ITEA (2001), Vol. 97V N.° 3, 226-232

DISEÑO DE CRUZAMIENTOS EN ALMENDRO PARA MEJORA POR AUTOCOMPATIBILIDAD UTILIZANDO RIBONUCLEASAS ESTILARES

M. López, M. Mnejja, M.A. Romero, F.J. Vargas, I. Batlle

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Centre de Mas Bové, Departament d'Arboricultura Mediterrània, Apartat 415, E-43280 Reus, España

RESUMEN

La utilización de los genotipos *S* de auto-incompatibilidad en la mejora genética del almendro para autocompatibilidad es una herramienta muy útil, ya que mediante el diseño de los cruzamientos se pueden obtener descendencias 100% autocompatibles, empleando un parental masculino autocompatible y un parental femenino que posea un alelo en común con él. Por lo tanto, la elección adecuada del sentido de cruzamiento es fundamental para obtener descendencias autocompatibles. En este trabajo se presentan los resultados de dos cruzamientos entre cultivares que poseen un alelo S_1 en común, siendo uno de los parentales autocompatible. Se comparan los resultados de autocompatibilidad obtenidos en individuos derivados de los cruzamientos 'Masbovera' (S_1S_9) x 'Genco' (S_1S_f) y 'Falsa Barese' (S_1S_f) x 'Desmayo Largueta' (S_1S_5). De cada cruzamiento, 31 y 54 individuos respectivamente fueron embolsados en campo en la época de floración para determinar el porcentaje de cuajado de frutos posterior a su autopolinización. Todos los individuos fueron también analizados en laboratorio para ribonucleasas estilares y los zimogramas obtenidos fueron interpretados. Los resultados de campo mostraron que cerca de un 100% de los individuos del cruzamiento 'Masbovera' x 'Genco' son autocompatibles tal y como estaba previsto, y sólo alrededor de un 50% de los individuos del cruzamiento 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' son autocompatibles. Las proteínas estilares fueron extraídas y separadas electroforéticamente mediante electro-enfoque en gradiente de pH no equilibrado, y los geles de poliacrilamida fueron teñidos para actividad ribonucleasa, revelando que todos los individuos del cruzamiento 'Masbovera' x 'Genco' y alrededor de un 50% de los individuos del cruzamiento 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' poseen el alelo S_f. Aunque ambas progenies dieron descendientes autocompatibles, el diseño apropiado del sentido de cruzamiento y la elección de los parentales doblan la obtención de individuos autocompatibles.

Palabras clave: Almendro, *Prunus dulcis*, Autocompatibilidad, Mejora, Alelos *S*, Cuajado, Electroforesis, Ribonucleasas.

SUMMARY

CROSS DESIGN FOR SELF-COMPATIBILITY IN ALMOND BREEDING USING STYLAR RIBONUCLEASES

The use of the incompatibility *S* genotype in almond breeding for self-compatibility is an useful tool as 100% of self-compatible seedlings can be obtained by cross design, using the self-compatible parent as male and having the female parent one allele in common. Thus choosing the crossing side is essential to raise all self-compatible seedlings. In this work the results of two crosses between cultivars having one S_1 allele in common and

being one of the parents self-compatible are reported. Results of self-compatibility in seedlings derived from these crosses, 'Masbovera' (S_1S_9) x 'Genco' (S_1S_f) and 'Falsa Barese' (S_1S_f) x 'Desmayo Largueta' (S_1S_5), are compared. Thirty-one and 54 seedlings from each cross respectively were bagged in the field at flowering time to determine fruit set after selfing. All the seedlings were also analysed in the laboratory for stylar ribonucleases and zymograms were observed. Field results showed that almost 100% of the seedlings derived from 'Masbovera' x 'Genco' are self-compatible as predicted and only about 50% of the seedlings derived from the cross 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' are self-compatible. Stylar protein were extracted and separated electrophoretically using non-equilibrium pH gradient electrofocusing (NEPHGE), and the polyacrylamide gels stained for ribonuclease activity revealing that all seedlings from 'Masbovera' x 'Genco' carry the S_f allele and only about the 50% of the seedlings from 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' are carrying the S_f allele. Both progenies gave self-compatible seedlings although cross design could improve by doubling their yield choosing suitable parental combinations.

Key words: Almond, *Prunus dulcis*, Self-compatibility, Breeding, *S* alleles, Fruit set, Electrophoresis, Ribonucleases.

Introducción

El almendro es una especie auto-incompatible y el programa de mejora genética del IRTA tiene como objetivo obtener cultivares autocompatibles con un buen nivel de autogamia (VARGAS *et al.*, 1998). De esta forma, las nuevas plantaciones no requerirían dos o más cultivares con época de floración coincidente, se reduciría la dependencia en las abejas para asegurar la cosecha y la recolección se vería facilitada al asegurar la misma época de maduración y el mismo tipo de almendra. En el género *Prunus*, la autocompatibilidad es controlada por el gen multialélico *S* con expresión gametofítica (CRANE y BROWN, 1937; CRANE y LAWRENCE, 1947; LEWIS y CROWE, 1954). Una selección de almendro comercialmente interesante debería disponer de un porcentaje de cuajado de frutos y una calidad de fruto similares después de auto o inter-polinización (KESTER y ASAY, 1975). Como el alelo compatible (S_f) es dominante sobre los otros, la descendencia puede heredar la autocompatibilidad (SOCIAS I COMPANY y FELIPE, 1977; GRASSELLY *et al.*, 1981).

Desde 1993 los cruzamientos de almendro en el IRTA Mas Bové se planifican considerando los genotipos *S* de los parentales. Utilizando la información obtenida por el análisis de las RNasas estilares sobre el genotipo *S* de los parentales es posible diseñar cruzamientos para obtener toda la descendencia autocompatible (BATLLE *et al.*, 1997).

Se han analizado las RNasas estilares de los individuos de dos progenies derivadas de parentales con un alelo en común, de las cuales una segrega para autocompatibilidad, y se han comparado los resultados con el porcentaje de cuajado posterior al embolsamiento para la identificación de individuos autocompatibles.

Materiales y métodos

Se han estudiado dos progenies derivadas de cruzamientos semicompatibles realizados en el IRTA Mas Bové. El cruzamiento 'Falsa Barese' (S_1S_f) x 'Desmayo Largueta' (S_1S_5) se realizó en 1993 desconociendo los

genotipos *S* de los parentales y dio 54 individuos, de los cuales la mitad deberían ser autocompatibles. El cruzamiento 'Masbovera' (S_1S_9) x 'Genco' (S_1S_f), realizado en 1997 conociendo los genotipos *S* de los parentales, dio 31 individuos, los cuales deberían ser autocompatibles.

La evaluación en campo de los individuos para la autocompatibilidad se realizó durante dos años (2000 y 2001). Para la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' existe información adicional de cuajado de frutos de los 3 años anteriores (1997-1999). Para la familia 'Masbovera' x 'Genco' sólo 4 individuos disponían de datos de cuajado en campo de dos años. Para evaluar la autocompatibilidad en campo, se embolsaron como mínimo 100 flores por individuo. El conteo de frutos cuajados se realizó 40 días después de la plena floración y antes de la caída natural de frutos (GRASSELLY *et al.*, 1981). Aquellos individuos que mostraron un porcentaje de cuajado superior al 4% se consideraron autocompatibles en campo. Este nivel de cuajado está normalmente aceptado en la mayoría de programas de mejora de almendro, siendo dependiente de las condiciones climáticas.

Todos los individuos de ambas familias fueron analizados para actividad ribonucleasa para conocer su genotipo *S*. De las flores recogidas en estado D, se cortaron los estilos, incluyendo los estigmas. También se recogieron los estilos de los parentales. Para la extracción de proteínas estilares se siguió el método establecido por BOŠKOVIĆ *et al.* (1997).

Las proteínas estilares se separaron electroforéticamente en geles verticales de poliacrilamida (aparato de electroforesis CBS, DASG-400). La separación electroforética siguió las condiciones NEPHGE descritas por BOŠKOVIĆ *et al.* (1997 y 1999), y comprendían 1h a 150 V, 2h a 300 V y 2h a 400 V. La tinción de los geles para actividad ribonucleasa siguió BOŠKOVIĆ *et al.* (1997). Los alelos de incompatibilidad se asociaron a las bandas principales visibles en los zimogramas.

Resultados

Evaluación en campo de la autocompatibilidad: Cuajado de frutos

Para la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta', 33 de los 54 individuos analizados (61,1%) se consideraron autocompatibles en campo (cuadro 1). El porcentaje de cuajado de 32 individuos autocompatibles fue superior al 8%, valor que podría ser considerado como umbral de un bajo nivel de autogamia. Únicamente un individuo mostró un nivel de cuajado cercano al 4%. De los individuos restantes, 21 (38,8%) presentaron un cuajado inferior al 4%, y 4 de ellos manifestaron un porcentaje inferior al 3%. Las diferencias entre los ratios esperados y los observados en campo no fueron significativas con $p > 0,05$ ($\chi^2 = 1,5$, 1 gl).

Para la familia 'Masbovera' x 'Genco', se calcularon los porcentajes de cuajado de frutos en los 31 individuos (cuadro 1). Aunque todos los individuos deberían ser autocompatibles, 2 de ellos se comportaron como auto-incompatibles en campo. Sin embargo, dichos individuos sólo disponían de datos de campo del año 2001, y en ese año se produjeron heladas durante la época de floración (4 horas registradas a menos de 0 °C), que afectaron a las yemas de flor. Todos los individuos mostraron más de un 4% de cuajado en el año 2000, por lo que se consideraron todos autocompatibles tal y como se esperaba. El porcentaje de cuajado

Cuadro 1. Resultados de cuajado en campo de las familias 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' y 'Masbovera' x 'Genco' obtenidas en el IRTA Mas Bové
Table 1. Field results of fruit set for 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' and 'Masbovera' x 'Genco' progenies raised at IRTA Mas Bové

Cruzamiento	Número individuos	Individuos Autocompatibles (Número y %)		Individuos Auto-incompatibles (Número y %)		χ^2 (1 gl)
		Observados	Esperados	Observados	Esperados	
'Falsa Barese' x 'D. Largueta'	54	33* (61,1%)	27 (50%)	21 (38,8%)	27 (50%)	1,50
'Masbovera' x 'Genco'	31	29 (93,5%)	31 (100%)	2 (6,4%)	0 (0%)	—

(*) incluye los dos individuos determinados como S_1S_f.
Se especifica el número de individuos observados en cada clase (autocompatibles y auto-incompatibles) y el porcentaje correspondiente sobre el total de individuos. Los ratios observados para la familia segregante 'Falsa Barese' x 'D. Largueta' no son significativamente diferentes a los esperados con $P = 0,05$.

de los 29 individuos autocompatibles fue superior al 6%, siendo en 27 de ellos superior al 8%. Sin embargo, la mayoría de estos 29 individuos (48,2%) manifestaron un nivel de autogamia medio (entre el 10 y el 20% de cuajado).

Evaluación de la autocompatibilidad en laboratorio: RNasas estilares

Las figuras 1 y 2 muestran los zimogramas de algunos individuos de las dos familias analizadas. En el centro de los geles se



Figura 1. Segregación de ribonucleasas estilares en la familia 'Falsa Barese' (S_1S_f) x 'Desmayo Largueta' (S_1S_5). Ambos parentales son escaleras representando los alelos S_1 y S_5. Los genotipos de la descendencia son S_1S_5 y S_5S_f. La actividad RNasa se aprecia después de aplicar las condiciones de migración NEPHGE y del revelado.

Figure 1. Segregation of the stylar ribonucleases in the almond progeny 'Falsa Barese' (S_1S_f) *x 'Desmayo Largueta'* (S_1S_5). *Both parents are ladders representing* S_1 *and* S_5 *alleles. Seedling genotypes are* S_1S_5 *and* S_5S_f. *RNase activity is shown after running NEPHGE migration conditions and staining.*

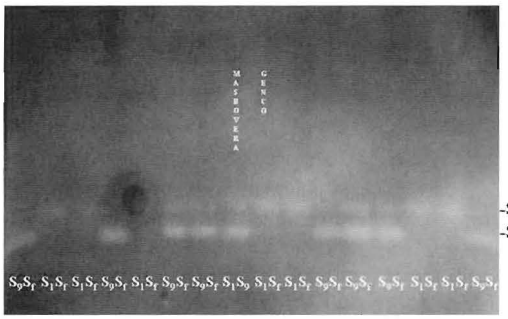


Figura 2. Segregación de ribonucleasas estilares en la familia 'Masbovera' (S_1S_9) x 'Genco' (S_1S_f). Ambos parentales son escaleras representando los alelos S_1 y S_9. Los genotipos de la descendencia son S_1S_f y S_9S_f. La actividad RNasa se aprecia después de aplicar las condiciones de migración NEPHGE y del revelado.

Figure 2. Segregation of stylar ribonucleases in the almond progeny 'Masbovera' (S_1S_9) *x 'Genco'* (S_1S_f). *Both parents are ladders representing* S_1 *and* S_9 *alleles. Seedling genotypes are* S_1S_f *and* S_9S_f. *RNase activity is shown after running NEPHGE migration conditions and staining.*

cargaron muestras de los parentales para indicar la posición de las bandas que debían diferenciarse en las descendencias (S_1 y S_5 para la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta', y S_1 y S_9 para la familia 'Masbovera' x 'Genco').

'Falsa Barese', parental autocompatible determinado como S_1S_f, mostró la banda S_1. 'Desmayo Largueta', determinado como S_1S_5, mostró las dos bandas S_1 y S_5. Los zimogramas mostraban 2 tipos de patrones de bandas. Algunos individuos mostraban 2 bandas, correspondientes a los alelos S_1 y S_5 (considerados auto-incompatibles) y otros una única banda, correspondiente al alelo S_5 (considerados autocompatibles). La banda correspondiente al alelo S_f aparece como ausencia de actividad en almendro (Boškovic *et al.*, 1997) y este hecho fue confirmado en este trabajo.

'Masbovera', parental auto-incompatible determinado como S_1S_9, mostró las dos bandas S_1 y S_9. 'Genco', parental autocompatible determinado como S_1S_f, mostró la banda S_1. Todos los individuos mostraron una única banda, correspondiente a S_1 o S_9, y por tanto todos se consideraron auto-compatibles como se esperaba. Igualmente se confirmó que el alelo S_f se detecta en almendro como ausencia de actividad.

Los resultados de RNasas para ambas familias se presentan en el cuadro 2. En la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta', 30 individuos (55,5%) revelaron sólo una banda (genotipo S_5S_f) y se consideraron genotípicamente autocompatibles. Además, ofrecieron más de un 3% de frutos cuajados cuando fueron embolsados en campo. Sin embargo, 2 individuos (3,7%) mostraron el genotipo no esperado S_1S_f. Los 22 individuos restantes (40,7%) eran S_1S_5, por lo que se consideraron auto-incompatibles. De ellos, 21 mostraron un cuajado inferior al 3%. El otro individuo mostró un cuajado cercano al 4%. Por tanto, del ratio observado 22 S_1S_5 : 30 S_5S_f : (2 S_1S_f), sólo las dos primeras clases corresponden a la segregación 1:1 esperada ($\chi^2 = 0,94$, 1 gl). Para la familia 'Masbovera' x 'Genco', la segrega-

Cuadro 2. Resultados de análisis de RNasas en laboratorio de las familias 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' y 'Masbovera' x 'Genco' obtenidas en el IRTA Mas Bové
Table 2. Laboratory results of RNase analysis for 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' and 'Masbovera' x 'Genco' progenies raised at IRTA Mas Bové

Cruzamiento	Número individuos	Genotipo *S* (parentales)	Ratio esperado	Genotipo *S* observado (descendencia)	χ^2
'Falsa Barese' x 'D. Largueta'	54	S_1S_f x S_1S_5	1:1	22 S_1S_5 : 30 S_5S_f : (2 S_1S_f)	0,94
'Masbovera' x 'Genco'	31	S_1S_9 x S_1S_f	1:1	10 S_1S_f : 21 S_9S_f	3,22

Se especifica el número de individuos analizados y los genotipos *S* de los parentales. Se muestran los ratios esperados para el genotipo *S* de ambas descendencias, para contrastarlos con los resultados experimentales. Los ratios observados para ambas familias no son significativamente diferentes a los esperados con p = 0,05.

ción observada, 10 S_1S_f: 21 S_9S_f, se ajusta a la segregación teórica 1:1 (χ^2 = 3,22, 1 gl).

Discusión

La comparación de los zimogramas con los datos de cuajado de frutos indica que la mayoría de los individuos que muestran una única banda fueron autocompatibles en campo. Para la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta', se obtuvieron porcentajes similares de individuos autocompatibles (55-60%) y auto-incompatibles (40-45%) en campo con ambas técnicas. Los datos de cuajado en campo y los genotipos *S* de laboratorio concordaron en un 98,1% de los casos. El único caso de discordancia correspondió a un individuo autocompatible en campo (4,0% cuajado) que presentó un genotipo auto-incompatible.

El análisis de ribonucleasas muestra claramente que el cruzamiento semicompatible 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta' segregó para 2 genotipos (S_1S_5 y S_5S_f). En trabajos anteriores ya se han mencionado ratios de segregación similares (50% autocompatibles, 50% auto-incompatibles) en progenies de cruzamientos con un parental autocompatible (SOCIAS I COMPANY, 1984; JRAIDI y NEFZI, 1988). El cruzamiento semicompatible 'Masbovera' x 'Genco' también segregó para 2 clases genotípicas, siendo ambas autocompatibles ya que el parental masculino era el autocompatible y con un alelo en común con el femenino.

En la familia 'Falsa Barese' x 'Desmayo Largueta', 2 individuos revelaron el genotipo S_1S_f, que parecen resultar de una autopolinización de 'Falsa Barese' después de una imperfecta emasculación. De la familia 'Masbovera' x 'Genco', 2 individuos que dieron menos de un 4% de cuajado revelaron genotipos autocompatibles. Por tanto, podrían clasificarse como autocompatibles pero no autógamos, o dejarlos sin clasificar debido a los daños por helada.

Los resultados obtenidos manifiestan también que los genotipos del análisis de ribonu-

cleasas pueden utilizarse para obtener descendencias 100% autocompatibles mediante la realización de cruzamientos semicompatibles S_xS_v x S_xS_f (GRASSELLY *et al.*, 1985; DICENTA y GARCÍA, 1993) tal y como fue indicado por primera vez en cerezo (WILLIAMS y BROWN, 1960). Este análisis también puede emplearse para determinar qué individuos son autocompatibles en descendencias segregantes. Las 5 flores suficientes para este análisis se pueden recoger en árboles de tan sólo 2 o 3 años. Por tanto, esta técnica puede llevarse a cabo como método de selección precoz para rechazar aquellos individuos que carezcan del alelo S_f. Sin embargo, este análisis únicamente indica la autocompatibilidad genética, y la autogamia debe comprobarse posteriormente en campo.

Agradecimientos

La financiación de este trabajo proviene del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agroalimentarias del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través de dos proyectos INIA (SC97-049 y RTA01-081). Mercè López y Mourad Mnejja agradecen sus becas del Programa de Postgraduado del Ministerio de Ciencia y Tecnología y del Programa de Master del CIHEAM-IAMZ, respectivamente.

Bibliografía

BATLLE I., BALLESTER J., BOŠKOVIĆ R., ROMERO M.A., TOBUTT K.R., VARGAS F.J., 1997. Use of stylar ribonucleases in almond breeding to design crosses and select self-compatible seedlings. Nucis 6: 12-14.

BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., BATLLE I., DUVAL H., 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. Euphytica 97: 167-176.

BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., DUVAL H., BATLLE I., DICENTA F., VARGAS F.J., 1999. A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. Theor. Appl. Genet. 99: 800-810.

CRANE M.B., BROWN A.G., 1937. Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. J. Pomol. Hortic. Sci. 15: 80-116.

CRANE M.B., LAWRENCE W.J.C., 1947. The genetics of garden plants. Macmillan. London. XVII + 301 pp.

DICENTA F., GARCÍA J.E., 1993. Inheritance of self-compatibility in almond. Heredity 70: 313-317.

GRASSELLY C., CROSSA-RAYNAUD P., OLIVIER G., 1985. Récents progrès dans l'amélioration génétique de l'amandier. 5ième Colloque recherches fruitières, Bordeaux, 13-14 Nov. pp. 141-155.

GRASSELLY C., CROSSA-RAYNAUD P., OLIVIER G., GALL H., 1981. Transmission du caractère d'autocompatibilité chez l'amandier (*Amygdalus communis*). Options Méditerr. CIHEAM/IAMZ 81/I: 71-75.

JRAIDI B., NEFZI A., 1988. Transmission de l'autocompatibilité chez l'amandier. VII Coll. GREMPA, Rap. EUR 11557: 47-57.

KESTER D.E., ASAY R., 1975. Almonds. pp: 387-419. En: J. Janick y J. N. Moore (eds.). Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN.

LEWIS D., CROWE L.K., 1954. Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus avium* L. Heredity 8(3): 357-363.

SOCIAS I COMPANY R., 1984. A genetic approach to the transmission of self compatibility in almond (*Prunus amygdalus* Batsch). Options Mediterr. CIHEAM-IAMZ 84/II: 123-127.

SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J., 1977. La polinización del almendro. Centro Regional de Investigación y Desarrollo Agrario del Ebro. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Zaragoza. 29 pp.

VARGAS F.J., CLAVÉ J., ROMERO M., BATLLE I., ROVIRA M., 1998. Autogamy studies on almond progenies. Acta Hortic. 470: 74-81.

WILLIAMS W., BROWN A.G., 1960. Breeding new varieties of fruit trees. Endeavour 19: 147-155.