasculación provoca falta de cuajado podrían realizarse mediante polinización suplementaria de flores no emasculadas en ramas o árboles cubiertos con malla. En el caso de que el parental femenino sea un cultivar autoincompatible, toda la descendencia procedería del cruce realizado. Sin embargo, en cultivares autocompatibles, la descendencia incluiría también individuos provenientes de la autopolinización. En este caso, el uso de los alelos *S* de incompatibilidad como marcadores moleculares podría ser de utilidad para identificar aquellos genotipos resultantes del cruce deseado, como se han utilizado en otros *Prunus* para identificar el parental masculino en los individuos de una descendencia (Sebolt e Iezzoni, 2009).

Los resultados de este trabajo mostraron una gran incidencia de la emasculación en el cuajado relacionada con la degeneración de los dos óvulos. Los cruces realizados con esta técnica pueden aumentar, reducir o incluso impedir el cuajado dependiendo del cultivar. Esta información puede ser útil para identificar las causas de la falta de descendencia en algunos cruces realizados en programas de mejora. Esta situación podría solucionarse a través del uso de métodos alternativos a la emasculación de flores en cultivares sensibles.





## 8. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo de esta tesis es determinar las causas de los cuajados erráticos registrados en algunos cultivares de ciruelo japonés. Los resultados obtenidos han puesto de relieve que la polinización juega un papel decisivo en el establecimiento del cuajado y que en la mayoría de cultivares es necesaria una elección adecuada de polinizadores para que se produzca cuajado. La combinación de los ensayos de polinización y cuajado en campo (Capítulo 2) con la determinación de la autoincompatibilidad, mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio (Capítulos 3 y 4) y la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad mediante marcadores moleculares (Capítulos 3, 4 y 5), ha permitido identificar las causas de los bajos cuajados de 12 cultivares en 9 plantaciones comerciales. Entre estos se han identificado 11 cultivares autoincompatibles, para los que se han podido seleccionar cultivares polinizadores compatibles y coincidentes en floración en las condiciones de cultivo de cada plantación, lo que ha permitido aportar soluciones agronómicas a cada uno de los casos de falta de cuajado asociada a problemas de polinización (Capítulos 2 y 3). Se ha evaluado la auto(in)compatibilidad en otros 17 cultivares, identificando 7 autocompatibles y 10 autoincompatibles. Se ha determinado también el genotipo *S* de 115 cultivares, 97 de ellos identificados por primera vez en este trabajo, entre los que se incluyen la mayoría de los cultivados en la actualidad, mediante técnicas moleculares ya establecidas y otras de alta sensibilidad puestas a punto en este trabajo, lo que ha permitido distribuir los cultivares en sus correspondientes grupos de incompatibilidad y agilizar el proceso de selección de polinizadores (Capítulos 4 y 5). Finalmente, en algunos cultivares se han detectado situaciones de falta de cuajado no relacionadas con problemas de polinización, sino con problemas en el desarrollo de los óvulos. Por un lado, en las flores emasculadas de algunos cruzamientos y, por otro, en plantaciones comerciales de nuevos cultivares, donde las situaciones de falta de cuajado se han asociado a la degeneración prematura de los dos óvulos de la flor (Capítulos 6 y 7).

## 8.1. INFLUENCIA DE LA POLINIZACIÓN EN EL PROCESO REPRODUCTIVO

### 8.1.1 Germinación del polen

En el género *Prunus*, la fecundación de al menos uno de los dos óvulos presentes en la flor es indispensable para que se establezca el cuajado (Bradbury, 1929; Dorsey, 1929; Rodrigo y Herrero, 1998), ya que en *Prunus* no se producen frutos partenocárpicos (Sedgley y Griffin, 1989; Hartmann y Neumüller, 2009). Por lo tanto, para que se produzca la fecundación es necesario que existan gametos femeninos y masculinos viables y compatibles y que además coincidan en un estado de desarrollo adecuado (Herrero y Arbeloa, 1989; Herrero, 1992, 2000, 2001). Aunque el ciruelo japonés genera un número de flores muy elevado, considerablemente mayor que en otros *Prunus*, en algunos cultivares se produce una caída masiva de flores y se obtienen porcentajes de cuajado muy bajos por causas que no están bien establecidas (Okie y Weinberger, 1996; Okie, 2006; Hartmann y Neumüller, 2009).

La mayoría de los cultivares de ciruelo japonés producen polen viable, aunque se han detectado algunos cultivares androestériles que presentan anteras sin granos de polen o con muy pocos granos de polen de pequeño tamaño y sin capacidad de germinación, como 'Red Beaut' (Herrero y Salvador, 1980), 'First Beaut' (Ramming, 1995) y 'Red Beaut-606' (González, 2002). En otros cultivares se han observado problemas de viabilidad de polen, como 'Black Beaut' y 'Royal Garnet' (González, 2002). En esta tesis se han identificado dos nuevos cultivares con problemas de androesterilidad: 'Black Jewell', que no mostró granos de polen en sus anteras, y 'Sybarite', que presentó muy pocos granos con un porcentaje de germinación muy bajo (Capítulo 6). Aunque el número de cultivares androestériles es muy reducido respecto al elevado número de cultivares existentes en la actualidad, se trata de un carácter a tener en cuenta en la selección de cultivares para el establecimiento de nuevas plantaciones y en la selección de nuevos cultivares en los programas de mejora.

### 8.1.2 Crecimiento de los tubos polínicos

Tras la polinización, se produce la germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos a través del estilo hasta llegar al ovario, donde se produce la fecundación del óvulo. En las flores de la mayoría de los cruces realizados en esta tesis entre cultivares compatibles, se ha observado un porcentaje muy variable de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo, pero muy inferior al observado en otras especies de *Prunus* (Hormaza y Herrero, 1996; Rodrigo y Herrero, 1996; Burgos *et al.*, 1997; Dicenta *et al.*, 2002; Alonso y Socías i Company, 2005; Hedhly *et al.*, 2005, 2007; Milatović y Nikolić, 2007; Rodrigo *et al.*, 2009; Julián *et al.*, 2010). Esta situación podría estar causada por factores externos, como las condiciones ambientales, como se ha visto en otros *Prunus* (Thompson y Liu, 1973; Socías i Company, 1976; Cerović y Ružić, 1992; Hedhly *et al.*, 2004), que podrían haber provocado un desarrollo más lento de los tubos polínicos y que se fijaran los pistilos antes de que los tubos polínicos hubieran alcanzado la base del estilo. Pero los bajos porcentajes de pistilos con tubos polínicos alcanzando el ovario se corresponden con los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en la mayoría de cultivares, que también son muy inferiores a los de otros *Prunus* como albaricoquero (Rodrigo y Herrero, 2002a), almendro (Kester y Griggs, 1959) o cerezo (Hedhly *et al.*, 2007). Esta situación tiene una implicación directa en la metodología empleada para la evaluación de la incompatibilidad polen-pistilo en ciruelo japonés, ya que es necesario analizar al microscopio un número de flores mayor que en otros *Prunus* para evitar falsos positivos en la evaluación de este carácter; pero también plantea nuevas incógnitas, ya que existe un porcentaje muy alto de flores polinizadas adecuadamente con polen compatible en las que los tubos polínicos no logran llegar al ovario y en las que por tanto no se produce la fecundación y se acaban desprendiendo del árbol. Aunque las causas de esta situación no han sido analizadas, la gran cantidad de flores que se producen en ciruelo japonés y los bajos porcentajes de cuajado obtenidos en la mayoría de cultivares parecen indicar que muchas de las flores no tienen la misma capacidad de cuajado que las que llegan a transformarse en fruto. En otras especies se ha observado que flores aparentemente hermafroditas se comportan sólo como masculinas y tienen una función de fuente de polen. Aunque estas flores no tienen capacidad de transformarse en fruto, la presencia

de estambres atrae a los insectos polinizadores y facilitan la dispersión del polen, lo cual aumentaría las posibilidades de las flores hermafroditas de ser polinizadas (Mayer y Charlesworth, 1991). La parada del crecimiento de los tubos polínicos en el estilo observada en muchas flores de los cruces compatibles analizados en esta tesis podría estar relacionada con el estado nutritivo de las flores afectadas. Por un lado, los tubos polínicos utilizan los carbohidratos presentes en el tejido transmisor para crecer a lo largo del estilo (Herrero y Dickinson, 1979; Arbeloa y Herrero, 1987; Herrero y Hormaza, 1996) y por otro, se han observado importantes diferencias en el contenido de almidón entre flores del mismo árbol en distintas especies (Rodrigo *et al.*, 2000, 2009; Alcaraz *et al.*, 2010). La cantidad de reservas de carbohidratos presentes en el pistilo podría influir en el crecimiento de los tubos polínicos y condicionar la capacidad de cuajado de la flor.

## **8.2. INTERACCIÓN POLEN-PISTILO**

### **8.2.1 *Auto(in)compatibilidad***

Tradicionalmente se ha considerado que la mayoría de los cultivares de ciruelo japonés son autoincompatibles y necesitan polinización cruzada para el establecimiento del cuajado (Okie y Weinberger, 1996; Sapir *et al.*, 2004; Halász *et al.*, 2007). Sin embargo, la auto(in)compatibilidad no se ha estudiado en profundidad, y los cultivares se han venido considerando autoincompatibles si presentaban problemas de producción y autocompatibles si presentaban altos porcentajes de cuajado. Aunque el uso de cultivares polinizadores es un hecho generalizado en la mayoría de plantaciones comerciales, no ha existido información adecuada para realizar la selección de cultivares polinizadores de forma correcta, y en muchos casos, éstos se han seleccionado por su interés comercial o por coincidir en la época de floración, sin tener en cuenta las relaciones de compatibilidad entre cultivares, ya que se desconocían. Esto ha provocado situaciones de falta de cuajado y producciones erráticas en muchos cultivares y plantaciones.

En esta tesis se ha analizado la auto(in)compatibilidad de un total de 30 cultivares, incluyendo los que tienen mayor importancia económica en la actualidad

(Capítulos 3, 4 y 6; Anexo 6). Se ha determinado que 22 son autoincompatibles y ocho son autocompatibles. De los 22 cultivares autoincompatibles, 12 fueron estudiados en condiciones de cultivo en plantaciones comerciales, y en todos los casos se pudieron seleccionar cultivares polinizadores compatibles y coincidentes en floración, lo que ha permitido no sólo detectar la causa de la falta de cuajado en los principales cultivares sino solucionar el problema (Capítulos 3 y 4). Se ha determinado por primera vez la autoincompatibilidad de los cultivares Black Gold, Black Star, Earliqueen, Golden Japan y Larry Ann (Capítulos 2, 3 y 4), Angeleno (Capítulos 2 y 4; Anexo 6), Ambra, Eldorado, Golden Plum, Green Sun, Howard Sun, TC Sun (Capítulo 4; Anexo 6) y Sweet August (Capítulo 6; Anexo 6), y se ha confirmado la autoincompatibilidad de una serie de cultivares que habían sido descritos tanto como autocompatibles como autoincompatibles: Blackamber (Ramming y Tanner, 1981; Capítulos 3 y 4; Anexo 6), Black Diamond (Crane y Lawrence, 1929; Calzoni y Speranza, 1998; Capítulos 3 y 4; Anexo 6), Fortune (Ramming, 1993; Montagnon, 2002; Capítulos 3 y 4; Anexo 6), Golden Globe (Ramming, 1994; Montagnon, 2002; Capítulos 3 y 4; Anexo 6), Frontier, Laroda, Queen Ann, Queen Rosa (Brooks y Olmo, 1997; Capítulo 4; Anexo 6) y Songold (Hurter, 1972; Montagnon, 2002; Capítulos 3 y 4; Anexo 6).

Los otros ocho cultivares analizados se han comportado como autocompatibles (Casselman, Friar, Laetitia, Nubiana, Rubirosa, Santa Rosa, Simka y Zanzi Sun). Se ha confirmado la autocompatibilidad de dos cultivares, 'Laetitia' y 'Santa Rosa' (Capítulo 4; Anexo 6), cuya autocompatibilidad había sido descrita previamente (Ramming y Cociu, 1990; Crane y Lawrence, 1929). Por el contrario, 'Rubirosa', que había sido descrito como autoincompatible (Ramming, 2004), se ha comportado como autocompatible en este trabajo (Capítulo 6; Anexo 6). Los cultivares Casselman y Zanzi Sun (Capítulo 4; Anexo 6) y Simka (Capítulos 4 y 6; Anexo 6) han sido descritos como autocompatibles por primera vez en este trabajo.

En dos cultivares, Friar y Nubiana, se han obtenido resultados contradictorios en diferentes ensayos. 'Friar' había descrito previamente como autoincompatible (Brooks y Olmo, 1997), y en este trabajo una accesión de 'Friar' se comportó como autoincompatible (Capítulo 4), mientras que otras accesiones fueron autocompatibles (Capítulos 2 y 3). El cultivar Nubiana, descrito previamente como autocompatible (Brooks y Olmo, 1997), se ha comportado como autoincompatible (Capítulos 2 y 3) y

autocompatible (Capítulo 4), dependiendo de la accesión estudiada. Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferentes causas. Por un lado, se han detectado errores en la denominación de algunos cultivares, como Friar y Nubiana, en los que las distintas accesiones analizadas eran genotipos distintos (Capítulo 4) y en los que sería necesario estudiar la auto(in)compatibilidad en material vegetal de referencia. Por otro lado, las diferencias encontradas en la literatura respecto a la autoincompatibilidad de algunos cultivares (Angelino, Black Diamond, Fortune, Friar, Golden Globe, Nubiana, Rubirosa y Songold), pueden deberse a que en la mayoría de los casos sólo se han realizado observaciones en campo, en los que otros factores han podido enmascarar los resultados.

La autocompatibilidad en ciruelo japonés se ha relacionado con una disfunción del alelo *Se* (Beppu *et al.*, 2005) y con la función del pistilo de este alelo (Watari *et al.*, 2007). En este trabajo, el análisis del genotipo *S* en los cultivares analizados determinó la presencia del alelo *Se* en 37 cultivares (Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7). En nueve de estos cultivares con el alelo *Se* se estudió la auto(in)compatibilidad mediante autopolinizaciones (Capítulos 2, 3, 4, 6 y 7). En cuatro de ellos no se observó comportamiento autocompatible ('Black Diamond', 'Black Gold', 'Black Star' y 'Earlqueen'), mientras que los cinco restantes ('Casselman', 'Laetitia', 'Rubirosa', 'Santa Rosa' y 'Simka') sí se comportaron como autocompatibles. Estos resultados indican que el alelo *Se* no siempre está asociado a la autocompatibilidad en ciruelo japonés. No se conocen las causas por las que unos genotipos con alelo *Se* se comportan como autocompatibles y otros como autoincompatibles. Es posible que exista una versión no mutada del alelo *Se* que sea autoincompatible, o que exista otro alelo distinto que se confunda con éste en la detección en algunos cultivares. La clonación y secuenciación de los alelos de estos cultivares podría esclarecer esta situación. Además, en este trabajo se identificaron tres cultivares autocompatibles (Friar, Nubiana y Zanzi Sun) que no tienen el alelo *Se*. Estos tres cultivares comparten el alelo *Sb*, lo que sugiere que este alelo podría estar asociado a la autocompatibilidad en algunos cultivares y ser una fuente de autocompatibilidad no identificada previamente (Guerra *et al.*, 2009; Capítulo 4). Otros cultivares autocompatibles con el alelo *Sb* han sido identificados posteriormente (Beppu *et al.*, 2010a). La coexistencia de cultivares autoincompatibles y autocompatibles en este cultivo hace necesaria la

profundización en el estudio de este carácter en el resto de cultivares no analizados hasta ahora.

### **8.2.2 Relaciones de (in)compatibilidad entre cultivares**

El uso de marcadores moleculares ha permitido analizar y determinar el genotipo *S* de 115 cultivares, 97 de ellos identificados por primera vez en este trabajo (Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7; Anexos 4 y 5), que incluyen la mayoría de los cultivados en la actualidad, algunos cultivares de reciente introducción y otros antiguos muy utilizados como parentales en programas de mejora, como genotipos de *P. salicina* ('Abundance', 'Kelsey') y de *P. simonii* ('Simon'). Para la correcta identificación del genotipo *S* de los cultivares, se han establecido los tamaños de amplificación de 14 alelos de incompatibilidad distintos (*Sa-Sh*, *Sk*, *So-Ss*), cinco de los cuales han sido descritos por primera vez en esta tesis (*So-Ss*) (Capítulos 3, 4, 5, 6 y 7). Esto se ha llevado a cabo mediante PCR y dos metodologías de detección diferentes: electroforesis en geles de agarosa y electroforesis capilar. El desarrollo de un método de detección mediante electroforesis capilar ha permitido una identificación más sensible y por tanto más eficaz del genotipo *S*. Esta metodología ha sido además ensayada con dos analizadores genéticos diferentes (Capítulo 5), lo que proporciona información de gran utilidad para estudios de identificación del genotipo *S* en este cultivo. La identificación del genotipo *S* de los cultivares ha permitido incluirlos en los grupos de incompatibilidad correspondientes y conocer las relaciones de incompatibilidad entre ellos (Anexos 4 y 5). En esta tesis se han descrito 14 nuevos grupos de incompatibilidad (VIII-XXI) (Capítulos 4 y 5), que unidos a los siete descritos anteriormente (I-VII) (Halász *et al.*, 2007) hacen un total de 21 grupos de incompatibilidad (Anexos 4 y 5). Esta información conforma una herramienta muy útil en el cultivo del ciruelo japonés, ya que permite descartar cultivares polinizadores incompatibles en el diseño de plantaciones y la identificación de posibles problemas de incompatibilidad entre cultivares en plantaciones ya establecidas.

En algunos estudios de cruces semicompatibles, aquellos en los que los cultivares sólo difieren en un alelo *S*, se ha observado que el porcentaje de cuajado se reduce aproximadamente a la mitad respecto al obtenido en cruces entre cultivares

## *Discusión general*

con los dos alelos *S* diferentes (Sapir *et al.*, 2008a). En este trabajo, en algunos cruces semicompatibles como 'Black Star' (*SeSf*) x 'Black Diamond' (*SeSh*) y 'Fortune' (*SbSc*) x 'Ambra' (*SbSo*) se obtuvo aproximadamente la mitad de cuajado que en otros cruces compatibles realizados con los mismos parentales femeninos, 'Black Star' (*SeSf*) x 'Larry Ann' (*SbSh*) y 'Fortune' (*SbSc*) x 'Black Diamond' (*SeSh*). Sin embargo, en el cruce 'Earliqueen' (*SeSh*) x 'Angeleno' (*ScSh*) se obtuvo un cuajado superior al de 'Earliqueen' (*SeSh*) x 'Ambra' (*SbSo*), por lo que no se puede confirmar la relación entre semicompatibilidad y reducción de cuajado en todos los cultivares de ciruelo japonés.

El análisis molecular del genotipo *S* también ha permitido comprobar la identidad de diferentes accesiones del mismo cultivar pero de distinta procedencia. En 24 cultivares se analizó el genotipo *S* de al menos dos accesiones diferentes. En 19 de estos cultivares, las distintas accesiones presentaron el mismo genotipo *S*, pero en los otros cuatro ('Golden Globe', 'Golden Plum', 'Kelsey' y 'Nubiana') se detectaron genotipos diferentes en las distintas accesiones de cada cultivar (Capítulos 3, 4 y 5). También se identificaron discrepancias entre el genotipo *S* detectado en esta tesis y el descrito en otros trabajos para los cultivares Abundance (*SaSk*), Friar (*SbSh*) y Green Sun (*SbSc*) (Capítulos 3, 4 y 5), que no coincide con lo descrito por otros autores Abundance (*SfSh*; Beppu *et al.*, 2003), Friar (*ShSk*; Halász *et al.*, 2007) y Green Sun (*ScSh*; Halász *et al.*, 2007)]. El hecho de que genotipos diferentes presenten la misma denominación puede deberse a errores en la denominación del material vegetal en las distintas plantaciones y colecciones analizadas o a la existencia de homonimias, genotipos diferentes con la misma denominación. Para esclarecer esta situación, sería necesario caracterizar el genotipo de estos cultivares en material vegetal de referencia. Sin embargo, el hecho de que más del 20 % de los cultivares analizados en condiciones reales de cultivo en esta tesis no estén bien identificados o presenten problemas de denominación indica que puede tratarse de una situación generalizada en el cultivo de ciruelo japonés, lo que tendría gran incidencia en la posible elección errónea de cultivares polinizadores.



### 8.3. OTROS FACTORES IMPLICADOS EN LA FALTA DE CUAJADO

#### 8.3.1 Esterilidad femenina

Una vez identificada la polinización como factor determinante del cuajado (Capítulos 2, 3 y 4) y la incompatibilidad polen-pistilo como la causa de la falta de cuajado en la mayoría de cultivares y situaciones analizadas (Capítulos 4, 5 y 6), también se detectaron otras situaciones en las que se producían bajos o incluso nulos porcentajes de cuajado no asociados a problemas de polinización. El análisis al microscopio de flores de los cultivares afectados permitió descartar la viabilidad del polen y su transferencia como causas de la falta de cuajado. Igualmente, la observación del crecimiento de los tubos polínicos, junto con el análisis de PCR del genotipo *S* de estos cultivares y sus polinizadores, también permitió descartar la incompatibilidad polen-pistilo como responsable de la falta de cuajado. Sin embargo, la observación del desarrollo de los óvulos al microscopio reveló una alta incidencia de la degeneración prematura de los dos óvulos presentes en cada flor como la causa de la falta de cuajado (Capítulos 6 y 7).

Esta circunstancia se observó en dos situaciones de falta de cuajado diferentes. Por un lado, en un grupo de cultivares en los que la degeneración de los óvulos fue causada por la emasculación de las flores llevada a cabo para realizar cruces, ya que en los mismos cruces realizados sobre flores sin emascular el cuajado alcanzó porcentajes normales, y mientras que la mayoría de flores emasculadas presentaron los dos óvulos degenerados, todas las flores no emasculadas tenían al menos un óvulo bien desarrollado (Capítulo 7).

Por otro lado, la degeneración prematura de óvulos también se observó en flores sin emascular de dos nuevos cultivares en una plantación comercial con un historial de bajos cuajados. La mayoría de flores de estos cultivares también presentaron los dos óvulos degenerados (Capítulo 6). Aunque no se pudieron identificar las causas que provocaron la prematura degeneración de los óvulos en este caso, los resultados apuntaron a factores externos. Mientras que en las flores de *Prunus* la degeneración de uno de los dos óvulos antes de la fecundación del otro se ha

## *Discusión general*

observado en diferentes especies (Eaton y Jamont, 1965; Pimienta y Polito, 1982; Arbeloa y Herrero, 1991; Rodrigo y Herrero, 1998; Cerović *et al.*, 1999), la degeneración prematura de los dos óvulos no es una situación habitual en frutales de hueso, en los que se conocen muy pocos casos en los que la degeneración de ambos óvulos ha sido asociada a factores externos. Aunque la degeneración de ambos óvulos se ha relacionado con causas genéticas en un cultivar de cerezo (Mert y Soyly, 2007), en los dos nuevos cultivares de ciruelo japonés estudiados en esta tesis se descartaron los factores genéticos como causa de esterilidad femenina, ya que ambos cultivares presentan porcentajes de cuajado adecuados en otras plantaciones (Capítulo 6). En estos dos nuevos cultivares, de reciente introducción y de los que no existen muchos datos de su comportamiento agronómico ni reproductivo en la zona de cultivo, las causas de la degeneración de los óvulos podrían ser debidas a problemas de adaptación de los cultivares o a factores externos. Distintos factores meteorológicos han sido asociados a degeneración de óvulos en otros *Prunus*, como las heladas de primavera (Rodrigo, 2000) o las altas temperaturas antes (Rodrigo y Herrero, 2002b) o después de floración (Hedhly *et al.*, 2007, 2009). Problemas en el desarrollo de los óvulos resultando en falta de cuajado también han sido asociados a distintos tratamientos fitosanitarios (Stösser y Anvari, 1982; Morenol *et al.*, 1992; Herrero, 2000; Beppu *et al.*, 2001).

Mientras que las causas que provocan la prematura degeneración de los óvulos parecen estar relacionadas con factores externos, ya sean de manipulación de las flores (Capítulo 7), tratamientos fitosanitarios o problemas de adaptación (Capítulo 6), el hecho de que se haya observado en diferentes cultivares y situaciones sugiere que algunos cultivares pueden tener tendencia a presentar problemas de esterilidad femenina. La prematura degeneración de los dos óvulos de la misma flor podría ser un factor limitante del cultivo en otros cultivares y situaciones, y se debería considerar junto a la falta de polinización y la incompatibilidad polen-pistilo como posibles causas en situaciones de bajo cuajado sin aparentes causas externas.

### 8.3.2 Origen de los cultivares y comportamiento agronómico

Los genotipos de ciruelo japonés (*P. salicina*) llevados a California desde Japón por Burbank en el s. XIX y sus descendencias, se cruzaron con distintas especies de *Prunus* como *P. alleghaniensis*, *P. angustifolia*, *P. americana*, *P. besseyi*, *P. cerasifera*, *P. geniculata*, *P. hortelana*, *P. maritima*, *P. mexicana*, *P. munsoniana*, *P. nigra*, *P. simonii* o *P. umbellata* (Okie y Ramming, 1999; Okie, 2000, 2006). Ya que en la actualidad la inmensa mayoría de cultivares utilizados no son *P. salicina* sino híbridos interespecíficos complejos, en los que puede haber hasta 14 especies distintas en su ascendencia (Byrne, 1989; Okie, 2006, 2008), sería más adecuado denominar el cultivo como “ciruelo de tipo japonés”, como se ha considerado en algunos trabajos previos (Weinberger, 1975; Byrne, 1989; Boonprakob y Byrne, 2003), para resaltar el hecho de que no se trata de material vegetal de una sola especie como ocurre en otros frutales.

En este trabajo se ha deducido y/o determinado el genotipo *S* de incompatibilidad de algunos de los parentales de ciruelo japonés más utilizados en la mejora de la especie (Capítulo 4 y 5), lo que unido a la determinación del genotipo *S* de la práctica totalidad de los cultivares actuales ha permitido completar y corroborar la genealogía de la mejora del cultivo y especular sobre la correlación de determinados alelos *S* con algunas de las especies originarias, como es el caso del alelo *Sk*, que podría proceder de *P. simonii* (Capítulo 4)

La hibridación entre distintas especies que ha dado lugar a los cultivares actuales hace más complejo el estudio del comportamiento agronómico de los cultivares de ciruelo japonés que en otros frutales que comprenden una única especie. En los distintos cultivares evaluados en esta tesis se han observado diferencias importantes de comportamiento. El establecimiento del cuajado se produce desde la semana cinco hasta la décima después de antesis dependiendo de los cultivares, y el porcentaje de cuajado es muy variable entre los cultivares analizados (Capítulos 2, 6 y 7). En las observaciones al microscopio también se han observado importantes diferencias en el porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo entre cultivares autocompatibles y entre cruces compatibles (Capítulos 3 y 4). Finalmente, los factores involucrados en la degeneración prematura de los óvulos, tanto la

### *Discusión general*

emasculación de flores (Capítulo 7) como los posibles factores externos no identificados (Capítulo 6), también han tenido una influencia diferente dependiendo del cultivar, ya que en algunos cultivares han producido una falta severa de cuajado, mientras que otros cultivares en las mismas condiciones y el mismo estado fenológico no se han visto afectados. Este diferente comportamiento observado entre los distintos cultivares analizados en esta tesis puede estar relacionado con el origen de cada cultivar, que al tratarse de híbridos complejos pueden tener diferentes especies presentes en su pedigrí. El conocimiento de las especies presentes en la genealogía de los cultivares abriría las puertas a la posibilidad de correlacionar algunos caracteres morfológicos o de comportamiento agronómico de determinados cultivares con alguna de las especies de las que proceden.

## 9. CONCLUSIONES

1. La polinización es un factor condicionante del cuajado en las plantaciones y cultivares de ciruelo japonés analizados, ya que el cuajado de cada cultivar varía dependiendo del cultivar polinizador.
2. El polen de la mayoría de cultivares de ciruelo japonés es viable. Sin embargo, se han identificado dos nuevos cultivares androestériles: 'Black Jewell', que no presenta granos de polen en sus anteras, y 'Sybarite', que presenta muy pocos granos de polen y de muy baja viabilidad.
3. El ciruelo japonés produce una cantidad de flores considerablemente más alta que otros *Prunus*. Sin embargo, los porcentajes de cuajado son menores que en otras especies frutales del género, ya que se produce la caída de la mayoría de las flores aunque la polinización sea adecuada.
4. El patrón de caída de flores es muy variable entre cultivares; el establecimiento del cuajado se produce entre las cinco y siete primeras semanas después de anthesis en la mayoría cultivares, mientras que en otros cultivares la caída no se completa hasta dos o tres semanas más tarde.
5. Se han identificado ocho cultivares autocompatibles y veintidós autoincompatibles. La autoincompatibilidad es la principal causa de la falta de cuajado, siendo necesario intercalar cultivares polinizadores compatibles en las plantaciones.
6. La combinación de ensayos de polinización en campo, observación del crecimiento de los tubos polínicos al microscopio y determinación molecular del genotipo *S*, ha permitido seleccionar en cada plantación al menos un cultivar polinizador compatible y coincidente en floración para cada uno de los cultivares autoincompatibles analizados en condiciones de cultivo.
7. El alelo *Se* ligado a la autocompatibilidad en algunos cultivares de ciruelo japonés descritos previamente parece no estar ligado a este carácter en otros cultivares, ya que Black Diamond, Earliqueen, Black Star y Black Gold no son autocompatibles a pesar de tener este alelo en su genotipo.
8. La identificación de cultivares autocompatibles sin el alelo *Se*, como 'Friar', 'Nubiana' o 'Zanzi Sun', sugiere la existencia de otras fuentes de autocompatibilidad en ciruelo japonés, además de la ligada al alelo *Se*.
9. Se ha caracterizado el genotipo *S* de 115 cultivares de ciruelo japonés, 97 de ellos descritos por primera vez en este trabajo, lo que ha permitido la asignación de estos cultivares a sus correspondientes grupos de incompatibilidad. Esta información facilita el diseño de plantaciones y la identificación de problemas de incompatibilidad en plantaciones ya establecidas.

## *Conclusiones*

10. El análisis molecular de los genes del locus *S* en los cultivares analizados ha permitido además identificar cinco nuevos alelos de incompatibilidad (*So-Ss*) y 14 nuevos grupos de incompatibilidad.
11. Se ha desarrollado un método para la caracterización del locus *S* en ciruelo japonés mediante PCR y electroforesis capilar. Este instrumento es válido para agilizar y optimizar la determinación de la compatibilidad entre cultivares de este cultivo.
12. Los errores detectados en la denominación de algunos cultivares en las plantaciones estudiadas pueden explicar otras situaciones de falta de cuajado entre cultivares aparentemente compatibles.
13. La emasculación de flores causa la degeneración de los dos óvulos en la mayoría de flores y condiciona el cuajado en algunos cultivares. La polinización suplementaria de flores sin emasculación bajo malla permite obtener descendencias en cruces realizados en cultivares sensibles a la emasculación.
14. En algunos cultivares se han detectado problemas de cuajado no relacionados con la polinización, sino con la degeneración prematura de los óvulos. En el estudio de situaciones de bajo cuajado sin aparentes causas externas es conveniente analizar el estado de desarrollo de los óvulos además de examinar el proceso de polinización y la incompatibilidad polen-pistilo.
15. El diferente comportamiento observado entre cultivares puede estar relacionado con el diferente origen de cada uno, ya que todos los cultivares actuales son híbridos interespecíficos complejos con hasta 14 especies distintas en su ascendencia. La denominación del cultivo como “ciruelo de tipo japonés” en lugar de “ciruelo japonés” resaltaría que el material vegetal no es una sola especie y que pueden existir importantes diferencias en el comportamiento agronómico entre los distintos cultivares.

## 10. REFERENCIAS

- Ahmad R., Potter D., Southwick S. M. (2004) Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **79**, 164-169.
- Alcaraz M. L., Hormaza J. I., Rodrigo J. (2010) Ovary starch reserves and pistil development in avocado (*Persea americana*). *Physiologia Plantarum*, **140**, 395-404.
- Alonso J. M., Company R. S. I. (2005) Differential pollen tube growth in inbred self-compatible almond genotypes. *Euphytica*, **144**, 207-213.
- Arbeloa A., Daorden M. E., García E., Wünsch A., Hormaza J. I., Marín J. A. (2006) Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica*, **147**, 389-394.
- Arbeloa A., Herrero M. (1985) Valoración de la translocación al óvulo y de la esterilidad femenina en melocotonero. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*, **17**, 214-220.
- Arbeloa A., Herrero M. (1987) The significance of the obturator in the control of pollen-tube entry into the ovary in peach (*Prunus persica*). *Annals of Botany*, **60**, 681-685.
- Arbeloa A., Herrero M. (1991) Development of the ovular structures in peach *Prunus persica* (L) Batsch. *New Phytologist*, **118**, 527-533.
- Austin P. T., Hewett E. W., Noiton D., Plummer J. A. (1998) Self incompatibility and temperature affect pollen tube growth in 'Sundrop' apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **73**, 375-386.
- Badr S., Crane J. C. (1965) Growth of unpollinated ovaries of several deciduous fruit species. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **87**, 163-167.
- Bailey C. H., Hough L. F. (1975) Apricots. *En: Advances in Fruit Breeding*, pp. 367-383. Eds J. Janick & J. N. Moore. Lafayette, Indiana: Purdue University Press.
- Beppu K., Endo I., Kataoka I. (2010a) Self-compatibility in Japanese plum cultivar 'Honey Rosa'. *Acta Horticulturae*, **874**, 157-162.
- Beppu K., Komatsu N., Yamane H., Yaegaki H., Yamaguchi M., Tao R., Kataoka I. (2005) *Se*-haplotype confers self-compatibility in Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **80**, 760-764.
- Beppu K., Suehara T., Kataoka I. (2001) Embryo sac development and fruit set of 'Satonishiki' sweet cherry as affected by temperature, GA3 and paclobutrazol. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **70**, 157-162.
- Beppu K., Syogase K., Yamane H., Tao R., Kataoka I. (2010b) Inheritance of self-compatibility conferred by the *Se*-haplotype of Japanese plum and development of *Se RNase* gene-specific PCR primers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **85**, 215-218.
- Beppu K., Takemoto Y., Yamane H., Yaegaki H., Yamaguchi M., Kataoka I., Tao R. (2003) Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina*) cultivars by PCR and cross-pollination test. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **78**, 315-318.

## Referencias

- Beppu K., Yamane H., Yaegaki H., Yamaguchi M., Kataoka I., Tao R. (2002) Diversity of *SRNase* genes and *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **77**, 658-664.
- Blanca G., Díaz de la Guardia C. (1999) Rosaceae (Vol. VI). *En: Flora iberica*, pp. 444-466, Eds. Muñoz, F. y Navarro, C. Servicio de publicaciones CSIC, Madrid.
- Boonprakob U., Byrne D. H. (2003) Species composition of Japanese plum founding clones as revealed by RAPD markers. *Acta Horticulturae*, **622**, 473-476.
- Boonprakob U., Byrne D. H., Graham C. J., Okie W. R., Beckman T., Smith B. R. (2001) Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 451-461.
- Bradbury D. (1929) A comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus cerasus*. *American Journal of Botany*, **16**, 525-531.
- Brooks R. M., Olmo, H.P. (1997) Plum. *En: Register of Fruit and Nut Varieties*, pp. 584-627 Ed J. N. Cummins. 3rd ed. Alexandria, Va.: ASHS Press.
- Brown S. K., Iezzoni A. F., Fogle H. W. (1996) Cherries *En: Fruit Breeding*, pp. 213-225. Eds J. Janick & J. N. Moore. John Wiley & Sons. Inc.
- Burgos L., Berenguer T., Egea J. (1993) Self-compatibility and cross-compatibility among apricot cultivars. *HortScience*, **28**, 148-150.
- 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. *Journal of Horticultural Science*, **72**, 147-154.
- Byrne D. H. (1989) Inbreeding, coancestry, and founding clones of Japanese-Type plums of California and the southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **114**, 699-705.
- Calzoni G. L., Speranza A. (1996) Pear and plum pollination: Honey bees, bumble bees of both? *En: Second International Workshop on Pollination*, pp. 83-90, Eds J. Tromp, S. J. Wertheim, H. Kemp & J. Keulemans.
- Calzoni G. L., Speranza A. (1998) Insect controlled pollination in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Scientia Horticulturae*, **72**, 227-237.
- Cerović R., Mičić N. (1999) Functionality of embryo sacs as related to their viability and fertilization success in sour cherry. *Scientia Horticulturae*, **79**, 227-235.
- Cerović R., Ružić D. (1992) Pollen tube growth in sour cherry (*Prunus cerasus* L.) at different temperatures. *Journal of Horticultural Science*, **67**, 333-340.
- Cerović R., Ružić D., Mičić N. (2000) Viability of plum ovules at different temperatures. *Annals of Applied Biology*, **137**, 53-58.
- Crane M. B., Lawrence W. J. C. (1929) Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology and Horticultural Science*, **7**, 276-301.
- Currier H. B. (1957) Callose substance in plant cells. *American Journal of Botany*, **44**, 478-488.
- De Nettancourt D. (2001) *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*, Berlin: Springer.
- Delph L. F., Johannsoon M. H., Stephenson A. G. (1997) How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. *Ecology*, **78**, 1632-1639.



- Dicenta F., Ortega E., Canovas J. A., Egea J. (2002) Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, **121**, 163-167.
- Dorsey M. J. (1919) A study of sterility in the plum. *Genetics*, **4**, 417-489.
- Doyle J. J., Doyle J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**, 11-15.
- Eaton G. W., Jamont A. M. (1965) Embryo sac development in the apricot *Prunus armeniaca* L. cv. Constant. *American Society for Horticultural Science*, **86**, 95-101.
- Esau K. (1977) Anatomy of seed plants. John Wiley & Sons, Inc.
- FAOSTAT *FAO Database* [Online]. <http://faostat.fao.org> [Último acceso abril 2011].
- Faust M., Surányi D. (1999) Origin and dissemination of plums. *Horticultural Review*, **23**, 179-231.
- Free J. B. (1964) Comparison of the importance of insect + wind pollination of apple trees. *Nature*, **201**, 726-727.
- Giacinti M. A. (2004) Visión mundial sobre el consumo en fresco de ciruela. *Fruticultura Profesional*, **144**, 60-80.
- González J. (2002) *Estudio sobre la polinización del ciruelo japonés (Prunus salicina Lindl.) en las Vegas Altas del Guadiana (Badajoz)*. Tesis doctoral, Universidad de Extremadura.
- Goulão L., Monte-Corvo L., Oliveira C. M. (2001) Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified Fragment Length Polymorphisms and Inter-Simple Sequence Repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 72-77.
- Guerra M. E., Rodrigo J., López-Corrales M., Wünsch A. (2009) *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding*, **128**, 304-311.
- Guerra M. E., Wünsch A., López-Corrales M., Rodrigo J. (2010) Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **135**, 556-562.
- Halász J., Hegedus A., Szabo Z., Nyeki J., Pedryc A. (2007) DNA-based S-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *HortScience*, **42**, 46-50.
- Harrold T. J. (1935) Comparative study of the developing and aborting fruits of *Prunus persica*. *Botanical Gazette*, **96**, 505-520.
- Hartmann W., Neumüller M. (2009) Plum Breeding. *En: Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*, pp. 161-231, Eds S. M. Jain & P. M. Priyadarshan. Stuttgart, Germany: Springer Science.
- Hedhly A., Hormaza J. I., Herrero M. (2003) The effect of temperature on stigmatic receptivity in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell and Environment*, **26**, 1673-1680.
- Hedhly A., Hormaza J. I., Herrero M. (2004) Effect of temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany*, **91**, 558-564.
- Hedhly A., Hormaza J. I., Herrero M. (2005) The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. *Plant Biology*, **7**, 476-483.

## Referencias

- Hedhly A., Hormaza J. I., Herrero M. (2007) Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany and Food Quality-Angewandte Botanik*, **81**, 158-164.
- Hedhly A., Hormaza J. I., Herrero M. (2009) Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, **119**, 455-457.
- Herrero M., Salvador, J. (1980) La polinización del ciruelo Red Beaut. *ITEA*, **41**, 3-7.
- Herrero M. (1992) From pollination to fertilization in fruit trees. *Plant Growth Regulation*, **11**, 27-32.
- Herrero M. (2000) Changes in the ovary related to pollen tube guidance. *Annals of Botany*, **85**, 79-85.
- Herrero M. (2001) Ovary signals for directional pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, **14**, 3-7.
- Herrero M., Arbeloa A. (1989) Influence of the pistil on pollen-tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *American Journal of Botany*, **76**, 1441-1447.
- Herrero M., Dickinson H. G. (1979) Pollen-pistil incompatibility in *Petunia hybrida*: changes in the pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses. *Journal of Cell Science*, **36**, 1-18.
- Herrero M., Hormaza J. I. (1996) Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, **9**, 343-347.
- Heslop-Harrison J. (1987) Pollen germination and pollen tube growth. *International Review of Cytology*, **107**, 1-78
- Hjeltnes S. H., Stanys V. (1998) Effect of different hybridization techniques on fruit set in plums. *Acta Horticulturae*, **478**, 25-29.
- Hormaza J. I. (2002) Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 321-328.
- Hormaza J. I., Herrero M. (1996a) Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sexual Plant Reproduction*, **9**, 153-160.
- Hormaza J. I., Herrero M. (1996b) Male gametophytic selection as a plant breeding tool. *Scientia Horticulturae*, **65**, 321-333.
- Hormaza J. I., Pinney K., Polito V. S. (1996) Correlation in the tolerance to ozone between sporophytes and male gametophytes of several fruit and nut tree species (*Rosaceae*). *Sexual Plant Reproduction*, **9**, 44-48.
- Hurter N. (1972) A new japanese plum cultivar, Songold. *Agroplanta*, **4**, 37-38.
- Ikeda K., Igic B., Ushijima K., Yamane H., Hauck N. R., Nakano R., Sassa H., Iezzoni A. F., Kohn J. R., Tao R. (2004) Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sexual Plant Reproduction*, **16**, 235-243.
- Ioerger T. R., Gohlke J. R., Xu B., Kao T. (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in *Solanaceae*. *Sexual Plant Reproduction*, **4**, 81-87.
- Jefferies C. J., Belcher A. R. (1974) Fluorescent brightener used for pollen-tube identification in vivo. *Stain Technology*, **49**, 199-202.
- Jefferies C. J., Brain P., Stott K. G., Belcher A. R. (1982) Experimental systems and mathematical models for studying temperature effects on pollen-tube growth and fertilization in plum. *Plant Cell and Environment*, **5**, 231-236.
- Jia H.-J., He F.-J., Xiong C.-Z., Zhu F.-R., Okamoto G. (2008) Influences of Cross Pollination on Pollen Tube Growth and Fruit Set in Zuili Plums (*Prunus salicina*). *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**, 203-209.

- Johansen D. A. (1940) *Plant Microtechnique*, New York: McGraw-Hill.
- Julián C., Herrero M., Rodrigo J. (2010) Flower bud differentiation and development in fruiting and non-fruiting shoots in relation to fruit set in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Trees*, **24**, 833-841.
- Kao T., Tsukamoto T. (2004) The Molecular and Genetic Bases of S-RNase-Based Self-Incompatibility. *The Plant Cell*, **16**, S72-S83.
- Kester D. E., Gradziel T. M., Micke W. C. (1994) Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119**, 106-109.
- Kester D. E., Griggs W. H. (1959) Fruit setting in the almond: the pattern of flower and fruit drop. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **74**, 214-219.
- Keulemans J., Van Laer H. (1989) Effective pollination period of plums: The influence of temperature on pollen germination and pollen tube growth. *En: Manipulation of fruiting*, pp. 159-171, Ed C. J. Wright. London, UK: Butterworths.
- Kitashiba H., Zhang S. L., Wu J., Shirasawa K., Nishio T. (2008) S genotyping and S screening utilizing SFB gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Molecular Breeding*, **21**, 339-349.
- Lai Z., Ma W., Han B., Liang L., Zhang Y., Hong G., Xue Y. (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology*, **50**, 29-42.
- Layne R. E. C. (1983) Hybridization. *En: Methods in fruit breeding*, pp. 48-73, Eds J. N. Moore & J. Janick. Lafayette, Indiana: Purdue University Press.
- Lech W., Tylus K. (1983) Pollination, fertilization and fruit setting of some sour cherry varieties. *Acta Horticulturae*, **139**, 33-39.
- Lillecrapp A. M., Wallwork M. A., Sedgley M. (1999) Female and male sterility cause low fruit set in a clone of the 'Trevatt' variety of apricot (*Prunus armeniaca*). *Scientia Horticulturae*, **82**, 255-263.
- Linskens H. F., Esser K. (1957) Über eine spezifische Anfärbung der Pollen-Schläuche und die Zählkallosapropten nach Selbstung und Fremdung. *Naturwiss*, **44**, 16.
- MARM *Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino* [Online]. [www.marm.es](http://www.marm.es) [Último acceso abril 2011].
- Mayer S. S., Charlesworth D. (1991) Cryptic dioecy in flowering plants. *Tree*, **6**, 320-325.
- McCubbin A. G., Kao T. (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review Cell Development Biology*, **16**, 333-364.
- Mert C., Soylu A. (2007) Possible cause of low fruit set in the sweet cherry cultivar 0900 Ziraat. *Canadian Journal of Plant Science*, **87**, 593-594.
- Milatović D., Nikolić D. (2007) Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **82**, 170-174.
- Montagnon J. M. (2002) Prunier américain-japonais. Le choix des pollinisateurs. *L'Arboriculture Fruitière*, **561**, 51-54.
- Morenol Y. M., Miller-Azarenko A. N., Potts W. (1992) Genotype, temperature, and fall-applied ethephon affect plum flower bud development and ovule longevity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **117**, 14-21.

## Referencias

- Okie W. R. (2006) Introgression of *Prunus* species in plum. *New York Fruit Quarterly*, **14**, 29-37.
- Okie W. R., Hancock, J.F. (2008) Plums. *En: Temperate Fruit Crop Breeding*, pp. 337-356, Ed J. F. Hancock. Dunbar Rd, Byron, Georgia, USA.
- Okie W. R. (2008) *Prunus domestica* (European plum) and *Prunus salicina* (Japanese plum). *En: The Enciclopedia of Fruit and Nuts*, pp. 694-705, Eds J. Janick & R.E. Paull. Cambridge (U.K): Cambridge University press.
- Okie W. R., Ramming D. W. (1999) Plum Breeding Worldwide. *HortTechnology*, **9**, 162-176.
- Okie W. R., Weinberger J. H. (1996) Plums. *En: Fruit Breeding*, pp. 559-607, Eds J. Janick & J. N. Moore. New York: Wiley J. and Sons.
- Ontivero M., Radice S., Giordani E., Bellini E. (2006) Effects of different pollination treatments in genotypes of *Prunus salicina* Lindl. *International Journal of Horticultural Science*, **12**, 141-146.
- Ortega E., Dicenta F., Egea J. (2007) Rain effect on pollen-stigma adhesion and fertilization in almond. *Scientia Horticulturae*, **112**, 345-348.
- Pimienta E., Polito V. S. (1982) Ovule abortion in Nonpareil almond (*Prunus dulcis* Mill. Webb, D.A). *American Journal of Botany*, **69**, 913-920.
- Ramming D. W. (1994) Plum. Register of new fruit and nut varieties. Brooks and Olmo. List 36. *HortScience*, **29**, 955-956.
- Ramming D. W. (1995) Plum. Register of new fruit and nut varieties. Brooks and Olmo. List 37. *HortScience*, **30**, 1142-1144.
- Ramming D. W. (2004) Plum. Register of new fruit and nut varieties. Brooks and Olmo. List 42. *HortScience*, **39**, 1515.
- Ramming D. W., Cociu V. (1990) Genetics resources of temperate fruit and nut crops. Plums. *Acta Horticulturae*, **290**, 235-287.
- Ramming D. W., Tanner O. (1981) Blackamber plum. *HortScience*, **16**, 232-232.
- Ramming D. W., Tanner O. (1993) Fortune plum. *HortScience*, **28**, 679-679.
- Rodrigo J. (2000) Spring frosts in deciduous fruit trees - morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*, **85**, 155-173.
- Rodrigo J., Herrero M. (1996) Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Moniqui'. *Journal of Horticultural Science*, **71**, 801-805.
- Rodrigo J., Herrero M. (1998) Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sexual Plant Reproduction*, **11**, 86-93.
- Rodrigo J., Herrero M. (2002a) Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae*, **92**, 125-135.
- Rodrigo J., Herrero M. (2002b) The onset of fruiting in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik*, **76**, 13-19.
- Rodrigo J., Herrero M., Hormaza J. I. (2009) Pistil traits and flower fate in apricot (*Prunus armeniaca*). *Annals of Applied Biology*, **154**, 365-375.
- Sapir G., Stern R., Shafir S., Goldway M. (2008a) Full compatibility is superior to semi-compatibility for fruit set in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, **116**, 394-398.
- Sapir G., Stern R., Shafir S., Goldway M. (2008b) *S-RNase* based *S*-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. *Scientia Horticulturae*, **118**, 8-13.

- Sapir G., Stern R. A., Eisikowitch D., Goldway M. (2004) Cloning of four new Japanese plum S-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **79**, 223-227.
- Sapir G., Stern R. A., Goldway M., Shafir S. (2007) SFBs of Japanese plum (*Prunus salicina*): Cloning seven alleles and determining their linkage to the S-RNase gene. *HortScience*, **42**, 1509-1512.
- Sebolt A. M., Iezzoni A. F. (2009) Utilization of the S-locus as a Genetic Marker in Cherry to Differentiate Among Different Pollen Donors. *HortScience*, **44**, 1542-1546.
- Sedgley M., Griffin A. R. (1989) *Sexual reproduction of tree crops*, London: Academic Press.
- Sijacic P., Wang X., Skirpan A. L., Wang Y., Dowd P. E., McCubbin A. G., Huang S., Kao T. (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, **429**, 302-305.
- Socias i Company R., Alonso J. M. (2004) Cross-incompatibility of 'Ferragnès' and 'Ferralise' and pollination efficiency for self-compatibility transmission in almond. *Euphytica*, **135**, 333-338.
- Socias i Company R., Gómez-Aparisi J., Alonso J. M. (2005) Year and enclosure effects on fruit set in an autogamous almond. *Scientia Horticulturae*, **104**, 369-377.
- Socias i Company R., Kester D. E., Bradley M. V. (1976) Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **101**, 490-493.
- Sonneveld T., Robbins T. P., Tobutt K. R. (2006) Improved discrimination of self-incompatibility S-RNase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding*, **125**, 305-307.
- Sonneveld T., Tobutt K. R., Robbins T. P. (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, **107**, 1059-1070.
- Stephenson A. G. (1992) The regulation of maternal investment in plants. *En: Fruit and seed production*, pp. 151-171, Eds C. Marshall & J. Grace. Cambridge, Reino Unido: University Press.
- Sterling C. (1964) Comparative morphology of the carpel in the *Rosaceae*. 1. *Prunoideae: Prunus*. *American Journal of Botany*, **51**, 36-44.
- Stösser R., Anvari S. F. (1982) On the senescence of ovules in cherries. *Scientia Horticulturae*, **16**, 29-38.
- Strasburger E., Noll F., Schenck H., Schimper A. F. W. (1984) *Tratado de botánica*, pp.669, Ed: G.F. Verlag, Barcelona, España.
- Tamura M., Ushijima K., Sassa H., Hirano H., Tao R., Gradziel T. M., Dandekar A. M. (2000) Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, **101**, 344-349.
- Tao R., Iezzoni A. F. (2010) The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. *Scientia Horticulturae*, **124**, 423-433.
- 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 and Cell Physiology*, **38**, 304-311.
- Tao R., Yamane H., Sugiura A., Murayama H., Sassa H., Mori H. (1999) Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S*-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **124**, 224-233.
- Theiler-Hedtrich R. (1994) Inheritance of tree and fruit characters in progenies from crosses of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Euphytica*, **77**, 37-44.
- Thompson M. M., Liu L. J. (1973) Temperature, Fruit set and embryo sac development in 'Italian' prune. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **98**, 193-197.
- 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*, **15**, 771-781.
- 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 the S-RNases in Rosaceae. *Molecular and General Genetics*, **260**, 261-268.
- Vaughan S. P., Russell K., Sargent D. J., Tobutt K. R. (2005) Isolation of S-locus F-box alleles in *Prunus avium* and their application in a novel method to determine self-incompatibility genotype. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**, 856-866.
- Vidiella A. (2002) *Polinización y cuajado en ciruelo japonés (Prunus salicina Lindl.) en la provincia de Córdoba*. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba.
- Watari A., Hanada T., Yamane H., Esumi T., Tao R., Yaegaki H., Yamaguchi M., Beppu K., Kataoka I. (2007) A low transcriptional level of S-e-RNase in the S-e-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **132**, 396-406.
- Weinberger J. H. (1975) Plums. *En: Advances in Fruit Breeding*, pp. 336-346, Eds J. Janick & J. N. Moore. Lafayette, Indiana: Purdue University Press.
- Williams J. H., Friedman W. E., Arnold M. L. (1999) Developmental selection within the angiosperm style: Using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9201-9206.
- Williams R. R. (1970a) Techniques used in fruit set experiments. *En: Towards Regulated Cropping. A report of recent fruit-set experiments in British orchard.*, pp. 57-62, Ed R. R. Williams, Wilson, D. London: Grower books.
- Williams R. R. (1970b) Factors affecting pollination in fruit trees. *En: Physiology of Tree Crops*, pp. 193-207, Ed L. C. Luckwill, Cutting, C.V. London: Academic Press.
- Wünsch A., Hormaza J. (2004) *S*-allele identification by PCR analysis in sweet cherry cultivars. *Plant Breeding*, **123**, 327-331.
- Yaegaki H., Shimada T., Moriguchi H., Hayama T., Haji T., Yamaguchi M. (2001) Molecular characterization of *S*-RNase genes and *S*-genotypes in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sexual Plant Reproduction*, **13**, 251-257.
- Yamane H., Ikeda K., Hauck N. R., Iezzoni A. F., Tao R. T. (2003) Self-incompatibility (*S*) locus region of the mutated *S*-6-haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen *S* allele and a non-functional pistil *S* allele. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 2431-2437.

- Yamane H., Tao R. (2009) Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, **78**, 137-157.
- Yamane H., Tao R., Sigiura A. (1999) Identification and cDNA cloning for S-RNases in self incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lind. cv Sordum). *Plant Biotechnology*, **16**, 389-396.
- Yamane H., Tao R., Sugiura A., Hauck N. R., Iezzoni A. F. (2001) Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **126**, 661-667.
- Yoshida M. (1987) The origin of fruits. 2: Plums. *Fruit Japan*, **42**, 49-53.
- Zhang S. J., Huang S. X., Heng W., Wu H. Q., Wu J., Zhang S. L. (2008) Identification of S-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterisation of 13 novel S-alleles. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **83**, 635-640.
- Zhang S. L., Huang S. X., Kitashiba H., Nishio T. (2007) Identification of S-haplotype-specific F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sexual Plant Reproduction*, **20**, 1-8.





## **11. ANEXOS**



## Anexo 1. PUBLICACIONES RECOGIDAS EN 'SCIENCE CITATION INDEX'

Plant Breeding 128, 304–311 (2009)  
 © 2009 The Authors  
 Journal compilation © 2009 Blackwell Verlag, Berlin

doi:10.1111/j.1439-0523.2008.01552.x

### *S*-RNase genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum

M. E. GUERRA<sup>1,2</sup>, J. RODRIGO<sup>2</sup>, M. LÓPEZ-CORRALES<sup>1</sup> and A. WUNSCH<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hortofruticultura, Centro de Investigación 'Finca La Orden-Valdesequera', Apdo. 22, 06187 Guadajira, Badajoz; <sup>2</sup>Unidad de Fruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; <sup>3</sup>Corresponding author, E-mail: awunsch@aragon.es

With 3 figures and 4 tables

Received April 18, 2008/Accepted June 26, 2008

Communicated by S. Korban

#### Abstract

Most Japanese plum-type cultivars are self-incompatible and cross pollination is necessary to ensure fruit set. In this study, the *S*-RNase genotype and the incompatibility group of 68 Japanese plum-type cultivars were determined by PCR amplification of the *S*-RNase gene. The *S*-RNase genotype of 50 cultivars is first reported here and five new Japanese plum *S*-RNase alleles (*S<sub>o</sub>*, *S<sub>p</sub>*, *S<sub>q</sub>*, *S<sub>r</sub>*, *S<sub>s</sub>*) were identified. The results obtained, together with information compiled from previous studies, allowed describing 12 new incompatibility groups (VIII–XIX). The self-incompatibility of several cultivars and the cross-compatibility among different incompatibility groups were verified by self- and cross-pollination experiments followed by observation of pollen tube growth. Five cultivars behaved as self-compatible, but two of them do not have the *Se* allele, which has been correlated with self-compatibility. Thus, additional sources of self-compatibility different from *Se* appear to be involved in Japanese plum self-compatibility.

**Key words:** *Prunus salicina* — *S*-RNase alleles — gametophytic self-incompatibility — cross-pollination — pollen tube growth — pedigree

Fresh market cultivated plum comprises two main species, the European plum (*Prunus domestica* L.) and the Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). World plum production reached over 9 million mt in 2005, with a 30% increment in production in the last 10 years (FAOSTAT 2008). Japanese plum originated in China and was later cultivated in Japan (Yoshida 1987). In the late 19th century it was introduced in the USA, where it was hybridized with other diploid plums for breeding purposes (Faust and Surányi 1999). Thus, today the term 'Japanese plum' comprises a heterogeneous group of diploid plums that derive from the interspecific hybridization of *P. salicina* with other native American diploid plums such as *P. americana*, *P. hortulana* or *P. munsoniana*, the Chinese plum *P. simonii* and *P. cerasifera* (Okie and Weinberger 1996).

Most Japanese plum-type cultivars are self-incompatible (Okie and Weinberger 1996), and therefore it is necessary to interplant pollinator trees to ensure fruit set in commercial orchards. Self-incompatibility is a wide spread mechanism in flowering plants, which prevents self-fertilization (De Nettancourt 2001). Rosaceous species including other *Prunus* spp. such as almond (*P. dulcis*) and sweet cherry (*P. avium*) exhibit gametophytic self-incompatibility (GSI; De Nettancourt 2001). The gametophytic self-incompatibility reaction is genetically determined by a polymorphic locus (*S*), encoding two linked genes that determine the pistil and pollen phenotypes

(Kao and Tsukamoto 2004). In this mechanism, when the *S* allele of the haploid pollen grain is different from the two *S* alleles of the style tissue, the pollen tube can grow through the style and fertilize the ovule. On the other hand, when the *S* allele expressed in the pollen is the same as either of the two *S* alleles expressed in the style, pollen tube growth is arrested in the style. In the rosaceous self-incompatible species, the pistil *S* determinant is a ribonuclease, *S*-RNase (Tao et al. 1997, 1999), which inhibits pollen tube growth by degrading pollen tube RNA (McCubbin and Kao 2000). On the other hand, the pollen *S*-determinant is an F-box protein, SFB (Ushijima et al. 2003, Yamane et al. 2003) that may be involved in a protein degradation pathway (Ushijima et al. 2003).

Fruit set as a result of successful pollination is a requirement for a high yield in Japanese plum production. As a consequence, cultivar assignment to its corresponding self-incompatibility group is essential for orchard planning. Reliable methods to determine the compatibility among different cultivars include fruit set recording after controlled pollinations in orchard conditions and the microscopic observation of pollen tube growth in flowers of controlled crosses. The cloning and characterization of the *S*-locus factors in rosaceous fruit tree species has allowed the development of PCR methods, which accelerate *S*-allele identification and do not require flower tissues. The characterization of the *S*-RNases in Japanese plum (Yamane et al. 1999) allowed the development of PCR *S*-RNase allele typing methods (Beppu et al. 2002, 2003), similar to those developed in other self-incompatible *Prunus* spp. such as almond (Tamura et al. 2000), sweet cherry (Tao et al. 1999) or Japanese apricot (Yaegaki et al. 2001). In Japanese plum, 'Sordum' was the first cultivar for which the *S* locus was characterized (Yamane et al. 1999). Subsequently, the *S*-RNases alleles of 36 Japanese plum cultivars were determined by PCR and 14 different *S*-RNase alleles (*S<sub>a</sub>*–*S<sub>n</sub>*) were identified (Beppu et al. 2002, 2003). Five *S*-RNase (*S<sub>7</sub>*, *S<sub>7</sub>*–*S<sub>8</sub>*) were cloned by Sapir et al. (2004). Recently, the *S*-RNase alleles of another 10 cultivars were determined, and correspondence between the two *S*-allele nomenclatures, numerical and alphabetical, was established (Halász et al. 2007). These studies have resulted in the genotyping of 49 different cultivars that have been allocated in seven different incompatibility groups (Halász et al. 2007).

Although most Japanese plum cultivars are self-incompatible, self-compatibility has been observed in genotypes such as

'Black Diamond' (Crane and Lawrence 1929), 'Friar', 'Laetitia' and 'Santa Rosa' (Ramming and Cociu 1990). This trait has been correlated with the presence of the *Se* allele in the cultivars 'Rio' (*SaSe*) and 'Santa Rosa' (*ScSe*) (Beppu et al. 2005). Self-compatibility in the *Se*-haplotype has been suggested to be caused by the accumulation of insufficient levels of *Se*-*RNase* due to very low transcription in the pistil (Watari et al. 2007).

Due to the large number of Japanese plum-type cultivars grown worldwide and the increasing interest in the production of this species, the objective of this study was to determine the incompatibility relationships of main Japanese plum-type cultivars worldwide. For this purpose, *S*-*RNase* genotyping of 68 cultivars was carried out by PCR analysis. Additionally, in order to confirm PCR results and to investigate the self-incompatibility of the cultivars analysed and the compatibility among the different groups, pollen tube growth in flowers of self- and cross-pollinations were observed under the microscope.

## Materials and Methods

**Plant materials:** Leaf and flower samples from 68 Japanese plum-type cultivars (Table 1), obtained from different collections and orchards of Japan and Extremadura, Aragón and Cataluña (Spain), were used for *S*-*RNase* genotyping and pollination experiments.

***S*-*RNase* allele PCR analysis:** Genomic DNA from the 68 cultivars was isolated from young leaves following the protocol described by Hormaza (2002). The genomic DNA obtained was quantified and diluted to 10 ng/μl prior to PCR amplification. PCR reactions were carried out in a volume of 20 μl, in 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer, 40 ng of genomic DNA and 0.45 U of *Taq* DNA polymerase, using the following temperature profile: an initial step of 3 min at 94°C, 35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C and 3 min at 72°C, and a final step of 7 min at 72°C. The primer pair combinations used for PCR amplification were PruT2-PCER, PruC2-PCER, and PruC2-C5rev (Tao et al. 1999, Yamane et al. 2001, Wunsch and Hormaza 2004). The amplified fragments were separated using agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized with UV light. Fragment size estimation was done using a size standard (1 kb DNA Ladder; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Quantity One 1-Analysis 4.6.2 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) software.

**Pollination experiments:** To establish self-incompatibility and to confirm cross-compatibility among different cultivars, 23 self-pollinations (Table 2) and 35 cross-pollinations (Table 3) were carried out in the laboratory and pollen tube growth was observed under the microscope. For this purpose, pollen was obtained from flowers at the balloon stage by removing and drying the anthers at room temperature during 24 h. The pollen was then sieved through a fine mesh (0.26 mm) and stored at -20°C until further use. Flowers from each cultivar were collected at balloon stage 1 day before anthesis, emasculated to avoid self-pollination, and maintained on wet florist foam at room temperature. For each crossing, 20–25 flowers were hand pollinated 24 h after emasculation. Seventy-two hours later, the pistils were fixed in FAA [70% ethanol: acetic acid: formaldehyde (18 : 1 : 1, v/v/v) (Johansen 1940)]. Each crossing was repeated over 2 years. For microscope preparations, the fixed pistils were washed three times for 1 h with distilled water and left overnight in 5% sodium sulphite at 4°C. On the following day, the pistils were autoclaved at 1 kg/cm<sup>2</sup> during 8 min in sodium sulphite to soften the tissues (Jefferies and Belcher 1974), and stained with 0.1% (v/v) aniline blue in 0.1 N K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> to stain callose (Linskens and Esser 1957). Pollen tube growth along the style was observed under an Olympus BH2 microscope with UV epifluorescence using a BP 355/425 exciter filter and a LP 470 barrier filter.

## Results

### *S*-*RNase* allele PCR analysis

Polymerase chain reaction analysis using primers from conserved regions of *S*-*RNase* of sweet cherry and Japanese plum were used to identify the *S*-*RNase* alleles of 68 Japanese plum-type cultivars (Table 1). Cultivars of known *S*-*RNase* genotype were initially used to confirm the size of *S*-*RNase* alleles previously identified (*Sa*-*Sf*, *Sh*, *Sk*) using primer pairs PruT2-PCER and PruC2-PCER (Table 4). This information was used to determine the *S*-*RNase* alleles of the rest of the cultivars analysed (Fig. 1). The *Sg* allele was subsequently detected in 'Golden Japan' as the fragment amplified in this genotype agreed with that described by Beppu et al. (2002) for this *S*-*RNase* allele (Table 4). The amplification of fragments of different size from those recorded in the defined *S*-*RNase* alleles was considered as the amplification of new *S*-*RNase* alleles. Thus, five new *S*-*RNase* alleles (*So*, *Sp*, *Sq*, *Sr*, *Ss*; Table 4), were identified in the cultivars 'Ambra' (*So*), 'October Red' (*Sp*), 'Mitard' (*Sq*) and 'Joana Red' (*SrSs*). These alleles were named in consecutive order according to the alphabetical nomenclature (Yamane et al. 1999, Beppu et al. 2002, 2003). Thus, 14 different *S*-*RNase* alleles were identified in the 68 cultivars analysed (Table 4).

Three *S*-*RNase* alleles (*Sg*, *Sr*, *Ss*) were only amplified with primers PruC2-PCER and not with PruT2-PCER, thus primer pair PruC2-C5rev was also used to amplify an additional fragment that allowed confirmation of the amplification of the *S*-*RNase* (Table 4). The use of PruC2-C5rev allowed amplification of all of the *S*-*RNase* alleles detected, with the exception of *Sg* and *Sp*. Thus, the *Sg* allele was only amplified with PruC2-PCER. The sizes of the 14 *S*-*RNase* alleles detected with the three primer pairs used are reported in Table 4.

The *S*-*RNase* genotypes reported in this study include 50 cultivars of *S*-*RNase* genotype previously unknown and 18 cultivars whose *S*-*RNase* alleles had been reported previously (Table 1). Additionally, only one *S*-*RNase* allele of 'Black Diamond' was previously known, *S<sub>5</sub>* (Sapir et al. 2004), later renamed as *Se* (Halász et al. 2007). In this study, the complete *S*-*RNase* genotype of 'Black Diamond' is reported to be *SeSh*. The information reported herein, compiled with the *S*-*RNase* genotype of another 49 cultivars previously determined (Table 1), has allowed constituting 12 new incompatibility groups (VIII–XIX). These groups have been numbered in consecutive order following those reported previously (Halász et al. 2007). While 59 of the cultivars analysed have been assigned to 15 different incompatibility groups, another six cultivars were allocated to group 0 since their *S*-*RNase* genotype is not present in any other cultivar analysed (Table 1). The remaining three cultivars have not been classified since only one *S*-*RNase* allele was detected (Table 1).

To confirm the *S*-*RNase* genotyping, the information obtained in this and in previous studies was incorporated in a genealogical tree that included the parental genotypes of Japanese plum breeding and some relevant cultivars (Fig. 2). The *S*-*RNase* genotypes included in this figure were confirmed by their *S*-*RNase* allele inheritance, like that of 'Freedom', 'Fortune' or 'Black Beaut'.

### Pollination experiments

Observation of pollen tube growth through the style was carried out in pistils from self-pollinations of 23 cultivars in order to

I. g.	<i>S</i> -RNase genotype	Cultivars analysed in this study	Cultivars analysed in previous studies	Reference		
I	<i>SaSb</i>	606 <sup>1</sup>	Burmosa	Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2002) Yamane et al. (1999) Halász et al. (2007)		
		Red Beaut Sordum Black Amber Black Beaut <sup>1</sup> Delbartazur <sup>1</sup>				
II	<i>SbSc</i>	Fortune <sup>1</sup> Golden Plum <sup>1</sup> Golden Plumza <sup>1</sup> Green Sun <sup>2</sup> Laroda October Sun	Flavor Granade	Halász et al. (2007)		
			Oishinakata Super Giant Taiyo	Beppu et al. (2002) Halász et al. (2007) Beppu et al. (2002) Halász et al. (2007) Beppu et al. (2002) Halász et al. (2007)		
			TC Sun Zanzi Sun <sup>1</sup> Frontier Golden Globe <sup>1</sup>	Beppu et al. (2003)		
			Gran Colle Verna Delicious	Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003)		
			Eldorado <sup>1</sup> Freedom <sup>1</sup> Friar <sup>2</sup>	Heibaoshi	Zhang et al. (2007)	
		III	<i>SbSf</i>	Hirome Red <sup>1</sup> Larry Ann <sup>3</sup> Nubiana <sup>3</sup> Owen T <sup>1</sup> Queen Ann Songria 10 <sup>1</sup>	Qiuji	Zhang et al. (2007)
					Yonemomo Bakemonosumomo Kasahara Hatankyou Abundance	Beppu et al. (2002) Beppu et al. (2002) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003)
					Kelsey <sup>2</sup> Kelsey Paulista Younai	Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Zhang et al. (2007)
		IV	<i>SbSh</i>	Angelenex <sup>1</sup> Angeleno	Green Sun <sup>2</sup> Nvgelei	Sapir et al. (2004) Halász et al. (2007) Halász et al. (2007) Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2003)
				Queen Rosa Ruby Crunch <sup>1</sup> Black Diamond Black Gold <sup>4</sup> Black Late <sup>1</sup> Diamex <sup>1</sup> Early Queen <sup>1</sup> Extremagold <sup>1</sup>		Sapir et al. (2004)
V	<i>SbSi</i>	John W <sup>1</sup> Laetitia <sup>1</sup> Showtime <sup>1</sup> Souvenir <sup>1</sup> Golden Japan <sup>1</sup>	Huangjiazuanshi	Zhang et al. (2007)		
					IX <sup>3</sup>	<i>SfSg</i>
VI	<i>SfSh</i>	31-SG-6 <sup>2</sup>	Jinshali White Plum	Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2002)		
		Howard Sun <sup>1</sup>	Friar <sup>2</sup>	Halász et al. (2007)		
VII	<i>ScSh</i>	Songold <sup>1</sup> Autum Giant <sup>1</sup>	Redgold	Zhang et al. (2007)		
		Black Splendor <sup>1</sup>	Beauty	Beppu et al. (2002)		
VIII <sup>3</sup>	<i>SeSh</i>					
IX <sup>3</sup>	<i>SfSg</i>					
X <sup>3</sup>	<i>ShSk</i>					
XI <sup>3</sup>	<i>ScSe</i>					

Table 1: Incompatibility group and *S*-RNase genotype of 68 Japanese plum-type cultivars analysed in this study and 49 cultivars analysed in previous studies

Table 1: *Continued*

I.g.	<i>S</i> - <i>RNase</i> genotype	Cultivars analysed in this study	Cultivars analysed in previous studies	Reference
		Casselman <sup>1</sup>	Late Santa Rosa Meiguili	Beppu et al. (2002) Zhang et al. (2007) Sapir et al. (2004)
		Royal Zee Royal Garner <sup>3</sup> Santa Rosa		Beppu et al. (2002) Halász et al. (2007) Halász et al. (2007) Halász et al. (2007)
XII <sup>3</sup>	<i>SbSe</i>	Pioneer <sup>1</sup> Sapphire <sup>1</sup> Black Star <sup>1</sup> Primetime <sup>2</sup> 87-91 <sup>2</sup>	Sweet Autumn Flavor King	
XIII <sup>3</sup>	<i>SeSf</i>			
XIV <sup>3</sup>	<i>SaSc</i>			
XV <sup>3</sup>	<i>SgSh</i>	Crison Glo <sup>1</sup> 30-AN-7 <sup>1</sup>		
XVI <sup>3</sup>	<i>SfSk</i>	Kelsey <sup>2</sup>	Bonnie	Beppu et al. (2003)
XVII <sup>3</sup>	<i>SbSo</i>	Ambra <sup>1</sup> Olinda <sup>1</sup>	Weikeshum Wickson	Zhang et al. (2007) Sapir et al. (2004)
XVIII <sup>3</sup>	<i>SaSf</i>		Ozarkpremier Terada	Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2002)
XIX <sup>3</sup>	<i>SbSd</i>		Formosa Furongli Gaixiandali Huangpili Rio	Beppu et al. (2003) Zhang et al. (2007) Zhang et al. (2007) Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2002)
0	<i>S7Sf</i> <i>SaSe</i> <i>SaSh</i> <i>SaSm</i> <i>SaSn</i> <i>SbSg</i> <i>SbSk</i> <i>SbSl</i> <i>ScSd</i>	Songria 15 <sup>1</sup>	Botan Superior Honey Rosa Harypickstone Lantz	Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2002) Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2003)
	<i>ScSf</i> <i>ScSo</i> <i>SeS10</i> <i>SeSk</i> <i>SfSj</i> <i>SgSk</i> <i>SgSl</i> <i>ShSg</i> <i>SrSs</i> <i>Sp</i> <i>Sh</i> <i>Sh</i> <i>Sf</i>	Oishiwasesumomo  Red Heart <sup>1</sup>  Simka  October Red <sup>1</sup> Joana Red <sup>1</sup> Mitard <sup>1</sup> 26-BD-10 <sup>1</sup> Gaia <sup>1</sup>	Summer Queen  Xiangjiabli  Tecumseh Starkgold Combination	Beppu et al. (2003) Zhang et al. (2007) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Beppu et al. (2003) Halász et al. (2007)
			Shiro	Halász et al. (2007)

<sup>1</sup>*S*-*RNase* genotypes first reported in this study.

<sup>2</sup>Cultivars in which *S*-*RNase* genotype reported herein differs from that reported in other studies.

<sup>3</sup>Incompatibility groups first reported in this study.

establish their self-incompatibility or self-compatibility (Table 2). Additionally, to confirm the results obtained by PCR, pollen tube growth was observed in cross-pollinations among cultivars of eight different incompatibility groups (Table 3) and cultivars of the same incompatibility group. Six self-pollinated cultivars, Zanzi Sun, Nubiana, Laetitia, Casselman, Santa Rosa, and Simka (Table 2), displayed variable percentages of pistils with pollen tubes growing along the pistil (Fig. 3a) and reaching the base of the style. In the remaining 17 self-pollinated cultivars, pollen tube growth was arrested in the style (Fig. 3b) and no pollen tubes reached the base of the style (Table 2).

Cross-pollination experiments confirmed the results obtained by PCR in most of the crossings performed. As expected, cross-pollinations between cultivars from different

incompatibility groups, such as 'Fortune' (IG II) × 'Golden Japan' (IG IX); 'Friar' (IG IV) × 'Fortune' (IG II) or 'Angeleno' (IG VII) × 'Santa Rosa' (IG XI), displayed pistils with pollen tubes at the base of the style (Table 3). On the other hand, pollen tubes did not reach the base of the style in the pistils analysed from crosses between cultivars from the same incompatibility group (data not shown), such as 'Fortune' × 'Black Amber' (IG II), 'Black Amber' × 'Green Sun' (IG II) or 'Songold' × 'Golden Plum' (IG X).

## Discussion

In this study, we report the *S*-*RNase* genotype of 68 Japanese plum-type cultivars, 50 of which are reported for the first time.

Table 2: Self-pollinated Japanese plum-type cultivars and percentage of pistils with pollen tubes reaching the base of the style

I.g.	S-RNase genotype	Cultivar	Pistils (%)
II	<i>SbSc</i>	Black Amber	0
	<i>SbSc</i>	Fortune	0
	<i>SbSc</i>	Laroda	0
	<i>SbSc</i>	Zanzi Sun	17
	<i>SbSc</i>	Golden Plum	0
III	<i>SbSc</i>	Green Sun	0
	<i>SbSf</i>	Frontier	0
IV	<i>SbSf</i>	Golden Globe	0
	<i>SbSh</i>	Eldorado	0
	<i>SbSh</i>	Friar	0
VII	<i>SbSh</i>	Nubiana	36
	<i>SbSh</i>	Queen Ann	0
	<i>SbSh</i>	Freedom	0
	<i>ScSh</i>	Angeleno	0
VIII	<i>ScSh</i>	Queen Rosa	0
	<i>SeSh</i>	Laetitia	55
IX	<i>SfSg</i>	Golden Japan	0
	<i>ShSk</i>	Songold	0
X	<i>ShSk</i>	Howard Sun	0
	<i>ScSe</i>	Casselman	44
XI	<i>ScSe</i>	Santa Rosa	36
	<i>SbSo</i>	Ambra	0
XVII	<i>SbSk</i>	Simka	56

This information has allowed assigning each cultivar to its corresponding incompatibility group and constituting 12 new incompatibility groups (VIII–XIX). The analysis of additional cultivars has also allowed identifying 5 new self-incompatibil-

ity *S-RNase* alleles (*So*, *Sp*, *Sg*, *Sr*, *Ss*). Furthermore, the compatibility relationships between and within incompatibility groups, as well as the self-incompatibility phenotype of some cultivars, have been studied by pollen tube growth observation in pollination experiments.

Results herein confirm the *S-RNase* genotype of 15 cultivars reported previously. However, the *S-RNase* genotype of 'Kelsey' (*SfSk*), 'Green Sun' (*SbSc*) and 'Friar' (*SbSh*) differed from results reported in previous studies. The cultivar 'Kelsey' was previously identified as *SfSh* (Beppu et al. 2002), and 'Green Sun' and 'Friar' as *ScSh* and *ShSk*, respectively (Halász et al. 2007). Both putative *S-RNase* genotypes of Kelsey, *SfSh* (Beppu et al. 2003) and *SfSk* (reported herein) fit with *S*-allele inheritance (Fig. 2). On the other hand, according to *S-RNase* allele inheritance the most likely *S-RNase* genotype of 'Friar' is *SbSh* (Fig. 2). Further research and the comparison of the *S*-genotypes of these cultivars with those of additional samples of the same cultivars would be needed to clarify their *S*-genotype.

Although two alleles were identified in the majority of cultivars by PCR analysis, a unique allele was identified in few cultivars. This may be due to inefficient PCR amplification of the *S-RNase* allele not detected, caused by mismatching of PCR primers, or preferential amplification of the detected allele. Alternatively, the amplification of overlapping fragments of PCR, corresponding to alleles of similar size, could make the identification of the two alleles difficult. Pollination experiments as well as molecular work focused on characterising the *S*-locus of these genotypes should be carried out in order to identify additional *S-RNase* alleles not detected in this study.

Table 3: Cross-pollinations among cultivars of different incompatibility groups and percentage of pistils with pollen tubes at the base of the style in each crossing

I.g.	♂	♀							
		II	III	IV	VII	VIII	IX	X	XI
		Fortune	Frontier	Friar	Angeleno	Black Diamond	Golden Japan	Songold	Santa Rosa
II	Fortune			42	83	50	83	17	42
III	Frontier					50	86		
IV	Friar	83					92	28	
VII	Angeleno					17	31	40	67
VIII	Black Diamond	58		100				67	100
IX	Golden Japan	92		75	50	44		33	43
X	Songold	41		17	4	33	17		42
XI	Santa Rosa		18		50	56		75	

S-RNase allele	Cultivars	PruT2-PCER	PruC2-PCER	PruC2-C5rev
<i>Sa</i>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	936	466	692
<i>Sb</i>	Sordum ( <i>SaSb</i> )	1993	1580	1870
<i>Sc</i>	Oshiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	1606	1166	1485
<i>Sd</i>	Oshiwasesumomo ( <i>ScSd</i> )	1780	1290	1600
<i>Se</i>	Santa Rosa ( <i>ScSe</i> )	1865	1441	1680
<i>Sf</i>	Frontier ( <i>SbSf</i> )	1542	1098	1410
<i>Sg</i>	Golden Japan ( <i>SfSg</i> )	n.a	1243	n.a
<i>Sh</i>	Queen Ann ( <i>SbSh</i> )	965	508	750
<i>Sk</i>	Simka ( <i>ScSk</i> )	820	393	630
<i>So</i> <sup>1</sup>	Ambra ( <i>SbSo</i> )	1277	1304	1550
<i>Sp</i> <sup>1</sup>	October Red ( <i>ShSp</i> )	1040	600	n.a
<i>Sq</i> <sup>1</sup>	Mitard ( <i>Sg</i> )	1520	1270	1540
<i>Sr</i> <sup>1</sup>	Joana Red ( <i>SrSs</i> )	n.a	760	1000
<i>Ss</i> <sup>1</sup>	Joana Red ( <i>SrSs</i> )	n.a	580	820

<sup>1</sup>*S-RNase* alleles first identified in this study. n.a, no amplification.

Table 4: PCR fragment sizes, in basepairs, of *S-RNase* alleles amplified with different *S-RNase* primer pair combinations

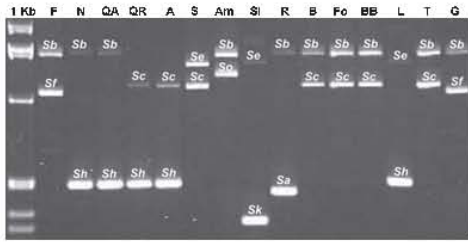


Fig. 1: PCR amplification using primer set PruC2-PCR of Japanese plum-type cultivars: Frontier (F), Nubiana (N), Queen Ann (QA), Queen Rosa (QR), Angeleno (A), Santa Rosa (S), Ambra (Am), Simka (Si), Red Beaut (R), Black Amber (B), Fortune (Fo), Black Beut (BB), Laetitia (L), TC Sun (T), Golden Globe (G). 1 Kb: Size standard

Six self-pollinated cultivars showed self-compatibility. Four of these, 'Laetitia' (*SeSh*), 'Casselman' (*ScSe*), 'Santa Rosa' (*ScSe*) and 'Simka' (*SeSk*) present the *Se* allele, and confirm previous results that correlate *Se* with self-compatibility (Beppu et al. 2005). Likewise, the results agree with previous reports of self-compatibility in 'Santa Rosa' and 'Laetitia' by Crane and Lawrence (1929) and Ramming and Cočiu (1990). However, the remaining two cultivars that behave as self-

compatible, 'Nubiana' (*SbSh*) and 'Zanzi Sun' (*SbSc*), do not have the *Se* allele. Further fruit set experiments are being carried out to confirm these results and to ascertain the origin of self-compatibility in these genotypes, but the results suggest that additional sources of self-compatibility, other than *Se* allele, may be operating in Japanese plum-type cultivars. Curiously, both self-compatible genotypes are *Sb*. This allele could be correlated to self-compatibility only in some genotypes, since descendants of 'Nubiana' that are also *Sb*, like 'Friar' or 'Black Amber', are not self-compatible. Alternatively, these cultivars could present a self-compatible S-RNase allele different from *Sb* but of similar size.

Pollination experiments carried out have shown that Japanese plums exhibit variable percentages of pistils with pollen tubes at the base of the style and that the number of pollen tubes reaching the base of the style is in general lower than in other *Prunus* species (Homaza and Herrero 1996, Rodrigo and Herrero 1996, Burgos et al. 1997, Dicenta et al. 2002; Alonso and Socías 2005, Hedhly et al. 2005, 2007, Milatović and Nikolić 2007). Thus, compatibility determination by means of pollen tube observations has not been as clear as in other *Prunus* spp., probably due to the fact that most of the cultivars studied are complex hybrids resulted from the hybridization of more than two diploid plum species, in which case the compatibility reaction in the style may not be as clear as in other intra-specific crosses. Further experiments of self- and cross-pollination and subsequent fruit set recording

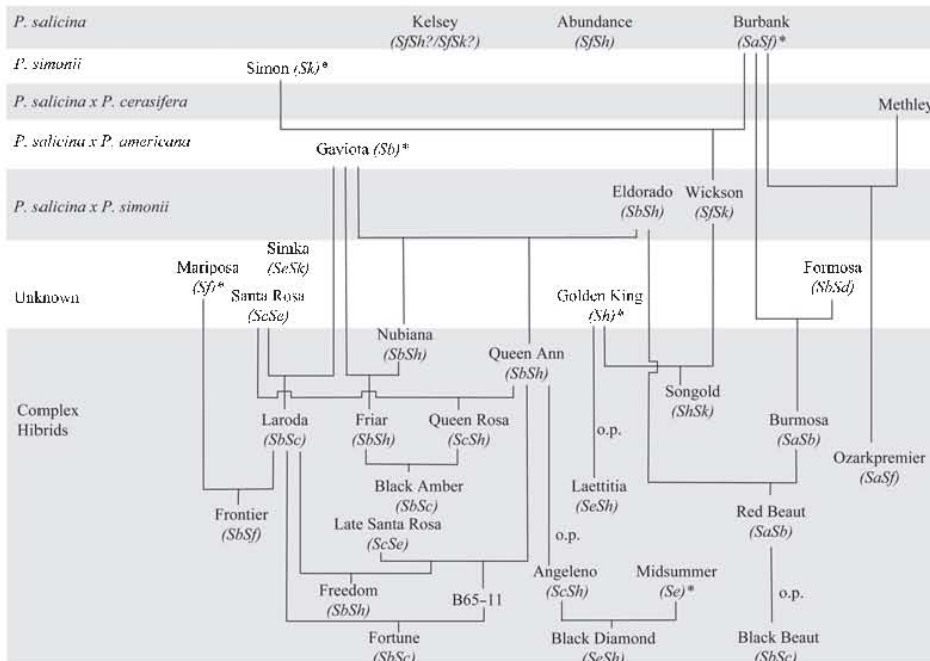


Fig. 2: Pedigree (Byrne 1989, Okie and Weinberger 1996; Brooks and Olmo 1997, Boonprakob et al. 2001, Goulão et al. 2001, Ahmad et al. 2004), and S- genotype (Beppu et al. 2002, 2003, Şapir et al. 2004, Halász et al. 2007, Zhang et al. 2007; this study) of some main Japanese plum-type cultivars. o.p., open pollinated. \*Expected S-RNase alleles



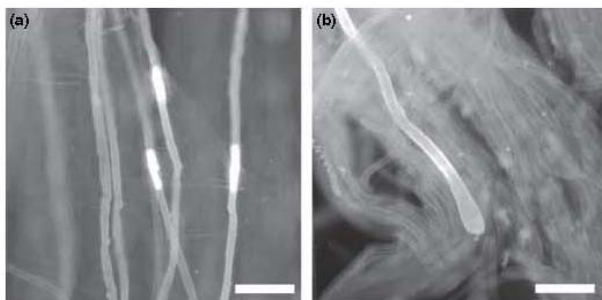


Fig. 3. Pollen tube growth along the style in a compatible cross (a). Pollen tube arrested in the style in an incompatible cross (b). Bars = 50  $\mu$ m

should complement this information in order to clarify the self-incompatibility reaction in some genotypes.

The analysis of the *S-RNase* alleles and the pedigree has allowed the prediction of the *S-RNase* genotypes of cultivars such as 'Burbank', 'Simon', 'Gaviota' and 'Mariposa', the identification of possible genetic relations, and speculation about the origin of some *S-RNase* alleles. Thus, the *S-RNase* alleles of 'Burbank' would be expected to be *SaSf* according to 'Burbank' and 'Wickson' *S-RNase* allele inheritance. Similarly, 'Simon' would be expected to be *Sk*, and 'Gaviota' would be *Sb*. Since allele *Sk* is only confirmed in 'Simon' lineage, a genetic relationship could be expected between 'Simon' and 'Simka' that is also *Sk*. In the same way, a relationship could also exist between 'Simka' and 'Santa Rosa'. The pedigree of neither of these two cultivars is known (Byrne 1989), but both cultivars are self-compatible and both contribute the *Se* allele to Japanese plum breeding. The presence of alleles *Sb*, *Sf* and *Sa* in the original *P. salicina* genotypes and in all their descendants suggests that these alleles derive from pure *P. salicina* genotypes, while the presence of the *Sk* allele only in 'Simon' descendants may indicate that this allele originates from *P. simonii*. The *S-RNase* genotyping of additional cultivars will help clarifying and complementing the pedigree information available.

*S-RNase* allele identification has allowed allocation of a number of the main Japanese plum-type cultivars to their corresponding incompatibility groups, and the pollination experiments followed by pollen tube growth observation have allowed the determination of self-compatible or self-incompatible behaviour in some cultivars. This information will be valuable for the selection of parental genotypes in breeding programs and for the appropriate selection of cultivars in commercial orchards.

#### Acknowledgements

We gratefully acknowledge J. L. Espada [Centro de Técnicas Agrarias (CTA-DGA)], Manuel Alonso [Cooperativa de Regantes de Extremadura (CREX)], Ignasi Iglesias [Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-Generalitat de Catalunya)], J. R. Rituerto (RITUCON Consultoria Agronómica), Grupo ALM, Viveros Provedo and Dr R. Tao (Kyoto University, Japan) for providing plant material used in this study. Financial support for this research was provided by Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)-FEDER (Project grant: AGL2006-13529-CO2-00/AGR), Gobierno de Aragón (Grupo Consolidado A-43) and Agroseguro S.A. M.E. Guerra was financed by an INIA-MEC doctoral fellowship.

#### References

- Ahmad, R., D. Potter, and S. M. Southwick, 2004: Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **79**, 164–169.
- Alonso, J. M., and R. Socas, 2005: Differential pollen tube growth in inbred self-compatible almond genotypes. *Euphytica* **144**, 207–213.
- Beppu, K., H. Yamane, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, I. Kataoka, and R. Tao, 2002: Diversity of *S-RNase* genes and *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **77**, 658–664.
- Beppu, K., Y. Takemoto, H. Yamane, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, I. Kataoka, and R. Tao, 2003: Determination of *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **78**, 315–318.
- Beppu, K., N. Komatsu, H. Yamane, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, R. Tao, and I. Kataoka, 2005: *S*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **80**, 760–764.
- Boonprakob, U., D. H. Byrne, C. J. Graham, W. R. Okie, T. Bedkman, and B. R. Smith, 2001: Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **126**, 451–461.
- Brooks, R. M., and H. P. Olmo, 1997: Register of Fruit and Nut Varieties. 3rd edn. ASHS Press, Alexandria, Va.
- Burgos, L., J. Egea, R. Guerrero, R. Viñ, P. Montealeone, and J. M. Audergon, 1997: The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *J. Hortic. Sci.* **72**, 147–154.
- Byrne, D. H., 1989: Inbreeding, coancestry, and founding clones of Japanese-type plums of California and the southeastern United States. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **114**, 699–705.
- Crane, M. B., and J. C. Lawrence, 1929: Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *J. Pomol. Hortic. Sci.* **7**, 276–301.
- De Nettancourt, D., 2001: Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants, 2nd edn. Springer, Berlin.
- Dicenta, F., E. Ortega, J. A. Cánovas, and J. Egea, 2002: Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding* **121**, 163–167.
- FAOSTAT, 2008: FAO Database. Available at: <http://faostat.fao.org> (accessed on February 2008).
- Faust, M., and D. Surányi, 1999: Origin and dissemination of plums. *Hortic. Rev.* **23**, 179–231.
- Goulão, L., L. Monte-Corvo, and C. M. Oliveira, 2001: Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: amplified fragment length polymorphisms and Inter-Simple Sequence Repeats. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **126**, 72–77.
- Halász, J., A. Hegedus, Z. Szabó, J. Nyéki, and A. Pedrycz, 2007: DNA-based *S*-Genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *Hortscience* **42**, 46–50.

- Hedhly, A., J. I. Hormaza, and M. Herrero, 2005: The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in Peach. *Plant Biol.* **7**, 476–483.
- Hedhly, A., J. I. Hormaza, and M. Herrero, 2007: Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *J. Appl. Bot.* **81**, 158–164.
- Hormaza, J. I., 2002: Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 321–328.
- Hormaza, J. I., and M. Herrero, 1996: Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sex. Plant Reprod.* **9**, 156–160.
- Jefferies, C. J., and A. R. Belcher, 1974: A fluorescent brightener used for pollen tube identification *in vivo*. *Stain Technol.* **49**, 199–202.
- Johansen, D. A., 1940: *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Kao, T., and T. Tsukamoto, 2004: The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **15**, 72–83.
- Linskens, H. F., and K. Esser, 1957: Über eine spezifische Anfärbung der Pollen-Schläuche und die Zugl Kallosapopten nach Selbstung und Fremdung. *Naturwiss.* **44**, 16.
- McCubbin, A. G., and T. H. Kao, 2000: Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**, 333–364.
- Milatović, D., and D. Nikolić, 2007: Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **82**, 170–174.
- Okie, W. R., and J. H. Weinberger, 1996: Plums. In: J. Janick, and J. N. Moore (eds), *Fruit Breeding. I: Tree and Tropical Fruits*, 559–607. J. Wiley and Sons, New York.
- Ramming, D. W., and V. Cociu, 1990: Genetics resources of temperate fruit and nut crops. *Plums. Acta Hort.* **290**, 235–287.
- Rodrigo, J., and M. Herrero, 1996: Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Monique'. *J. Hortic. Sci.* **71**, 801–805.
- Sapir, G., R. A. Stern, D. Eiskowitch, and M. Goldway, 2004: Cloning of four new Japanese plum S-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **79**, 223–227.
- Tamura, M., K. Ushijima, H. Sassa, H. Hirano, R. Tao, T. M. Gradziel, and A. M. Dandekar, 2000: Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 344–349.
- Tao, R., H. Yamane, H. Sassa, H. Mori, T. M. Gradziel, A. M. Dandekar, and A. Sugiura, 1997: Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.* **38**, 304–311.
- Tao, R., H. Yamane, A. Sugiura, H. Maruyama, H. Sassa, and H. Mori, 1999: Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **124**, 224–233.
- Ushijima, K., H. Sassa, A. M. Dandekar, T. M. Gradziel, R. Tao, and H. Hirano, 2003: Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* **15**, 771–781.
- Watari, A., T. Hanada, H. Yamane, T. Esumi, R. Tao, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, K. Beppu, and I. Kataoka, 2007: A low transcriptional level of S<sup>+</sup>-RNase in the S<sup>+</sup>-haplotype confers self-incompatibility in Japanese plum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **132**, 396–406.
- Wünsch, A., and J. I. Hormaza, 2004: S-allele identification by PCR analysis in sweet cherry cultivars. *Plant Breeding* **123**, 327–331.
- Yaegaki, H., T. Shimada, T. Moriguchi, H. Hayama, T. Haji, and M. Yamaguchi, 2001: Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sex. Plant Reprod.* **13**, 251–257.
- Yamane, H., R. Tao, and A. Sugiura, 1999: Identification and cDNA cloning for S-RNases in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). *Plant Biotechnol.* **16**, 389–396.
- Yamane, H., R. Tao, A. Sugiura, N. R. Hauck, and A. F. Iezzoni, 2001: Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **126**, 661–667.
- Yamane, H., K. Ikeda, K. Ushijima, H. Sassa, and R. Tao, 2003: A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. *Plant Cell Physiol.* **44**, 764–769.
- Yoshida, M., 1987: The origin of fruits. 2: Plums. *Fruit Japan* **42**, 49–53.
- Zhang, S. L., S. X. Huang, H. Kitashiba, and T. Nishio, 2007: Identification of S-haplotype F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex. Plant Reprod.* **20**, 1–8.

## Flower Emasculation as the Cause for Lack of Fruit Set in Japanese Plum Crosses

**María Engracia Guerra**

*Department of Hortofruticulture, Centro de Investigación Agraria 'Finca La Orden-Valdesequera,' A-V, km 374, 06187 Guadajira, Badajoz, Spain*

**Ana Wünsch**

*Department of Fruticulture, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana 930, 50059 Saragossa, Spain*

**Margarita López-Corrales**

*Department of Hortofruticulture, Centro de Investigación Agraria 'Finca La Orden-Valdesequera,' A-V, km 374, 06187 Guadajira, Badajoz, Spain*

**Javier Rodrigo<sup>1</sup>**

*Department of Fruticulture, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana 930, 50059 Saragossa, Spain*

**ADDITIONAL INDEX WORDS.** *Prunus salicina*, ovule degeneration, pollen tube growth, cross-incompatibility, pollination, *S-RNase* alleles

**ABSTRACT.** Flower emasculation is widely used in breeding programs for hybridization of fruit trees. In Japanese plum (*Prunus salicina*), some genetic crosses made by emasculation have resulted in very low or lack of fruit set, but the causes leading to this situation are not clear. In this work, the influence of flower emasculation on fruit set was evaluated in four Japanese plum-type cultivars by comparing cross-pollinations performed with and without emasculation. Fruit set and fruit drop in the crosses were characterized until harvest. To ascertain which factors in the reproductive process could be related to the lack of fruit set, compatibility was determined for each cross by the observation of pollen tube growth under the microscope and by polymerase chain reaction. Likewise, the stage of ovule development was observed under the microscope in emasculated and non-emasculated flowers. An analysis of the different pollination treatments and the study of the compatibility relationships helped to dismiss factors that intervene in the reproductive process and to identify flower emasculation as the cause of premature degeneration of ovules and its implication in determining subsequent fruit set.

Flower emasculation is widely used in breeding programs for hybridization of deciduous fruit trees (Layne, 1983). This technique is also used in cytological and genetic studies (Okie and Hancock, 2008) and in different field experiments in which controlled pollination is required to avoid the interference of undesired pollen (Hedhly et al., 2009).

For fruit breeding purposes, flower emasculation is used to carry out controlled pollinations when the female parent is self-fruitful to avoid self-pollination and ensure crossing between cultivars. Emasculation consists of removing, with fingernails or other tools, the petals, sepals, and stamens before anther dehiscence (Layne, 1983). The technique makes flowers unattractive to pollinator insects (Free, 1964) and hand-pollinations can be done without the interference of undesired self- or cross-pollen. The late balloon stage 1 d before anthesis is considered most favorable for emasculation in stone fruit breeding (Bailey

and Hough, 1975). Other pollination techniques can be used to control crosses in *Prunus*. For example, trees used as male and female can be enclosed in portable greenhouses with honeybee (*Apis mellifera*) hives in them or single female trees can be enclosed with bouquets or potted trees with honeybee hives. However, a common problem for these techniques is synchronizing blooms of pollenizers with the female tree (Okie and Weinberger, 1996). Thus, flower emasculation is particularly used in *Prunus* breeding, including Japanese plum (Okie and Hancock, 2008; Okie and Weinberger, 1996; Weinberger, 1975).

Although many Japanese plum cultivars are either mutations or chance seedlings, others are the result of planned hybridizations (Boonprakob et al., 2001; Byrne, 1989; Okie and Ramming, 1999; Okie and Weinberger, 1996; Weinberger, 1975). However, many crosses made by emasculation have resulted in very low fruit set or not fruit set at all (Okie and Hancock, 2008; Okie and Weinberger, 1996). A negative effect of flower emasculation on fruit set has been reported in other *Prunus* species, including almond [*P. dulcis* (Kester et al., 1994)], sour cherry [*P. cerasus* (Brown et al., 1996)], and sweet cherry [*P. avium* (Hedhly et al., 2009)] and points to flower emasculation as one of the underlying causes.

Factors that have been suggested as the causes for low or lack of fruit set in emasculated flowers of *Prunus* species include adverse weather conditions during and after the blooming period (Okie and Weinberger, 1996), inadequate developmental stage

Received for publication 8 Sept. 2010. Accepted for publication 4 Oct. 2010. Financial support for this research was provided by the Spanish Ministry of Science and Innovation-European Regional Development Fund, European Union (project grants: AGL2009-12621-C02-02; INIA RTA2009-00144), Government of Aragón (Grupo de Excelencia A-43), and Agroseguro S.A. María Engracia Guerra was financed by an Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) doctoral fellowship. We gratefully acknowledge Agroseguro S.A. for providing plant material used in this study and A. Hedhly for statistical advice.

<sup>1</sup>Corresponding author. E-mail: jrodrigo@aragon.es.

of the bud when the emasculating is carried out (Hjeltnes and Stansys, 1998), loss of the nutritive and protective functions of the perianth (Badr and Crane, 1965), possible damage to the pistil (Okie and Hancock, 2008; Okie and Weinberger, 1996), or acceleration of ovule degeneration (Hedhly et al., 2009). However, the causes leading to the lack of fruit set specifically in some Japanese plum crosses are not clear.

In this work, the influence of flower emasculating on fruit set was evaluated in four Japanese plum cultivars by comparing cross-pollinations performed with and without emasculating in orchard conditions. To ascertain which factors in the reproductive process could be related to the lack of fruit set, microscopic observations of pollen tubes and ovules were related with the behavior of flowers and developing fruit in the tree. The results revealed a high incidence of ovule degeneration caused by emasculating.

### Materials and Methods

**PLANT MATERIALS.** Six Japanese plum-type cultivars, Ambra, Angeleno, Black Diamond, Early Queen, Fortune, and Golden Globe, located in different commercial orchards were used for pollination experiments to evaluate the effect of flower emasculating on final fruit set. Several pollination treatments were performed in which 'Black Diamond', 'Early Queen', 'Fortune', and 'Golden Globe' were used as maternal parents and 'Ambra', 'Angeleno', 'Black Diamond', and 'Fortune' were used as pollen donors (Table 1).

**FIELD EXPERIMENTS.** Cross-pollinations in both emasculated and non-emasculated flowers were performed with each female parent. Additionally, a population of open-pollinated flowers in the orchard was used as a control for each cultivar (Table 1). Pollen used in each pollination treatment was previously obtained from flowers collected at the balloon stage (Fig. 1A) by removing anthers and placing them on paper at room temperature for 24 h until anther dehiscence. Pollen was then sieved through a 0.26-mm mesh and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until required.

Cross-pollinations of non-emasculated flowers were performed by supplementary pollination (Williams, 1970a) in caged trees. To avoid the arrival of pollinating insects, two trees of each female parent were enclosed in a 0.8-mm mesh cage before bloom. In these caged trees, 120 to 1560 flowers per cultivar were cross-pollinated (Table 1) using a thin paintbrush every other day until all flowers had opened (Rodrigo and Herrero, 2002a). For cross-pollinations of emasculated flowers (Layne, 1983), old flowers and young buds were removed from a set of branches, leaving only flowers at the balloon stage (Fig. 1A). Between 200 and 560 of these flowers per cultivar and crossing

Table 1. Pollination treatment, number of treated flowers, number of fruit, percentage of fruit set, and percentage of pistils with both ovules degenerated in different Japanese plum-type cultivars and crosses performed in orchard conditions.

Cultivar/pollination treatment	Flowers (no.)	Fruit (no.)	Fruit Set (%)	Pistils with both ovules degenerated (%)
<b>Black Diamond</b>				
Open pollination	1622	20	1.2	0
Self-pollination	1763	0	0	0
× Fortune (S) <sup>a</sup>	517	17	3.3 <sup>y</sup>	10 <sup>z</sup>
× Fortune (E) <sup>a</sup>	531	0	0 <sup>x</sup>	78 <sup>z</sup>
<b>Fortune</b>				
Open pollination	1514	30	2.0	0
Self-pollination	1016	0	0	0
× Ambra (S)	396	13	3.3 <sup>y</sup>	0 <sup>z</sup>
× Ambra (E)	559	1	0.2 <sup>x</sup>	80 <sup>z</sup>
× Black Diamond (S)	121	5	4.1 <sup>y</sup>	0 <sup>z</sup>
× Black Diamond (E)	535	1	0.2 <sup>x</sup>	100 <sup>z</sup>
<b>Golden Globe</b>				
Open pollination	1611	58	3.6	0
Self-pollination	1222	4	0.3	0
× Angeleno (S)	1559	79	5.1 <sup>x</sup>	0 <sup>z</sup>
× Angeleno (E)	206	5	2.4 <sup>x</sup>	44 <sup>z</sup>
× Fortune (S)	1539	4	0.3 <sup>x</sup>	0 <sup>z</sup>
× Fortune (E)	211	0	0 <sup>x</sup>	22 <sup>z</sup>
<b>Early Queen</b>				
Open pollination	1831	54	2.9	0
Self-pollination	1562	2	0.1	0
× Ambra (S)	577	18	3.1 <sup>y</sup>	9 <sup>z</sup>
× Ambra (E)	450	48	10.7 <sup>y</sup>	70 <sup>z</sup>
× Angeleno (S)	540	28	5.2 <sup>y</sup>	0 <sup>z</sup>
× Angeleno (E)	527	65	12.3 <sup>y</sup>	30 <sup>z</sup>

<sup>a</sup>E = emasculating; S = supplementary pollination.

<sup>y</sup>Significant at  $P < 0.05$ ; association between flower emasculating and the proportion of fruit set as well as the proportion of flowers with both ovules degenerated analyzed for the same cross by two-way interaction contingency tables followed by  $\chi^2$  goodness-of-fit test with Yates' correction for continuity or the Fisher's exact test as appropriate.

<sup>z</sup>Not significant at  $P < 0.05$ .

were emasculated and cross-pollinated the next day using a brush and previously collected pollen.

Because cross-pollinations in non-emasculated flowers were performed by supplementary pollination without removing the anthers of the flowers, self-compatibility of female cultivars was evaluated to determine the influence of self-pollen on the subsequent fruit set. For this purpose, self-pollinations were carried out in non-emasculated flowers by supplementary pollination of 1000 to 1760 flowers per cultivar (Table 1) in the same caged trees following the same protocol.

Additionally, a group of 1500 to 1830 non-emasculated flowers on each female cultivar was left for open-pollination in trees not covered and used as controls (Table 1). Weekly counts of flowers and developing fruit from anthesis to harvest (Williams, 1970b) were carried out to characterize fruit drop pattern and ascertain final fruit set in each pollination treatment.

**POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY.** To establish the self-incompatibility of each female parent and the cross-compatibility with the parental cultivars, the same crosses carried out in the field were also performed in the laboratory and analyzed by the observation of pollen tube growth under the microscope. Flowers from each female cultivar were collected at the balloon stage, emasculated, and maintained on wet florist foam at room temperature (Rodrigo and Herrero, 1996). Thirty flowers per

treatment were hand-pollinated 24 h after emasculation. Seventy-two h later, when pollen tubes were expected to arrive at the base of the style (Guerra et al., 2009), the pistils were fixed in alcohol:acetic acid (3:1) (Williams et al., 1999). For microscope preparation, the fixed pistils were washed three times for 1 h with distilled water and left overnight in 5% sodium sulphite at 4 °C. On the next day, the pistils were autoclaved for 8 min at 1 kg·cm<sup>-2</sup> in 5% sodium sulphite to soften the tissues (Jefferies and Belcher, 1974). The pistils were stained with 0.1% (v/v) aniline blue in 0.1 N K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> to stain callose (Linskens and Esser, 1957). Pollen tube growth was observed under a light microscope with ultraviolet epifluorescence using a BP 355/425 exciter filter and a LP 470 barrier filter (BH2; Olympus Optical, Tokyo, Japan). The number of pollen tubes at the base of the style was recorded in at least 10 pistils per cultivar and treatment.

The *S*-genotype of each cultivar used in the pollination experiments (Table 1) was also confirmed by *S*-*RNase* allele typing. Genomic DNA from each cultivar was isolated from young leaves following the protocol described by Hormaza (2002) and *S*-allele typing was carried out by *S*-*RNase* polymerase chain reaction (PCR) amplification using primers pairs Pru C2-PCER and Pru T2-PCER (Tao et al., 1999; Yamane et al., 2001) according to the protocol described by Guerra et al. (2009).

**OVULE VIABILITY.** From each cultivar and treatment made in the field, 40 to 50 flowers from selected branches were collected 4 d after pollination and fixed in alcohol:acetic acid (3:1) for examination of ovule development under the microscope. Ovules were scored for ovule viability through the presence of callose deposits in the chalaza of degenerating ovules (Arbeloa and Herrero, 1985; Hedhly et al., 2009; Morenol et al., 1992; Pimienta and Polito, 1982; Rodrigo and Herrero, 1998; Stosser and Anvari, 1982) in at least 10 pistils per cultivar and pollination treatment. Ovule development was monitored with the same staining procedure used to observe pollen tube growth. Preparations were observed under a light microscope equipped with ultraviolet epifluorescence with a BP340-390 exciter filter and a LP 425 barrier filter (DM2500; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

**STATISTICAL ANALYSES.** Statistical analyses were performed with SPSS statistical software (Version 15.0; SPSS, Chicago, IL). Two-way interaction contingency tables followed by a chi-square goodness-of-fit test

with Yates' correction for continuity or the Fisher's exact test as appropriate were used to test for association between flower emasculation and the proportion of fruit set as well as the proportion of flowers with both ovules degenerated for each cross. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

## Results

**FRUIT SET AND FRUIT DROP.** The percentage of fruit set in open-pollinated flowers ranged from 1.2% to 3.6%. Self-pollinations of the four cultivars used as female parents did not set fruit (Table 1); thus, they appeared to be self-incompatible. Although in 'Fortune' (Fig. 2A) and 'Golden Globe' (Fig. 2B) drop of all self-pollinated flowers was complete 6 weeks after



Fig. 1. Japanese plum flowers (A) at the balloon stage and (B) after emasculation.

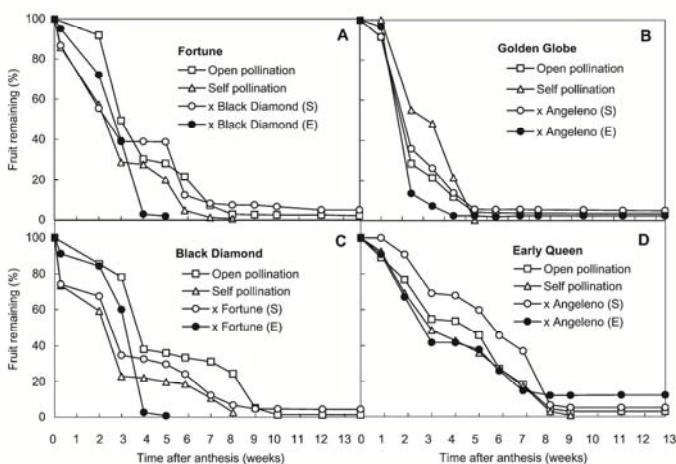


Fig. 2. Fruit drop in Japanese plum-type cultivars as affected by different pollination treatments: open-, self-, and cross-pollination in emasculated and non-emasculated flowers. Percentage of fruit from the original number of flowers remaining in the tree during the 13 weeks after anthesis in (A) 'Fortune', (B) 'Golden Globe', (C) 'Black Diamond', and (D) 'Early Queen'.

anthesis, in 'Black Diamond' (Fig. 2C) and 'Early Queen' (Fig. 2D), a group of self-pollinated flowers remained on the trees until 8 to 9 weeks after anthesis.

Fruit set in cross-pollinated flowers performed by supplementary pollination of non-emasculated flowers ranged from 0.1% to 5.1% and was higher than the fruit set obtained in open-pollinated flowers for the same female cultivar, except in the case of 'Golden Globe' × 'Fortune' in which no fruit were obtained (Table 1). Cross-pollinated flowers stopped dropping at the time when drop of self-pollinated flowers was completed in each cultivar. However, emasculated flowers dropped between 1 and 2 weeks earlier than flowers crossed by supplemental pollination (Fig. 2).

Flower emasculation had a variable effect on fruit set when compared with non-emasculated flowers in the different compatible crosses (Table 1). Thus, chi-square analysis revealed significant association between emasculation and lack of fruit set in 'Black Diamond' × 'Fortune' ( $N = 1048$ , Yates'  $\chi^2 = 15.748$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ), 'Fortune' × 'Ambra' ( $N = 955$ , Yates'  $\chi^2 = 13.386$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ), and 'Fortune' × 'Black Diamond' ( $N = 656$ , Yates'  $\chi^2 = 12.875$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). However, no significant association between flower emasculation and fruit set reduction was reported in 'Golden Globe' × 'Angeleno' ( $N = 1765$ , Yates'  $\chi^2 = 2.246$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.134$ ) and 'Golden Globe' × 'Fortune' ( $N = 1750$ , Yates'  $\chi^2 < 0.001$ ,  $df = 1$ ,  $P = 1$ ). The cross 'Golden Globe' × 'Fortune' did not produce fruit either in emasculated or in non-emasculated flowers indicating the possible cross-incompatibility of the crossing. On the other hand, fruit set in emasculated flowers was significantly higher than fruit set in flowers crossed by supplemental pollination in the crosses in which 'Early Queen' was the female parent: 'Early Queen' × 'Ambra' ( $N = 1027$ , Yates'  $\chi^2 = 22.708$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) and 'Early Queen' × 'Angeleno' ( $N = 1067$ , Yates'  $\chi^2 = 16.245$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ).

**SELF- AND CROSS-INCOMPATIBILITY.** In the four self-pollinated cultivars, Black Diamond, Early Queen, Fortune, and Golden Globe, pollen tube growth was arrested in the style (Fig. 3A) and no pollen tubes reached the base of the style (Table 2).

Cross-pollinations displayed variable percentages of pistils with pollen tubes growing through the pistil (Fig. 3B) and reaching the base of the style (Table 2). Although some pistils of 'Black Diamond' × 'Fortune', 'Fortune' × 'Black Diamond', 'Early Queen' × 'Ambra', 'Early Queen' × 'Angeleno', and 'Golden Globe' × 'Angeleno' crosses had pollen tubes at the base of the style, pollen tubes did not reach the base of the style in the pistils analyzed from the cross 'Golden

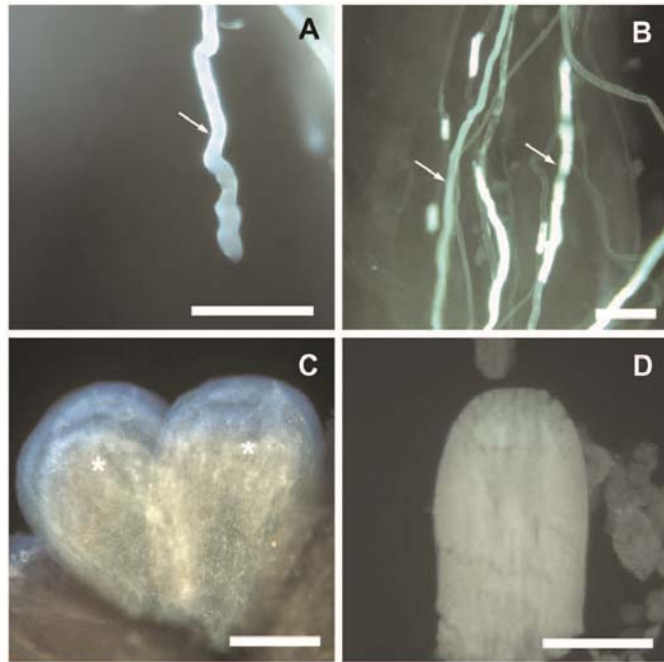


Fig. 3. Pollen tube growth along the style and ovule development in pistils of Japanese plum flowers (A) pollen tube (arrow) arrested in the style in an incompatible cross (bar = 50  $\mu\text{m}$ ), (B) pollen tubes (arrows) advancing to the base of the style in a compatible cross (bar = 50  $\mu\text{m}$ ), (C) both ovules degenerated with callose accumulation at the chalazal end (\*) (bar = 100  $\mu\text{m}$ ), and (D) well-developed ovule (bar = 100  $\mu\text{m}$ ).

Table 2. Pollination treatment, percentage of pistils with pollen tubes at the base of the style, and *S*-genotype of different Japanese plum-type cultivars and crosses performed in laboratory conditions.

Cultivar/cross	Pistils with pollen tubes at the base of the style (%)	<i>S</i> genotype
Black Diamond		<i>SeSh</i>
Self-pollination	0	
× Fortune	59	<i>SeSh</i> × <i>SbSc</i>
Fortune		<i>SbSc</i>
Self-pollination	0	
× Ambra		<i>SbSc</i> × <i>SbSo</i>
× Black Diamond	50	<i>SbSc</i> × <i>SeSh</i>
Golden Globe		<i>SbSc</i>
Self-pollination	0	
× Angeleno	91	<i>SbSc</i> × <i>ScSh</i>
× Fortune	0	<i>SbSc</i> × <i>SbSc</i>
Early Queen		<i>SeSh</i>
Self-pollination	0	
× Ambra	36	<i>SeSh</i> × <i>SbSo</i>
× Angeleno	27	<i>SeSh</i> × <i>ScSh</i>

Globe' × 'Fortune'. Thus, the four self-pollinated cultivars appeared self-incompatible, and all the crosses except 'Golden Globe' × 'Fortune' were cross-compatible.

S-RNase typing by PCR was used to identify the *S*-genotype of the different cultivars used in the pollination experiments (Table 2; Fig. 4). All the cultivars analyzed had the expected *S*-RNase alleles (Guerra et al., 2009; Sapir et al., 2004) except 'Golden Globe' that had *S*-alleles different from those previously reported (Guerra et al., 2009). The PCR analysis confirmed the cross-compatibility of all the crosses except for 'Golden Globe' × 'Fortune' that was cross-incompatible because both cultivars had the same *S*-genotype.

**OVULE VIABILITY.** To determine the causes resulting in the different behavior of emasculated and non-emasculated flowers of the same crosses, ovule development was analyzed under the microscope in pistils from all the pollination treatments performed in the field. Both ovules were degenerated (Fig. 3C) in a variable percentage (22% to 100%) of the pistils analyzed from crosses with emasculated flowers (Table 2). However, most supplemental pollinated flowers from the same crosses (90% to 100%) and all the self- and open-pollinated flowers had at least one well-developed ovule (Fig. 3D; Table 1). Thus, the number of flowers with both ovules degenerated were significantly higher in emasculated than in non-emasculated flowers in 'Black Diamond' × 'Fortune' ( $N = 19$ , Yates'  $\chi^2 = 6.363$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.005$ ), 'Fortune' × 'Ambra' ( $N = 18$ , Yates'  $\chi^2 = 8.508$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.001$ ), 'Fortune' × 'Black Diamond' ( $N = 15$ , Yates'  $\chi^2 = 11.251$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ), and 'Early Queen' × 'Ambra' ( $N = 21$ , Yates'  $\chi^2 = 4.033$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.024$ ). However, no significant association between flower emasculating and ovule degeneration were reported in 'Golden Globe' × 'Angeleno' ( $N = 17$ , Yates'  $\chi^2 = 2.508$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.082$ ), 'Golden Globe' × 'Fortune' ( $N = 19$ , Yates'  $\chi^2 = 0.685$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.211$ ), and 'Early Queen' × 'Angeleno' ( $N = 21$ , Yates'  $\chi^2 = 1.859$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.104$ ).

### Discussion

Flower emasculating caused premature ovule degeneration and affected fruit set in the Japanese plum-type cultivars analyzed. The analysis of the different pollination treatments performed in orchard conditions and the study of the compatibility relationships among cultivars allowed dismissal of other factors that could intervene in the reproductive process. Premature degeneration of both ovules was identified as the cause of female

sterility and their implications for subsequent fruit set in emasculated flowers.

The percentage of fruit set in open-pollinated flowers was representative of fruit set of Japanese plum-type cultivars in orchard conditions (M.E. Guerra, A. Wunsch, M. López-Correales, and J. Rodrigo, unpublished data). Supplementary pollination increased fruit set in most crosses, and only self-pollinations and one cross-incompatible crossing did not produce fruit. On the other hand, flower emasculating had a variable effect on fruit set in the crosses depending on the female parental cultivar. Emasculating of flowers has been reported previously as the cause of an increase in the percentage of fruit set in different *Prunus* species such as peach (*P. persica*) (Arbeloa and Herrero, 1991), sweet cherry (Theiler-Hedtrich, 1994), apricot (*P. armeniaca*) (Rodrigo and Herrero, 2002b; Rodrigo et al., 2009), almond (Socias i Company et al., 2005), or interspecific crosses (Arbeloa et al., 2006). This increase in fruit set in emasculated flowers can be explained by the fact that flowers with anomalies or underdeveloped pistils are usually taken away when older and younger flowers are removed from the branches selected in the experiments. Likewise, hand-pollination of the emasculated flowers can improve the chances of flowers to set fruit, because this ensures the arriving of compatible pollen to the stigma of emasculated flowers. However, the emasculating of flowers has been also related to a significant reduction of fruit set in almond (Kester et al., 1994), sweet cherry (Hedhly et al., 2009), and Japanese plum-type cultivars (Okie and Hancock, 2008; Okie and Weinberger, 1996).

The results of this work showed that emasculating of flowers in Japanese plum influenced fruit set, causing an increase or a reduction, even a lack, of fruit set depending on the cultivar. Although flower emasculating resulted in an increase of fruit set in 'Early Queen', in the other cultivars, the fruit set was drastically reduced ('Golden Globe') or even no fruit set was achieved ('Black Diamond' and 'Fortune'). Furthermore, the pattern of fruit drop was also different in 'Early Queen' in relation to the other cultivars analyzed. Thus, the drop of emasculated flowers in 'Early Queen' followed the same pattern as supplemental pollinated flowers, and fruit drop in both populations was not completed until 9 weeks after pollination. However, in the other cultivars, the drop of emasculated flowers was complete in the 5 weeks after pollination, several weeks before the establishment of the fruit set in the population of supplemental pollinated flowers.

The different behavior observed among the Japanese plum-type cultivars regarding both the effect of flower emasculating and the pattern of drop could be related to the different origin of each cultivar. Nowadays the term "Japanese plum" does not correspond to a pure species, but it comprises a heterogeneous group of diploid plums that were derived from the interspecific hybridization of the original species, *P. salicina*, with other diploid plums ( $2n = 16$ ) such as *P. americana*, *P. hortulana*, *P. munsoniana*, *P. simonii*, *P. nigra*, *P. besseyi*, *P. angustifolia*, and *P. cerasifera* (Byrne, 1989; Faust and Suranyi, 1999; Okie, 2006).

Observations of pollen tube growth confirmed that 'Black Diamond', 'Early Queen', 'Fortune', and 'Golden Globe' are self-incompatible, because no pollen tubes were observed at the base of the style in self-pollinated flowers and no fruit were obtained from self-pollinations in the field. All the crosses analyzed were compatible except for 'Golden Globe' × 'Fortune' in which no pollen tubes were observed at the base of the style. The percentages of pistils with pollen tubes at the base of

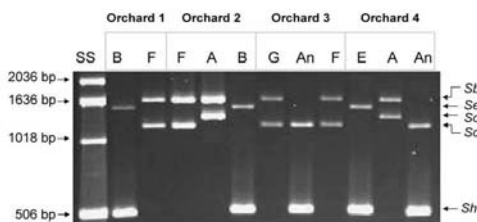


Fig. 4. Polymerase chain reaction amplification of *S*-RNase alleles of Japanese plum-type cultivars Black Diamond (B), Fortune (F), Early Queen (E), Ambra (A), Angeleno (An), and Golden Globe (G) from the different orchards using primers Pn C2-PCR. SS = size standard.

the style in compatible crosses were lower than in other *Prunus* but representative of Japanese plum-type cultivars in previous studies (Guerra et al., 2009).

The identification of the *S*-alleles of the six cultivars analyzed complemented the results obtained by pollination treatments and pollen tube growth. Cross-compatibility results correlated well with the percentages of fruit set obtained in each cross performed in non-emasculated flowers and allowed dismissing cross-incompatibility as the cause of the lack of fruit set in the crosses performed on emasculated flowers. Results confirmed the *S-RNase* genotype of 'Ambra', 'Angeleno', 'Black Diamond', 'Early Queen', and 'Fortune' (Guerra et al., 2009; Sapir et al., 2004). However, the *S-RNase* genotype of 'Golden Globe' reported here (*SbSc*) differed from that previously reported (*SbSf*) (Guerra et al., 2009). Because this cultivar descends from Laroda (*SbSc*) and Queen Ann (*SbSl*) (Ramming, 1994), it seems plausible that the *S*-genotype of 'Golden Globe' is *SbSc*. The existence of homonyms in this and other Japanese plum-type cultivars could explain situations of lack of fruit set in orchards in which the apparent compatible pollinizers are improperly named.

Results from both field and laboratory experiments indicated that the four female cultivars were self-incompatible. However, 'Black Diamond' and 'Early Queen' have the *Se*-haplotype that has been correlated with self-compatibility in some Japanese plum cultivars (Beppu et al., 2005; Guerra et al., 2009). Further fruit set and pollen tube growth experiments as well as molecular analysis are needed to confirm that *Se*-allele is correlated with self-compatibility in other cultivars.

The high proportion of emasculated flowers showing callose in both ovules in which fertilization could not take place correlated with the high reduction of fruit set in the affected cultivars. Flowers of *Prunus* contain two ovules within a single carpel, and fertilization of at least one ovule is required for fruit set. Thus, one of the two ovules, the primary ovule, can be fertilized and become a seed; the other, the secondary ovule, usually aborts (Bradbury, 1929). The two ovules within each flower are similar in size at anthesis. Although the primary ovule continues growing in the days after anthesis, the secondary ovule arrests its growth and degenerates. Degeneration of the secondary ovule has been linked to the appearance of callose that starts to accumulate at the chalazal end of the nucellus and then spreads into the whole ovule, which then shows clear symptoms of degeneration with a shrunken nucellus (Arbeloa and Herrero, 1991; Cerovic and Micic, 1999; Cerovic et al., 2000; Pimental and Polito, 1982; Rodrigo and Herrero, 1998; Stosser and Anvari, 1982). Although the premature degeneration of one of the two ovules is part of the normal developmental process of *Prunus* flowers, the degeneration of both ovules in flowers has been associated with female sterility in different *Prunus* species and cultivars (Lillecrapp et al., 1999; Mert and Soyulu, 2007). Likewise, ovule degeneration has been reported as the cause of reduction of fruit set in emasculated flowers of some cherry cultivars (Hedhly et al., 2009). Our results show that ovule degeneration caused by emasculation can also reduce and even prevent fruit set in some Japanese plum cultivars.

Flower emasculation as the cause of ovule degeneration and lack of fruit set was clear in three cultivars analyzed in this work. This may well be a general problem that could explain situations of lack of offspring in some crosses performed for breeding purposes between different Japanese plum-type cultivars with no apparent reasons for the lack of fruit set (Okie and

Hancock, 2008; Okie and Weinberger, 1996). Alternatively, crosses in those cultivars in which flower emasculation prevents fruit set could be performed by supplemental pollination of non-emasculated flowers with pollen of the desired male parent in caged branches or trees. For self-incompatible cultivars used as female parents, all the offspring obtained would be expected to descend from the male parent cultivar used as the pollen source. However, for self-compatible cultivars, the offspring would include individuals whose male parent could be the cultivar used as the female parent or the cultivar used as the supplemental pollinizer. In this case, the use of the self-incompatibility locus (*S*-genotype) as a genetic marker could be useful to identify those offspring of the desired cross, because it has been successfully used in *Prunus* to differentiate among different pollen sources (Sebolt and Iezzoni, 2009).

This study revealed a strong effect of emasculation on final fruit set that was related to degeneration of both ovules, because the crosses carried out by this technique can increase, reduce, and even prevent fruit set depending on cultivars. This information may be valuable to identify the causes for lack of offspring in some crosses performed for breeding purposes. Once known, this situation could be solved through the use of alternative methods to flower emasculation for crosses made on sensitive female cultivars.

#### Literature Cited

- Arbeloa, A., M.E. Daorden, E. Garcia, A. Wunsch, J.I. Hormaza, and J.A. Marin. 2006. Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica* 147: 389-394.
- Arbeloa, A. and M. Herrero. 1985. Valoración de la translocación al óvulo y de la esterilidad femenina en melocotonero. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei* 17:214-220.
- Arbeloa, A. and M. Herrero. 1991. Development of the ovular structures in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *New Phytol.* 118:527-534.
- Badr, S. and J. Crane. 1965. Growth of unpollinated ovaries of several deciduous fruit species. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 87:163-167.
- Bailey, C.H. and L.F. Hough. 1975. Apricots, p. 367-383. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, Lafayette, IN.
- Beppu, K., N. Komatsu, H. Yamane, H. Yaegaki, M. Yamaguchi, R. Tao, and I. Kataoka. 2005. *S*-e-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80:760-764.
- Boonprakob, U., D.H. Byrne, C.J. Graham, W.R. Okie, T. Beckman, and B.R. Smith. 2001. Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:451-461.
- Bradbury, D. 1929. A comparative study of the developing and aborting fruit of *Prunus cerasus*. *Amer. J. Bot.* 16:525-542.
- Brown, S.K., A.F. Iezzoni, and H.W. Fogle. 1996. Cherries, p. 213-255. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Fruit breeding*. Vol. I. Tree and tropical fruit. Wiley, New York, NY.
- Byrne, D.H. 1989. Inbreeding, coancestry, and founding clones of Japanese-type plums of California and the southeastern United States. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114:699-705.
- Cerovic, R. and N. Micic. 1999. Functionality of embryo sacs as related to their viability and fertilization success in sour cherry. *Sci. Hort.* 79:227-235.
- Cerovic, R., D. Ruzic, and N. Micic. 2000. Viability of plum ovules at different temperatures. *Ann. Appl. Biol.* 137:53-58.
- Faust, M. and D. Suranyi. 1999. Origin and dissemination of plums. *Hort. Rev. (Amer. Soc. Hort. Sci.)* 23:179-231.
- Free, J.B. 1964. Comparison of importance of insect + wind pollination of apple trees. *Nature* 201:726-727.



- Guerra, M.E., J. Rodrigo, M. Lopez-Corrales, and A. Wunsch. 2009. *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breed.* 128:304-311.
- Hedhly, A., J.I. Hormaza, and M. Herrero. 2009. Flower emasculation accelerates ovule degeneration and reduces fruit set in sweet cherry. *Sci. Hort.* 119:455-457.
- Hjeltnes, S.H. and V. Stansy. 1998. Effect of different hybridization techniques on fruit set in plums. *Acta Hort.* 478:25-29.
- Hormaza, J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* 104:321-328.
- Jefferies, C.J. and A.R. Belcher. 1974. A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. *Stain Technol.* 49:199-202.
- Kester, D.E., T.M. Gradziel, and W.C. Mücke. 1994. Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:106-109.
- Layne, R.E.C. 1983. Hybridization, p. 48-73. In: J.N. Moore and J. Janick (eds.). *Methods in fruit breeding*. Purdue University Press, Lafayette, IN.
- Lillecrapp, A.M., M.A. Wallwork, and M. Sedgley. 1999. Female and male sterility cause low fruit set in a clone of the 'Trevatt' variety of apricot (*Prunus armeniaca*). *Sci. Hort.* 82:255-263.
- Linskens, H.F. and K. Esser. 1957. Über eine spezifische Anfärbung der Pollen schläuche und die Zählung Kallosapopten nach Selbstung und Fremdung. *Naturwiss.* 44:16.
- Mert, C. and A. Soylu. 2007. Possible cause of low fruit set in the sweet cherry cultivar 0900 Ziraat. *Can. J. Plant Sci.* 87:593-594.
- Moreno, Y.M., A.N. Miller-Azarenko, and W. Potts. 1992. Genotype, temperature, and fall-applied ethephon affect plum flower bud development and ovule longevity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117:14-21.
- Okie, W.R. 2006. Introgression of *Prunus* species in plum. *New York Fruit Qrtly.* 14:29-37.
- Okie, W.R. and J.F. Hancock. 2008. Plums, p. 337-358. In: J.F. Hancock (ed.). *Temperate fruit crop breeding germplasm to genomics*. Springer, East Lansing, MI.
- Okie, W.R. and D.W. Ramming. 1999. Plum breeding worldwide. *HortTechnology* 9:162-176.
- Okie, W.R. and J.H. Weinberger. 1996. Plums, p. 559-607. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Fruit breeding. Vol. I. Tree and tropical fruit*. Wiley, New York, NY.
- Pimienta, E. and V.S. Polito. 1982. Ovule abortion in 'Nonpareil' almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb]. *Amer. J. Bot.* 69:913-920.
- Ramming, D.W. 1994. Plum. Register of new fruit and nut varieties. Brooks and Olmo. List 36. *HortScience* 29:955-956.
- Rodrigo, J. and M. Herrero. 1996. Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Monique'. *J. Hort. Sci.* 71:801-805.
- Rodrigo, J. and M. Herrero. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex. Plant Reprod.* 11: 86-93.
- Rodrigo, J. and M. Herrero. 2002a. Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Sci. Hort.* 92: 125-135.
- Rodrigo, J. and M. Herrero. 2002b. The onset of fruiting in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J. Appl. Bot.* 76:13-19.
- Rodrigo, J., M. Herrero, and J.I. Hormaza. 2009. Pistil traits and flower fate in apricot (*Prunus armeniaca*). *Ann. Appl. Biol.* 154: 365-375.
- Sapir, G., R.A. Stern, D. Eisikowitch, and M. Goldway. 2004. Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 79:223-227.
- Sebolt, A.M. and A.F. Iezzoni. 2009. Utilization of the *S*-locus as a genetic marker in cherry to differentiate among different pollen donors. *HortScience* 44:1542-1546.
- Socias i Company, R., J.G. Aparisi, and J.M. Alonso. 2005. Year and enclosure effects on fruit set in an autogamous almond. *Sci. Hort.* 104:369-377.
- Stosser, R. and S.F. Anvari. 1982. On the senescence of ovules in cherries. *Sci. Hort.* 16:29-38.
- Tao, R., H. Yamane, A. Sugiura, H. Murayama, H. Sassa, and H. Mori. 1999. Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S-RNases* in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124:224-233.
- Theiler-Hedtrich, R. 1994. Inheritance of tree and fruit characters in progenies from crosses of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Euphytica* 77:37-44.
- Weinberger, J.H. 1975. Plums, p. 336-346. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press, Lafayette, IN.
- Williams, J.H., W.E. Friedman, and M.L. Arnold. 1999. Developmental selection within the angiosperm style: Using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9201-9206.
- Williams, R.R. 1970a. The effect of supplementary pollination on yield, p. 6-10. In: R.R. Williams and D. Wilson (eds.). *Towards regulated cropping*. Grower Books, London, UK.
- Williams, R.R. 1970b. Techniques used in fruit-set experiments, p. 57-61. In: R.R. Williams and D. Wilson (eds.). *Towards regulated cropping*. Grower Books, London, UK.
- Yamane, H., R. Tao, A. Sugiura, N.R. Hauck, and A.F. Iezzoni. 2001. Identification and characterization of *S-RNases* in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:661-667.



**Anexo 2. PROCEDENCIA DEL MATERIAL VEGETAL**

<b>Origen del material vegetal</b>	<b>Cultivares</b>
Agroseguro S.A., Fincas comerciales cedidas para la investigación en Aragón y Extremadura.	Black Gold, Black Splendor, Black Star, Earliqueen, Golden Plum, Golden Plumza, Larry Ann, Royal Diamond
Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Colección de cultivares de ciruelo japonés. Zaragoza.	Ambra, Angeleno, Blackamber, Black Beaut, Black Diamond, Casselman, Eldorado, Fortune, Freedom, Friar, Frontier, Golden Japan, Laroda, Nubiana, Queen Rosa, Queen Ann, Red Beaut, Santa Rosa, Simka, Songold
Centro de Técnicas Agrarias CTA del Departamento de Agricultura y Alimentación del Gobierno de Aragón	606, Golden Globe, Green Sun, Howard Sun, Laetitia, TC Sun, Zanzi Sun
Cooperativa de Regantes de Extremadura (CREX), Fincas comerciales cedidas para la investigación en Extremadura.	3442, 3458, 3485, 3517, 3527, 3530, 3556, 3575, 3611, 3726, 3989, Autum Giant, Black Late, Crimson Glo, Delbartazur, E137, E316, E326, Gaia, Mitard, October Red, Pioneer, PR34, PR9, Primetime, Royal Zee, SGPR3318, SGPR2726, SGPR551, Showtime, Songria 10, Songria 15
Grupo ALM, Viveristas y productores. Aragón.	John W., Owen T
Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA-Generalitat de Catalunya), Colección de cultivares de ciruelo japonés en Lérida.	Hiromi Red, Joanna Red, October Sun, Ruby Crunch, Sapphire, Souvenir
Ritucon, Consultoría Agronómica.	Olinda, Showtime
Universidad de Kyoto, Japón.	Oishiwasesumomo, Sordum
USDA-ARS-National Clonal Germplasm Repository, Davis, California.	Abundance, Burmosa, Formosa, Kelsey, Mariposa, Ozarkpremier, Simon, Wickson
Viveros Atanasio Naranjo, S.A.	AU Amber, AU Road side, AU Rosa, Black Jewell, Black Ruby, Byron Gold, Champion, Early Sun, Freya, Morris, Rubirosa, Ruby Queen, Ruby Sweet, Sparkly, Sweet August, Sybarite
Viveros Provedo, S.A.	26-bd-10, 30-an-7, 31-sg-6, Royal Garnet



## Anexo 3. DESCRIPCIÓN DE CULTIVARES\*

CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
			Tamaño (calibre)	Sabor	
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Angeleno®</b> (Angelenex, Suplumsix) Queen Ann pol. libre Estados Unidos (1967)	Media Autoincompatible Altas	Muy tardía	Medio-grande Negro-púrpura Amarillo-ambar Redondeada-ovalada	Bueno Firme Resistente a transporte Semilibre	Buena Medio Erecto
<b>Autum Giant®</b>  King David x Roysun Estados Unidos (1986)	Media Altas	Muy tardía	Muy grande Amarillo-chapa roja Amarillo Redondeada	Escaso Firme Resistente a almacenaje	Buena Vigoroso Erecto
<b>Blackamber</b>  Friar x Queen Rosa Estados Unidos (1980)	Media Autoincompatible altas	Media	Grande Negro Amarillo crema Ovalada	Bueno Firme Resistente a almacenaje Semilibre	Escasa Medio Erecto
<b>Black Beaut®</b>  Red Beaut pol. libre Estados Unidos (1975)	Muy temprana Altas	Temprana	Medio-grande Negro Amarillo rojizo Redondeada	Bueno Firme Firme Semilibre	Buena Medio Erecto
<b>Black Diamond®</b> (Diamex, Suplumeleven) Angeleno pol. libre Estados Unidos (1982)	Media Altas	Tardía	Grande Negro Rojo Redondeada	Muy bueno Firme Firme Semilibre	Muy buena Medio Erecto
<b>Black Gold®</b> (Suplumlwelve) Angeleno pol. libre Estados Unidos (1982)	Media Altas	Media	Medio Negro Rojo Redondeada	Firme Resistente a almacenaje Semilibre	Muy buena Medio Abierto

\* Información incluida en: Guerra ME, López Corrales M, Wunsch A, Rodrigo J. (2009). 'Ciruelo japonés: Descripción varietal y situación del cultivo'. *Revista de Fruticultura* 1:1-8.

CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Black Splendor</b>	Muy temprana Autoincompatible	Temprana	Medio-grande Negro	Bueno Firme	Buena Medio
Black Amber pol. libre Estados Unidos (1988)			Rojo Ovalada		
<b>Crimson Glo</b>	Temprana Autoincompatible	Temprana Media	Medio-grande Negro		Muy buena Vigoroso
(Laroda x Queen Ann) x Friar Estados Unidos (2002)			Rojo Redondeada		Erecto
<b>Earliqueen</b>	Media Autoincompatible	Temprana	Grande Rojo oscuro	Firme	Vigoroso
61EC540 pol. libre Estados Unidos (1994)			Amarillo crema Redondeada	Adherente	Erecto
<b>Fortune</b>	Media Autoincompatible	Tardía	Grande Rojo	Bueno Firme	Media Medio
Laroda x (Q.Ann x Late Santa Rosa) Estados Unidos (1988)	Altas		Amarillo Redondeada	Resistente a almacenaje	Erecto
<b>Friar</b>	Media <sup>1</sup>	Tardía	Grande Negro	Bueno Firme	Muy buena Muy vigoroso
Gaviota x Nubiana Estados Unidos (1967)	Altas		Amarillo Ovalada- redondeada	Resistente a transporte	Abierto
<b>Frontier</b>	Media Autoincompatible	Temprana	Muy grande Negro	Bueno Muy firme	Muy buena Vigoroso
Mariposa x Laroda Estados Unidos (1960)	Altas		Rojo Ovalada- redondeada	Resistente a transporte	Abierto
<b>Golden Globe®</b>	Media Autoincompatible	Tardía	Grande Amarillo	Medio Firme	Buena Vigoroso
Laroda x Queen Ann Estados Unidos (1990)			Amarillo Redondeada		Semierecto

CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Golden Japan (Shiro)</b> <i>P. simonii</i> x <i>P. cerasifera</i> x <i>P. munsoniana</i> Estados Unidos (1889)	Media Autoincompatible Altas	Temprana	Medio Amarillo Amarillo Redondeada	Bueno Media Poco resistente a transporte Semilibre	Buena Vigoroso Abierto
<b>Hiroimi Red®</b> 20EB314 pol. libre Estados Unidos (1997)	Media Autoincompatible	Media	Grande Rojo Amarillo crema Redondeada	Bueno Firme Adherente	Buena Vigoroso Erecto
<b>Howard Sun®</b> Desconocido Estados Unidos (1986)	Media Autoincompatible Altas	Muy tardía	Grande Negro-púrpura Amarillo- ambar Redondeada	Bueno Firme Resistente	Buena Poco vigoroso Medio
<b>Joanna Red®</b> 46G731 pol. libre Estados Unidos (1998)	Media Autoincompatible	Tardía	Medio-grande Rojo Amarillo crema Redondeada	Bueno Firme Libre	Buena Alto Erecto
<b>Laetitia®</b> Pol. libre de Golden King/ desconocido Sudáfrica (1985)	Media Autocompatible Altas	Tardía	Medio-grande Rojo Naranja Redondeada- ovalada	Bueno Firme Resistente a almacenaje Semilibre	Buena Vigoroso Semierecto
<b>Laroda</b> Gaviota x Santa Rosa Estados Unidos (1954)	Media Autoincompatible Alta	Media	Grande Rojo oscuro Naranja Redondeada	Bueno Firme Resistente a transporte Semilibre	Media Vigoroso Erecto

CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Larry ann® (Freedom)</b>	Media Autoincompatible	Muy tardía	Grande Rojo oscuro Amarillo	Bueno Firme Resistente a almacenaje	Vigoroso Muy erecto
Estados Unidos (1980)			Redondeada		
<b>Nubiana</b>	Media Autocompatible	Media	Grande Negro	Escaso Muy firme	Escasa Medio
Gaviota x Eldorado Estados Unidos (1954)	Altas		Amarillo Redondeada	Resistente a transporte Semilibre	Erecto
<b>October Sun®</b>	Media	Muy tardía	Medio-grande Amarillo-chapa roja	Bueno	Buena Muy vigoroso
Desconocido Estados Unidos (1990)	Altas		Amarillo Redondeada-ovalada		Medio
<b>Owen T.</b>	Media Autoincompatible	Temprana	Grande Negro	Firme	Buena Medio
(Friar x Queen Rosa) pol. libre Estados Unidos (2002)			Amarillo crema Ovalado		Erecto
<b>Pioneer®</b>	Media Autoincompatible	Temprana	Medio-grande Rojo	Bueno Media	Media Medio
Desconocido Sudáfrica (1995)	Bajas		Amarillo crema Redondeada	Resistente a almacenaje Adherente	Abierto
<b>Primetime®</b>	Media Autocompatible	Media	Grande Rojo-púrpura	Escaso Firme	Muy buena Medio
Challenger x Showtime Estados Unidos (1993)			Amarillo rojizo Cordiforme		Erecto
<b>Queen Ann</b>	Media Autoincompatible	Tardía	Grande Negro	Bueno Firme	
Gaviota x Eldorado Estados Unidos (1954)	Altas		Amarillo crema	Resistente a almacenaje y transporte	



CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Queen Rosa</b>	Media Autoincompatible	Media	Muy grande Rojo	Bueno Muy firme	Escasa Muy vigoroso
Queen Ann x Santa Rosa Estados Unidos (1972)	Altas		Amarillo Redondeada	Resistente a transporte Semilibre	
<b>Red Beaut® 606</b>	Muy temprana Androestéril	Muy temprana	Medio Rojo	Bueno Firme	Buena
Eldorado x Burmosa, pol.libre Estados Unidos (1965)	Medias		Amarillo Redondeada	Resistente a transporte Libre	
<b>Royal Diamond®</b>	Tardía	Muy tardía	Grande		Buena
Desconocido Estados Unidos (1989)	Altas		Negro Amarillo- ambar Redondeada- ovalada	Firme Resistente a transporte Semilibre	Medio Muy erecto
<b>Royal Garnet®</b>	Muy temprana	Temprana	Medio Negro		Buena Medio
Red Beaut pol. libre Estados Unidos (1982)			Amarillo		Erecto
<b>Royal Zee</b>	Media	Muy temprana	Grande Rojo oscuro	Medio Firme	Buena Medio
Royal beaut pol. libre Estados Unidos (1985)	Medias		Amarillo Redondeada	Resistente a almacenaje	Erecto
<b>Ruby Crunch®</b>	Media Autoincompatible	Muy tardía	Grande Rojo	Medio Firme	Muy vigoroso
Desconocido Estados Unidos			Rojo Redondeada	Sensible a cracking	
<b>Santa Rosa</b>	Media Autocompatible	Temprana	Grande Rojo	Bueno Media	Escasa
Semillas de <i>P. salicina</i> Estados Unidos (1903 ó 1907)	Medias		Amarillo rojizo Redondeada	Resistente a almacenaje Adherente	Erecto

CULTIVAR	FLORACIÓN	MADURACIÓN	CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		ÁRBOL
(Sinonimia)	Época	Época	Tamaño (calibre)	Sabor	Productividad
Origen	Compatibilidad		Color piel	Firmeza	Vigor
País (Fecha)	Necesidades de frío		Color pulpa	Postcosecha	Porte
			Forma	Adherencia del hueso	
<b>Sapphire</b>	Media Autoincompatible	Media	Muy grande Negro-púrpura	Muy bueno Firme	Muy buena Medio
Semillas de Laroda irradiadas Sudáfrica (1992)	Medias		Amarillo crema Redondeada	Resistente a almacenaje Semilibre	Abierto
<b>Showtime</b>	Media Autoincompatible	Temprana	Grande Rojo-púrpura	Escaso Firme	Escasa Vigoroso
Santa Rosa pol. libre Estados Unidos (1992)	Altas		Amarillo rojizo Redondeada-ovalada	Libre	Erecto
<b>Simka</b>	Media Autocompatible	Tardía	Grande-muy grande Negro	Escaso Firme	Media
(Sim-ka Rose) Desconocido Estados Unidos (1959)	Altas		Amarillo claro Redondeada	Resistente a almacenaje Semilibre	
<b>Songold</b>	Media Autoincompatible	Tardía	Grande Amarillo verdoso	Muy bueno Firme	Buena Vigoroso
Golden King x Wickson Sudáfrica (1970)	Altas		Amarillo-ambar Redondeada-ovalada	Resistente a transporte Adherente	Erecto
<b>Souvenir®</b>	Muy temprana Autocompatible	Media	Medio-grande Rojo	Bueno Firme	Muy buena Vigoroso
Songold pol. libre Sudáfrica 1993	Medias		Amarillo rojizo	Resistente a almacenaje	Semiabierto
<b>TC Sun®</b>	Media	Tardía	Grande Amarillo	Muy bueno Firme	Muy buena Medio Medio

Fuentes: Brooks y Olmo (1997, 1999, 2002, 2004); Bellini y Nencetti (1999); Liverani *et al.*, (2001,2008); Lugli *et al.*, (2007); Guerra *et al.*, (2009) y elaboración propia.

<sup>1</sup>Autoincompatible según Brooks y Olmo (1997) y autocompatible según Ramming y Cociu (1990) y esta tesis (Capítulos 2 y 3)

**Anexo 4. GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE CIRUELO JAPONES.**

<b>G.I.</b>	<b>Genotipo S</b>	<b>Cultivares</b>	<b>Referencias</b>
I	<i>SaSb</i>	Burmosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	<i>SaSb</i>	Red Beaut	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
	<i>SaSb</i>	Sordum	Yamane <i>et al.</i> , 1999; Este trabajo
	<i>SaSb</i>	606	Este trabajo
II	<i>SbSc</i>	Black Beaut	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Blackamber	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Delbartazur	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Early Sun	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Flavor Granade	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>SbSc</i>	Fortune	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Golden Globe*	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Golden Plum	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Golden Plumza	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Green sun*	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Laroda	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Nubiana*	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	October Sun	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Oishinakata	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>SbSc</i>	Super Giant	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>SbSc</i>	Taiyo	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>SbSc</i>	TC Sun	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>SbSc</i>	Zanzi Sun	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	SGPR3318	Este trabajo
	<i>SbSc</i>	SGPR3726	Este trabajo
<i>SbSc</i>	3556	Este trabajo	
<i>SbSc</i>	3726	Este trabajo	
III	<i>SbSf</i>	AU Amber	Este trabajo
	<i>SbSf</i>	AU Road side	Este trabajo
	<i>SbSf</i>	Frontier	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	<i>SbSf</i>	Golden Globe*	Este trabajo
	<i>SbSf</i>	Gran Colle	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SbSf</i>	Verna Delicious	Beppu <i>et al.</i> , 2003
IV	<i>SbSh</i>	Eldorado	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Freedom	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Friar*	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Heibaoshi	Zhang <i>et al.</i> , 2007

G.I.	Genotipo S	Cultivares	Referencias
IV (Cont.)	<i>SbSh</i>	Hiromi Red	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Larry Ann	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Nubiana*	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Qiuji	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SbSh</i>	Quenn Ann	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Songria 10	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	Yonemomo	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>SbSh</i>	E137	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	E316	Este trabajo
	<i>SbSh</i>	PR34	Este trabajo
V	<i>SbSi</i>	Bakemonosumomo	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>SbSi</i>	Kasahara Hatankyou	Beppu <i>et al.</i> , 2003
VI	<i>SfSh</i>	Abundance*	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SfSh</i>	Black Ruby	Este trabajo
	<i>SfSh</i>	Kelsey Paulista	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SfSh</i>	Kelsey*	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SfSh</i>	Mariposa	Este trabajo
	<i>SfSh</i>	Younai	Zhang <i>et al.</i> , 2007
VII	<i>ScSh</i>	Angelenex	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Angeleno	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Gaia	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Green Sun*	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>ScSh</i>	Nvgelei	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>ScSh</i>	Queen Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Royal Diamond	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Ruby Crunch	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Ruby Queen	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	Sweet August	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	3485	Este trabajo
	<i>ScSh</i>	30-an-71	Este trabajo
VIII	<i>SeSh</i>	Black Diamond	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Black Gold	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Black Late	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Diamex	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Earliqueen	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Extremagold	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Huangjiazuanshi	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SeSh</i>	John W.	Este trabajo

G.I.	Genotipo S	Cultivares	Referencias
VIII (Cont.)	<i>SeSh</i>	Laetitia	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	PR9	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Showtime	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	Souvenir	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	3517	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	3530	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	3575	Este trabajo
	<i>SeSh</i>	26-bd-10	Este trabajo
IX	<i>SfSg</i>	Golden Japan	Este trabajo
	<i>SfSg</i>	Jinshali	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SfSg</i>	White Plum	Beppu <i>et al.</i> , 2002
X	<i>ShSk</i>	Friar*	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>ShSk</i>	Golden Plum	Este trabajo
	<i>ShSk</i>	Howard sun	Este trabajo
	<i>ShSk</i>	Redgold	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>ShSk</i>	Songold	Este trabajo
	<i>ShSk</i>	3611	Este trabajo
	<i>ShSk</i>	3989	Este trabajo
	<i>ShSk</i>	31-sg-6	Este trabajo
XI	<i>ScSe</i>	AU Rosa	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Autum Giant	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Beauty	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>ScSe</i>	Black Splendor	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Casselman	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Champion	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Late Santa Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>ScSe</i>	Meiguili	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>ScSe</i>	Royal Garnet	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Royal Zee	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Rubirosa	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Santa Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>ScSe</i>	Sweet Autum	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>ScSe</i>	Sybarite	Este trabajo
	<i>ScSe</i>	3527	Este trabajo
<i>ScSe</i>	E326	Este trabajo	
XII	<i>SbSe</i>	Black Jewell	Este trabajo
	<i>SbSe</i>	Flavor King	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>SbSe</i>	Freya	Este trabajo

G.I.	Genotipo S	Cultivares	Referencias
XII (Cont.)	<i>SbSe</i>	Pioneer	Este trabajo
	<i>SbSe</i>	Saphire	Este trabajo
	<i>SbSe</i>	Sparkly	Este trabajo
	<i>SbSe</i>	SGPR551	Este trabajo
XIII	<i>SeSf</i>	Black Star	Este trabajo
	<i>SeSf</i>	Morris	Este trabajo
	<i>SeSf</i>	Primetime	Este trabajo
XIV	<i>SaSc</i>	Crimson Glo	Este trabajo
	<i>SaSc</i>	87-91	Este trabajo
XV	<i>SgSh</i>	Bonnie	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SgSh</i>	Ruby Sweet	Este trabajo
	<i>SgSk</i>	Starkgold	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SgSh</i>	30-AN-7	Este trabajo
XVI	<i>SfSk</i>	Kelsey *	Este trabajo
	<i>SfSk</i>	Weikeshum	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SfSk</i>	Wickson	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
XVII	<i>SbSo</i>	Ambra	Este trabajo
	<i>SbSo</i>	Olinda	Este trabajo
XVIII	<i>SaSf</i>	Ozarkpremier	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	<i>SaSf</i>	Terada	Beppu <i>et al.</i> , 2002
XIX	<i>SbSd</i>	Formosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	<i>SbSd</i>	Furongli	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SbSd</i>	Gaixiandali	Zhang <i>et al.</i> , 2007
XX	<i>SbSk</i>	Harypickstone	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SbSk</i>	3442	Este trabajo
XXI	<i>SeSk</i>	Simka	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	<i>SeSk</i>	Simon	Este trabajo
0	<i>SaSk</i>	Abundance*	Este trabajo
	<i>SaSm</i>	Botan	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>ShSr</i>	Byron Gold	Este trabajo
	<i>SgSl</i>	Combination	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SbSg</i>	Honey Rosa	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SrSf</i>	Huangpili	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>SrSs</i>	Joana Red	Este trabajo
	<i>SbSl</i>	Lantz	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SqSf</i>	Mitard	Este trabajo
	<i>ShSp</i>	October Red	Este trabajo
	<i>ScSd</i>	Oishiwasesumomo	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo

<b>G.I.</b>	<b>Genotipo S</b>	<b>Cultivares</b>	<b>Referencias</b>
0 (Cont.)	<i>ScSo</i>	Red Heart	Este trabajo
	<i>SaSe</i>	Rio	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	<i>SaSh</i>	Songria 15	Este trabajo
	<i>ScSf</i>	Summer Queen	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SaSn</i>	Superior	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SfSj</i>	Tecumseh	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	<i>SeS<sub>10</sub></i>	Xiangjiabli	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	<i>Sh</i>	Gaia	Este trabajo
	<i>Sf</i>	Shiro	Halász <i>et al.</i> , 2007
	<i>Se</i>	3458	Este trabajo

\* Cultivar descrito con distintos genotipos.





**Anexo 5. GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE CIRUELO JAPONES POR ORDEN ALFABÉTICO DE CULTIVARES.**

	<b>Cultivares</b>	<b>G.I.</b>	<b>Genotipo S</b>	<b>Referencias</b>
<b>A</b>	Abundance*	VI	<i>SfSh</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Abundance*	0	<i>SaSk</i>	Este trabajo
	Ambra	XVII	<i>SbSo</i>	Este trabajo
	Angelenex	VII	<i>ScSh</i>	Este trabajo
	Angeleno	VII	<i>ScSh</i>	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	AU Amber	III	<i>SbSf</i>	Este trabajo
	AU Road side	III	<i>SbSf</i>	Este trabajo
	AU Rosa	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	Autum Giant	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
<b>B</b>	Bakemonosumomo	V	<i>SbSi</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	Beauty	XI	<i>ScSe</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	Black Beaut	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Black Diamond	VIII	<i>SeSh</i>	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
	Black Gold	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	Black Jewell	XII	<i>SbSe</i>	Este trabajo
	Black Late	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	Black Ruby	VI	<i>SfSh</i>	Este trabajo
	Black Splendor	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	Black Star	XIII	<i>SeSf</i>	Este trabajo
	Blackamber	II	<i>SbSc</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	Bonnie	XV	<i>SgSh</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Botan	0	<i>SaSm</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Burmosa	I	<i>SaSb</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	Byron Gold	0	<i>ShSr</i>	Este trabajo
<b>C</b>	Casselman	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	Champion	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	Combination	0	<i>SgSl</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Crimson Glo	XIV	<i>SaSc</i>	Este trabajo
<b>D</b>	Delbartazur	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Diamex	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	E137	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
<b>E</b>	E316	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	E326	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	Earliqueen	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	Early Sun	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Eldorado	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Extremagold	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
<b>F</b>	Flavor Granade	II	<i>SbSc</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007

	Cultivares	G.I.	Genotipo S	Referencias
	Flavor King	XII	<i>SbSe</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007
	Formosa	XIX	<i>SbSd</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	Fortune	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Freedom	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Freya	XII	<i>SbSe</i>	Este trabajo
	Friar*	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Friar*	X	<i>ShSk</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007
	Frontier	III	<i>SbSf</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
	Furongli	XIX	<i>SbSd</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<b>G</b>	Gaia	0	<i>Sh</i>	Este trabajo
	Gaia	VII	<i>ScSh</i>	Este trabajo
	Gaixiandali	XIX	<i>SbSd</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Golden Globe*	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Golden Globe*	III	<i>SbSf</i>	Este trabajo
	Golden Japan	IX	<i>SfSg</i>	Este trabajo
	Golden Plum*	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Golden Plum*	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo
	Golden Plumza	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Gran Colle	III	<i>SbSf</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Green Sun*	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	Green Sun*	VII	<i>ScSh</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007
<b>H</b>	Harypickstone	XX	<i>SbSk</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Heibaoshi	IV	<i>SbSh</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Hiroimi Red	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Honey Rosa	0	<i>SbSg</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Howard sun	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo
	Huangjiazuanishi	VIII	<i>SeSh</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Huangpili	0	<i>S<sub>7</sub>Sf</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<b>J</b>	Jinshali	IX	<i>SfSg</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	Joana Red	0	<i>SrSs</i>	Este trabajo
	John W.	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
<b>K</b>	Kasahara Hatankyou	V	<i>SbSi</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Kelsey Paulista	VI	<i>SfSh</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Kelsey*	XVI	<i>SfSk</i>	Este trabajo
	Kelsey*	VI	<i>SfSh</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
<b>L</b>	Laetitia	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	Lantz	0	<i>SbSl</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Laroda	II	<i>SbSc</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
	Larry Ann	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Late Santa Rosa	XI	<i>ScSe</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
<b>M</b>	Mariposa	VI	<i>SfSh</i>	Este trabajo

Cultivares	G.I.	Genotipo S	Referencias
Meiguili	XI	ScSe	Zhang <i>et al.</i> , 2007
Mitard	0	SqSf	Este trabajo
Morris	XIII	SeSf	Este trabajo
<b>N</b> Nubiana*	II	SbSc	Este trabajo
Nubiana*	IV	SbSh	Este trabajo
Nvgelei	VII	ScSh	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<b>O</b> October Red	0	ShSp	Este trabajo
October Sun	II	SbSc	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
Oishinakata	II	SbSc	Beppu <i>et al.</i> , 2002
Oishiwasesumomo	0	ScSd	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
Olinda	XVII	SbSo	Este trabajo
Owen T	IV	SbSh	Este trabajo
Ozarkpremier	XVIII	SaSf	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
<b>P</b> Pioneer	XII	SbSe	Este trabajo
PR34	IV	SbSh	Este trabajo
PR9	VIII	SeSh	Este trabajo
Primetime	XIII	SeSf	Este trabajo
<b>Q</b> Qiuji	IV	SbSh	Zhang <i>et al.</i> , 2007
Queen Rosa	VII	ScSh	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
Quenn Ann	IV	SbSh	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
<b>R</b> Red Beaut	I	SaSb	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Este trabajo
Red Heart	0	ScSo	Este trabajo
Redgold	X	ShSk	Zhang <i>et al.</i> , 2007
Rio	0	SaSe	Beppu <i>et al.</i> , 2002
Royal Diamond	VII	ScSh	Este trabajo
Royal Garnet	XI	ScSe	Este trabajo
Royal Zee	XI	ScSe	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
Rubirosa	XI	ScSe	Este trabajo
Ruby Crunch	VII	ScSh	Este trabajo
Ruby Queen	VII	ScSh	Este trabajo
Ruby Sweet	XV	SgSh	Este trabajo
<b>S</b> Santa Rosa	XI	ScSe	Beppu <i>et al.</i> , 2002; Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
Saphire	XII	SbSe	Este trabajo
SGPR3318	II	SbSc	Este trabajo
SGPR3726	II	SbSc	Este trabajo
SGPR551	XII	SbSe	Este trabajo
Shiro	0	Sf	Halász <i>et al.</i> , 2007
Showtime	VIII	SeSh	Este trabajo
Simka	XXI	SeSk	Beppu <i>et al.</i> , 2003; Este trabajo
Simon	XXI	SeSk	Este trabajo

	Cultivares	G.I.	Genotipo S	Referencias
	Songold	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo
	Songria 10	IV	<i>SbSh</i>	Este trabajo
	Songria 15	0	<i>SaSh</i>	Este trabajo
	Sordum	I	<i>SaSb</i>	Yamane <i>et al.</i> , 1999; Este trabajo
	Souvenir	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	Sparkly	XII	<i>SbSe</i>	Este trabajo
	Starkgold	XV	<i>SgSk</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Summer Queen	0	<i>ScSf</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Super Giant	II	<i>SbSc</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007
	Superior	0	<i>SaSn</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Sweet August	VII	<i>ScSh</i>	Este trabajo
	Sweet Autum	XI	<i>ScSe</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007
	Sybarite	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
<b>T</b>	Taiyo	II	<i>SbSc</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	TC Sun	II	<i>SbSc</i>	Halász <i>et al.</i> , 2007; Este trabajo
	Tecumseh	0	<i>SfSj</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
	Terada	XVIII	<i>SaSf</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
<b>V</b>	Verna Delicious	III	<i>SbSf</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2003
<b>W</b>	Weikeshum	XVI	<i>SfSk</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
	White Plum	IX	<i>SfSg</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	Wickson	XVI	<i>SfSk</i>	Sapir <i>et al.</i> , 2004; Este trabajo
<b>X</b>	Xiangjiabli	0	<i>SeS<sub>10</sub></i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<b>Y</b>	Yonemomo	IV	<i>SbSh</i>	Beppu <i>et al.</i> , 2002
	Younai	VI	<i>SfSh</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2007
<b>Z</b>	Zanzi Sun	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	26-bd-10	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	30-AN-7	XV	<i>SgSh</i>	Este trabajo
	30-an-71	VII	<i>ScSh</i>	Este trabajo
	31-sg-6	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo
	3442	XX	<i>SbSk</i>	Este trabajo
	3458	0	<i>Se</i>	Este trabajo
	3485	VII	<i>ScSh</i>	Este trabajo
	3517	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	3527	XI	<i>ScSe</i>	Este trabajo
	3530	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	3556	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	3575	VIII	<i>SeSh</i>	Este trabajo
	3611	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo
	3726	II	<i>SbSc</i>	Este trabajo
	3989	X	<i>ShSk</i>	Este trabajo

Cultivares	G.I.	Genotipo S	Referencias
606	I	SaSb	Este trabajo
87-91	XIV	SaSc	Este trabajo

\* Cultivar descrito con distintos genotipos.



### Anexo 6. PORCENTAJE DE PISTILOS CON TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO EN AUTOPOLINIZACIONES Y CRUCES ENTRE CULTIVARES DE CIRUELO JAPONÉS REALIZADOS EN LABORATORIO.

G.I. (genotipo S)	G.I. ♂ / ♀	II	III	IV	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XXI
I (S <sub>6</sub> S <sub>6</sub> )	Red Beaut	35	75	13							
II (S <sub>6</sub> S <sub>6</sub> )	Blackamber	0	0	0	100						83
	Fortune	0	0	0	70	63	58	25	42		
	Laroda	0	0	0							
	Tc Sun	0	0	0							
	Zanzi sun	15	0	0							
III (S <sub>6</sub> S <sub>7</sub> )	Green sun	0	0	0							
	Golden Plum	0	0	0							
	Golden Globe	0	67	0							
	Frontier	0	0	0	91	25	86				33
IV (S <sub>6</sub> S <sub>8</sub> )	Flavour Queen	80	0	0							
	Eldorado	0	63	0							
	Friar	100	0	0	50						
	Hiroimi Red	0	0	0							
	Nubiana	0	0	0							
VII (S <sub>6</sub> S <sub>8</sub> )	Queen Ann	0	38	0	92						
	Larry Ann	0	8	0							
	Angeleno	75	29	0	0	33	43	20	83		29
	Sweet August	29	100	0	0	0	0				
VIII (S <sub>6</sub> S <sub>8</sub> )	Queen Rosa	25	50	0	89	0	0	100			
	Black Diamond	67	100	0	0	12	0				
	Laetitia	91	0	0	50	71	0				
	Earlqueen	92	0	0	0	0	0				
IX (S <sub>6</sub> S <sub>9</sub> )	Black Gold	91	0	0	58	0	0				
	Golden Japan	92	50	75	27	60	63	0	36	0	59
	Songold	75	50	78	27	60	88	57	60	79	83
XI (S <sub>6</sub> S <sub>9</sub> )	Casselman										
	Champion										
	Rubirosa	38	76								
	Santa Rosa		40	57							
XIII (S <sub>6</sub> S <sub>9</sub> )	Black Star	70	80	75	83	75	91	80	67	0	64
	Simka		20			50	60	67			

→ cruce compatible; 
 → dato no concluyente; 
 → cruce incompatible

## *Referencias*