

## Evaluación del carácter de autocompatibilidad en nuevas variedades de ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.)

M.E. Guerra<sup>1</sup> y J. Rodrigo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Hortofruticultura. CICYTEX-Centro de Investigación 'Finca La Orden-Valdesequera'. A-V, km 372, 06187 Guadajira, Badajoz.

<sup>2</sup>Departamento de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Av. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

**Palabras clave:** autopolinización, crecimiento de tubo polínico, callosa, microscopía de fluorescencia, alelos de incompatibilidad, *Prunus salicina*

### Resumen

El sistema de autoincompatibilidad presente en el ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.) es de tipo gametofítico y está controlado genéticamente por un locus llamado *S*, que presenta dos genes que determinan el fenotipo del polen (*SFB*) y del pistilo (*S-RNasa*). Durante la reacción de incompatibilidad, el crecimiento de los tubos polínicos es inhibido en el estilo cuando estos expresan el mismo haplotipo *S* que el estilo, lo que impide su llegada al ovario y por tanto la fecundación. La mayoría de las variedades de ciruelo japonés son autoincompatibles y necesitan variedades polinizadoras compatibles y coincidentes en floración para que se produzca la fecundación. Sin embargo, también se han descrito algunas variedades autocompatibles. El carácter de autocompatibilidad inicialmente se asoció a la presencia del haplotipo *Se*, pero recientemente se han descrito otras posibles fuentes de autocompatibilidad asociadas a los haplotipos *Sb*, *St* y *Sg*. La información disponible hasta la fecha no es concluyente y no permite predecir con fiabilidad si una variedad de ciruelo japonés es autocompatible a partir de su genotipo *S*. Esto hace que sea necesario evaluar fenotípicamente el carácter de autocompatibilidad de cada variedad para determinar sus necesidades de polinización. En este trabajo se ha evaluado el fenotipo de autocompatibilidad de un grupo de variedades no estudiadas hasta ahora, incluyendo algunas de reciente introducción, mediante la observación al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas. Adicionalmente, se ha determinado el genotipo *S* de cada variedad mediante marcadores moleculares para determinar si presentan algún haplotipo asociado a la autocompatibilidad.

### INTRODUCCIÓN

El sistema de autoincompatibilidad presente en el ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.) es de tipo gametofítico (De Nettancourt, 2001) y está controlado genéticamente por un locus llamado *S*, que presenta dos genes que determinan el fenotipo del polen (*SFB*) y del pistilo (*S-RNasa*) (Kao y Tsukamoto, 2004). Durante la reacción de incompatibilidad, el crecimiento de los tubos polínicos es inhibido en el estilo cuando estos expresan el mismo haplotipo *S* que el estilo, lo que impide su llegada al ovario y por tanto la fecundación (De Nettancourt, 2001). La mayoría de variedades de ciruelo japonés son autoincompatibles (Okie y Weinberger, 1996; Okie, 2006; Rodrigo y Guerra, 2014) y necesitan variedades polinizadoras compatibles y coincidentes en floración para que se produzca la fecundación.

También se han descrito algunas variedades autocompatibles. En ciruelo japonés, el carácter de autocompatibilidad inicialmente se asoció a la presencia en el genotipo del

haplotipo *Se* en ‘Santa Rosa’ y ‘Beauty’ (Beppu et al., 2005), pero recientemente se han descrito otras posibles fuentes de autocompatibilidad asociadas a los haplotipos *Sb* en ‘Nubiana’ y ‘Zanzi Sun’ (Guerra et al., 2009; Beppu et al., 2012), *St* en ‘Karari’ y *Sg* en ‘Methley’ (Beppu et al., 2012). Se ha sugerido que la autocompatibilidad del haplotipo *Se* se debe a la insuficiente acumulación de *Se-RNasa* en el pistilo debido a una baja transcripción de la misma (Watari et al., 2007). En los haplotipos *Sb* y *Sg*, la autocompatibilidad se ha asociado a una pérdida de la funcionalidad del polen para ser reconocido por el pistilo, pero que no está asociada a una mutación en los genes que lo controlan (*SFBs*) ni a la inhibición de la transcripción de los mismos (Beppu et al., 2012). La información disponible hasta la fecha no es concluyente y no permite predecir con fiabilidad si una variedad de ciruelo japonés es autocompatible a partir de su haplotipo *S*. Esto hace que sea necesario evaluar fenotípicamente el carácter de autocompatibilidad de cada variedad para determinar sus necesidades de polinización (Rodrigo y Guerra, 2014). En este trabajo se ha evaluado el fenotipo de autocompatibilidad de un grupo de nuevas variedades.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha determinado el fenotipo de autocompatibilidad en 11 nuevas variedades de ciruelo japonés (Tabla 1) mediante la observación al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas. Se recogieron 30-35 flores de cada variedad en estado de botón globoso, que fueron emasculadas y colocadas sobre espuma de florista húmeda a temperatura ambiente en el laboratorio. Las anteras de las flores emasculadas se usaron para la obtención del polen, las anteras dehiscentes se colaron con una malla fina. Transcurridas 24 h de la emasculación de las flores se polinizaron los pistilos con su propio polen y 72 h después fueron fijados en ácido acético:alcohol (1:3) y almacenados a 4°C. Para su observación al microscopio, los pistilos se lavaron tres veces con agua destilada y una con sulfito sódico al 5 % a 4 °C, se autoclavaron durante 8 minutos a 121 °C y 1 atm, y se montaron en *squash* con azul de anilina 1 % (v/v) en fosfato potásico 0,1 N para teñir la callosa (Linskens y Esser, 1957). Se consideraron variedades autoincompatibles aquellas en las que los tubos polínicos se detuvieron sin alcanzar la base del estilo y variedades autocompatibles aquellas que presentaron tubos polínicos en la base del estilo.

Se determinó el genotipo *S* de cada variedad mediante marcadores moleculares. Se recogieron hojas jóvenes de cada variedad y se procedió a la extracción de su ADN mediante Kits de extracción de ADN (Biotools). Se amplificó el ADN mediante técnicas de PCR, siguiendo el método descrito en Guerra et al. (2009) usando dos pares de cebadores distintos de *SRNasa* (PaConsIF-PaConsIR2 y PruT2-PaConsIR). Tras la amplificación del material genético, éste fue revelado mediante electroforesis en geles de acrilamida usando un secuenciador automático LI-COR SAGA 4300.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las once variedades evaluadas, nueve no presentaron tubos polínicos en la base del estilo en ninguna de las flores autopolinizadas y fueron consideradas autoincompatibles, mientras que las otras dos variedades, African Rose y Souvenir, presentaron tubos polínicos en el ovario en más de la mitad de los pistilos autopolinizados, por lo que fueron consideradas autocompatibles (Tabla 1). Las dos variedades autocompatibles presentaron en su genotipo el alelo *Se* asociado a autocompatibilidad en otras variedades (Beppu et al., 2005; Guerra et al., 2009). Sin embargo, este alelo también se ha detectado en variedades autoincompatibles, en cuatro de las estudiadas en este trabajo (African Delight, African Pride, John W., Primetime, y Sapphire) y en otras como Black Diamond y Earliqueen (Guerra et al., 2010) y Black Gold, Black Star y

Champion (Guerra, 2011). Recientemente se han descrito otras posibles fuentes de autocompatibilidad asociadas a los haplotipos *Sb*, *St* y *Sg* (Guerra et al., 2009; Beppu et al., 2012), pero no todas las variedades descritas con los alelos *Se*, *Sb* y *Sg* parecen ser autocompatibles (Guerra et al., 2009; 2012). Esto hace que en la actualidad la identificación del haplotipo *S* no permita predecir con fiabilidad si una variedad de ciruelo japonés es autocompatible y siga siendo necesario evaluar el fenotipo del carácter para determinar la autocompatibilidad.

### Agradecimientos

Agradecemos a Juan Orero (Orero Trading S.A) por el suministro de material vegetal. Este trabajo ha sido financiado por MINECO-FEDER (AGL2009-12621-C02-00), el Gobierno de Extremadura (LOI\_1502039 y LOI\_1502038) y el Gobierno de Aragón (Grupo de investigación A-43).

### Referencias

- Beppu, K., Komatsu, N., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Tao, R. and Kataoka, I. 2005. *S<sup>c</sup>*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 80: 760-764.
- Beppu, K., Kumai, M., Yamane, H., Tao, R. and Kataoka, I. 2012. Molecular and genetic analyses of *S*-haplotype of the self compatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) ‘Methley’. *J. Hort. Sci. Biotech.* 87: 493-498.
- De Nettancourt. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin.
- Guerra, M.E. 2011. Polinización y cuajado en ciruelo japonés. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura, Badajoz.
- Guerra, M.E., López-Corrales, M., and Wünsch, A. 2012. Improved *S* genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum. *Euphytica.* 186: 445-452.
- Guerra, M.E., Rodrigo, J., López-Corrales, M. and 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., Wunsch, A., Lopez-Corrales, M., and Rodrigo, J. 2010. Flower emasculation as the cause for lack fruit set in Japanese plum crosses. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 135: 556-562.
- Kao, T. and Tsukamoto, T. 2004. The molecular and genetic bases of *S*-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell.* 15: S72-S83.
- Linskens H.F. and Esser, K. 1957. Ubereinspezifische Anfärbung der Pollen-shläuche und die Zählkallosaproptennachselbstung und fremdung. *Naturwiss.* 44:16.
- Okie W. R. 2006. *Prunus domestica* (European plum) and *Prunus salicina* (Japanese plum). pp. 694-705. In: *The Encyclopedia of Fruit and Nuts.* Cambridge University press. Cambridge (U.K).
- Okie, W. R. and Weinberger, J.H. 1996. Plums. pp. 559-607. En: J. Janick and J.N. Moore (eds), *Fruit Breeding. I: Tree and tropical fruits.* J. Wiley and Sons, New York.
- Rodrigo, J. y Guerra, M.E. 2014. El cerezo y el ciruelo. *La fruticultura del S.XXI.* Ed. Cajamar. pp. 107-123. Almería.
- Watari, A., Hanada, T., Yamane, H., Esumi, T., Tao, R., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Beppu, K. and Kataoka, I. 2007. A low transcriptional level of *Se*-RNase in the *Se*-haplotype confers self-incompatibility in Japanese plum. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 132: 396-406.

Tabla 1. Variedades de ciruelo japonés, porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo y genotipo *S* de incompatibilidad.

<b>Variedades</b>	<b>Pistilos con tubos polínicos en la base del estilo (%)</b>	<b>Genotipo <i>S</i></b>
African Delight	0	<i>SeSh</i>
African Pride	0	<i>SeSh</i>
African Rose	50	<i>SbSe</i>
Hiromi Red	0	<i>SbSh</i>
John W	0	<i>SeSh</i>
Owen T	0	<i>SbSh</i>
Primetime	0	<i>SeSf</i>
Royal Diamond	0	<i>ScSh</i>
Sapphire	0	<i>SbSe</i>
Souvenir	71	<i>SeSh</i>
Sundew	0	<i>SbSh</i>