ITEA (2003), Vol. 99V N.° 1, 157-164

SELECCIÓN DE NUEVOS PATRONES PARA PERAL: CRIBADO *IN VITRO* Y EVALUACIÓN EN CAMPO PARA TOLERANCIA A CLOROSIS FÉRRICA

R. Dolcet-Sanjuan*, E. Claveria*, J. Bonany, I. Iglesias***, L. Asín***, M.H. Simard******

* Departament de Genètica Vegetal, IRTA, Centre de Cabrils, Ctra. de Cabrils s/n, 08348 Cabrils, Barcelona, España

** Estació Experimental Agrícola Mas Badia, 17134 La Tallada, Girona, España

*** Estació Experimental de Lleida, IRTA, Rovira Roure 177, 28196 Lleida, España

**** INRA, Unité d'Amélioration des Espèces Fruitières et Ornementales, BP57, 49071 Beaucouzé Cedex, Francia

e-mail: ramon.dolcet@irta.es

RESUMEN

Se han realizado cruzamientos con una nueva selección del INRA, el patrón de peral 'Pyriam', y cuatro especies "mediterráneas" de *Pyrus*: *P. communis cordata, P. amygdaliformis, P. a. persica,* y *P. elaeagrifolia*. Se ha aplicado un ensayo *in vitro* para evaluar la tolerancia a la clorosis férrica. Se diseccionaron los embriones del fruto y se cultivaron en un medio basal para asegurar el desarrollo apropiado de la plántula. Una semana después, las plántulas con raíces y hojas emergentes de los cotiledones se transfirieron a un puente de papel en un frasco Magenta con un medio líquido con 2µM Fe^{3+}DTPA y 10mM $NaHCO_3$. Después de dos semanas de cultivo se observaron diferentes niveles de clorosis sobre las hojas de nueva formación. Todas las plantas evaluadas se aclimataron, mantuvieron en invernadero y transplantaron a un campo con un suelo arcillo-limoso con un 26% de equivalente de carbonato cálcico. Se midió dos veces el contenido total en clorofila de cada plantón, durante la primavera de 2000 y 2001, y una vez después del injerto con 'Conference', durante el otoño de 2001. No se observó una buena correlación entre las condiciones *in vitro* y de campo sobre el nivel de tolerancia de cada plantón. Sin embargo, se encontró una buena correlación al comparar los cruzamientos híbridos. La tolerancia *in vitro* a la deficiencia de hierro fue semejante a la tolerancia conocida de cada especie de *Pyrus,* siendo *P. amygdaliformis, P. amygdaliformis persica,* y *P. communis cordata* las más tolerantes. Los resultados también confirman una buena correlación entre la evaluación de plántulas *in vitro* para su tolerancia a condiciones de deficiencia en hierro y la tolerancia a la clorosis inducida en campo de plantas injertadas. Para resolver la falta de correlación al nivel del plantón individual, los próximos ensayos contemplan la clonación *in vitro* de cada individuo antes de la prueba *in vitro*. La propagación *in vitro* de algunos clones en selección previa fue satisfactoria.

Palabras clave: *Pyrus*, Clorosis férrica, Selección, *in vitro*.

SUMMARY

SELECTION FOR NEW PEAR ROOTSTOCKS: *IN VITRO* SCREENING AND FIELD EVALUATION FOR TOLERANCE TO IRON CHLOROSIS

Crosses have been done between the new INRA pear rootstock selection 'Pyriam' and four "Mediterranean" *Pyrus* species: *P. communis cordata, P. amygdaliformis, P. a. persica,* and *P. elaeagrifolia.* An *in vitro* test, to evaluate tolerance to lime-induced chlorosis has been applied to these progenies. Embryos were dissected out of fruits and cultured in a basal medium to ensure proper plantlet development. One week later, plantlets with roots and leaves emerging out of the cotyledons, were transferred to a paper bridge in a Magenta flask containing a liquid medium with 2µM Fe^{3+}DTPA and 10mM $NaHCO_3$. After two weeks of culture, different levels of iron deficiency chlorosis, on the newly formed leaves, were observed. All evaluated plants were acclimated, grown in the greenhouse and transferred to a field plot with a clay loam soil with 26% of calcium carbonate equivalent. Total chlorophyll content of each seedling was measure twice, during spring of 2000 and 2001, and once after grafting with 'Conference', during fall of 2001. No good correlation between *in vitro* and field conditions was observed at the individual seedling level of tolerance. However a good correlation was found comparing hybrid crosses. The *in vitro* tolerance to iron deficiency was similar to the known differential tolerance of each *Pyrus* species. Being *P. amygdaliformis, P. amygdaliformis persica,* and *P. communis cordata* the most tolerant. The results also confirm a good correlation between *in vitro* seedling evaluation for tolerance to iron deficiency conditions and field tolerance of grafted plants to lime induced chlorosis. To solve the lack of correlation at the individual seedling level the next assays contemplate *in vitro* cloning of each individual prior to the *in vitro* test. *In vitro* propagation of some preliminarily selected clones was satisfactory.

Key words: *Pyrus*, Lime induced chlorosis, Selection, *in vitro*.

Introducción

Tradicionalmente los cultivares de peral se han injertado sobre francos y clones de *Pyrus communis* (en Francia OHF 333 entre otros) o sobre clones de *Cydonia oblonga.* Mientras que el primer tipo de patrones es compatible con todos los cultivares y presenta un buen crecimiento en suelos calizos, con algunos clones (la serie OHF y 'Pyriam') tolerantes a fuego bacteriano, su vigor excesivo lo hace poco recomendable. El membrillero se utiliza extensamente en Europa como patrón clonal enanizante para peral y es particularmente importante en plantaciones de alta densidad. Sin embargo, el membrillero es incompatible con algunos cultivares de peral y es sensible a la baja absorción del hierro, resultando en clorosis en las hojas, un problema importante en las regiones de cultivo del peral en suelos calizos, caracterizados por un elevado pH. Para mejorar el comportamiento del membrillero como patrón, se han intentado seleccionar genotipos con mayor eficiencia férrica. La mejora por la aplicación de la biotecnología, como la selección de variantes somaclonales con eficiencia férrica mejorada (Bunnag *et al.*, 1996) o la transformación con genes implicados en la absorción del hierro (Samuelsen *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2001), ha resultado útil. El presente trabajo

ha utilizado un sistema de selección *in vitro* para tolerancia a la clorosis férrica en un programa de mejora, con el objetivo de determinar la correlación a nivel individual y al de la progenie entre el ensayo *in vitro* y la evaluación en campo para tolerancia a la clorosis férrica. El programa de mejora de patrones para peral incluye cruzamientos entre la nueva selección de patrón del INRA 'Pyriam' y cuatro especies "mediterráneas" de *Pyrus*: *P. communis cordata, P. amygdaliformis, P. a. persica,* y *P. elaeagrifolia,* que se conocen por su tolerancia a la clorosis férrica, la sequía, los veranos calurosos y suelo arenoso así como a plagas y enfermedades (LOMBARD y WESTWOOD, 1987).

Material y métodos

El material vegetal para este trabajo tiene su origen en el programa de mejora genética de patrones de peral iniciado en 1998, en colaboración entre el INRA y el IRTA, para aumentar la tolerancia a la clorosis férrica. Los cruzamientos se han realizado entre el nuevo patrón de peral del INRA 'Pyriam' (P2395) y cuatro especies "mediterráneas" de *Pyrus*: *P. communis cordata* (P256), *P. amygdaliformis* (P257), *P. a. persica* (P264), y *P. elaeagrifolia* (P1588). Semillas de *P. communis* 'Williams' (P415) y *Cydonia oblonga* BA29 autopolinizados se utilizaron como testigos del ensayo. Los frutos se recogieron en su momento de madurez y se almacenaron en frío hasta que se extrajeron los embriones.

El ensayo aplicado *in vitro* a estas descendencias para evaluar la tolerancia a la clorosis férrica se basó en resultados previos descritos por DOLCET-SANJUAN *et al.* (1992) y CHANEY *et al.* (1992). En concreto, los frutos se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% (v/v), se pelaron y los embriones se extrajeron de las semillas en condiciones estériles. Durante las dos primeras semanas de crecimiento, los embriones se cultivaron en placas de Petri con un medio MS modificado (MURASHIGE y SKOOG, 1962), descrito por DOLCET-SANJUAN *et al.* (1992) pero sin N^6-benziladenina (BAP). Las plántulas con raíces y cotiledones verdes desarrollados se transfirieron durante dos semanas a frascos con el mismo medio, pero privado de hierro (Fe^{2+}EDTA). Los cultivos se mantuvieron a 28°C con un fotoperíodo de 16 h (35 a 75 $\mu Em^{-2}s^{-1}$). Las plántulas con un buen sistema radicular y dos a tres hojas verdaderas se utilizaron para el ensayo *in vitro* de tolerancia a la clorosis férrica. Las condiciones de deficiencia en Fe se consiguieron por el paso de cada planta a un frasco Magenta® con un soporte de papel de filtro (SCHLEICHER & SCHUELL), lo que permitió mantener la planta sobre el medio líquido (fig. 1A). La composición del medio líquido fue la descrita por CHANEY *et al.* (1992), para el cribado por sensibilidad a la clorosis, con 10mM $NaHCO_3$ y 2μM Fe^{3+}DTPA. El medio líquido se cambió en días alternos. El pH de la solución varió entre 8,0 y 8,5. Los cultivos se mantuvieron a 28 °C y a un fotoperíodo de 16 h (210 $\mu Em^{-2}s^{-1}$), durante 3 semanas. La clorofila total se determinó en las cuatro hojas expandidas superiores de cada planta, con un medidor de clorofila Minolta SPAD-502. Las lecturas de SPAD se correlacionan linealmente con la clorofila extraída (MARQUARD y TIPTON, 1987). Este ensayo se diseñó para cuantificar la tolerancia individual de cada plantón a la clorosis férrica.

Como el ensayo se realizó en condiciones estériles, el ápice de cada plántula se pudo transferir a un medio de multiplicación de brotes (DOLCET-SANJUAN *et al.*, 1992), evaluar todas las plantas aclimatadas, cultivarlas en invernadero (fig. 1B), y trans-



Figura 1A. Ensayo *in vitro* para tolerancia a la clorosis férrica.
Figure 1A. In vitro *test for tolerance to iron chlorosis.*



Figura 1B. Plantas aclimatadas después del ensayo *in vitro*.
Figure 1B. Acclimated plants after in vitro *test.*



Figura 1C. Evaluación en campo de patrones después de ser injertados.
Figure 1C. Field evaluation of rootstocks after grafting.



Figura 1D. Micropropagación de un patrón seleccionado.
Figure 1D. Micropropagation of a selected rootstock.

plantarlas a un campo con un suelo arcillo-limoso con un 26% de equivalente de carbonato cálcico, 10% de caliza activa, y un pH de 8,1 (fig. 1C). El campo se estableció en enero del 2000, en la Estación Experimental de Lleida (finca de Gimenells). Cada planta se colocó junto al patrón membrillero BA29 que sirvió de referencia para la evaluación de la clorosis. Los árboles se injertaron con 'Conference' durante la primavera de 2001. Las lecturas de SPAD de los patrones se realizaron durante la primavera de 2000 y se repitieron de nuevo en la primavera de 2001, justo antes del injerto de los árboles. Las lecturas de SPAD de la clorosis férrica sobre las hojas del cultivar se repitieron durante el otoño de 2001.

Resultados y discusión

Al comparar los distintos cruzamientos (fig. 2 y 3), la tolerancia *in vitro* a la deficiencia en hierro esta relacionada a la diferente tolerancia de cada especie de *Pyrus,* como se cita en la bibliografía (LOMBARD y WESTWOOD, 1987). Las plantas más tolerantes a la clorosis férrica proceden del cruzamiento 'Pyriam' x *P. amygdaliformis* (P257), seguidas por *P. communis cordata* (P256), y *P. amygdaliformis persica* (P264). Al comparar las descendencias (fig. 2), los resultados confirman una buena correlación entre la evaluación *in vitro* de la tolerancia a las condiciones de deficiencia en hierro y la tolerancia en campo a la clorosis férrica de plantas sin

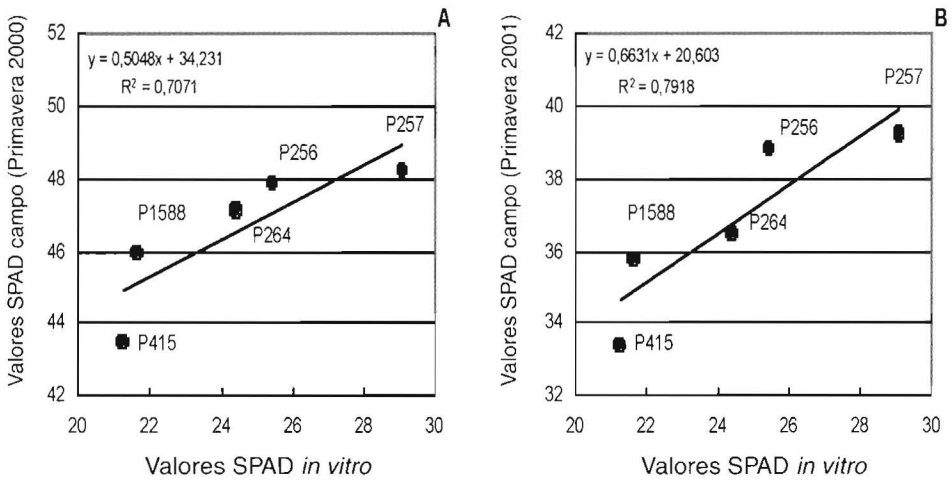


Figura 2. Correlación entre los niveles medios de clorofila (valores SPAD) de los patrones de cada cruzamiento después del ensayo de tolerancia *in vitro* a la clorosis férrica y los niveles medios de clorofila durante el primer (A) y el segundo (B) año de crecimiento en un suelo calizo.

Figure 2. Correlation between the average chlorophyll levels (SPAD values) of the rootstocks in each cross given after the in vitro *test for tolerance to iron chlorosis and the average chlorophyll levels during the (A) first and (B) second season of growth in a calcareous soil.*

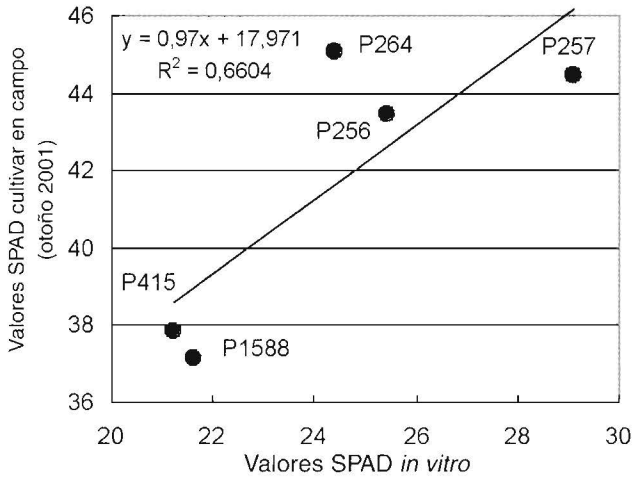


Figura 3. Correlación entre los niveles medios de clorofila (valores SPAD) de los patrones de cada cruzamiento después del ensayo de tolerancia *in vitro* a la clorosis férrica y los niveles medios de clorofila del cultivar 'Conference' injertado sobre cada individuo, durante el segundo año de crecimiento en un suelo calizo.

Figure 3. Correlation between the average chlorophyll levels (SPAD values) of the rootstocks in each cross given after the in vitro *test for tolerance to iron chlorosis and the average chlorophyll levels of the scion 'Conference' grafted on each individual, during the second season of growth in a calcareous soil.*

injertar. Sin embargo, no hubo una buena correlación de la tolerancia a nivel individual de cada planta (fig. 4). Para solucionarlo, los próximos ensayos contemplan el clonado *in vitro* de cada individuo antes de realizar el ensayo *in vitro* de tolerancia.

La tolerancia relativa de las plantas a la clorosis férrica, medida por las lecturas de SPAD (fig. 2) es comparable al de las plantas cuando se utilizan como patrones injertados con 'Conference' (fig. 3). Aunque la tolerancia relativa a la clorosis férrica entre las plantas híbridas se mantiene después de su injertado con 'Conference, las lecturas SPAD son mayores en las plantas injertadas que en las sin injertar (fig. 5). Esta relación se invierte con el membrillero BA29 como patrón, lo que podría explicarse por cierta incompatibilidad con el cultivar 'Conference'. Otra explicación podría ser que antes de injertar con 'Conference', las lecturas SPAD se llevan a cabo sobre hojas de especies distintas, lo que introduce otra fuente de variabilidad, mientras que después del injerto las lecturas son mucho más comparables ya que se llevan a cabo sobre hojas de un único cultivar.

La micropropagación de alguno clones seleccionados después de las primeras observaciones (fig. 1D) ha resultado en unas buenas tasas de multiplicación (6 a 19) y porcentajes de enraizamiento (50 a 90%), lo que además garantiza la propagación de los clones seleccionados. Plantas de los patrones clonales selectos se han aclimatado para su evaluación en campo. Un ensayo adicional para la adaptabilidad a la propagación convencional y la tolerancia al fuego bacteriano se va a llevar a cabo en Francia.

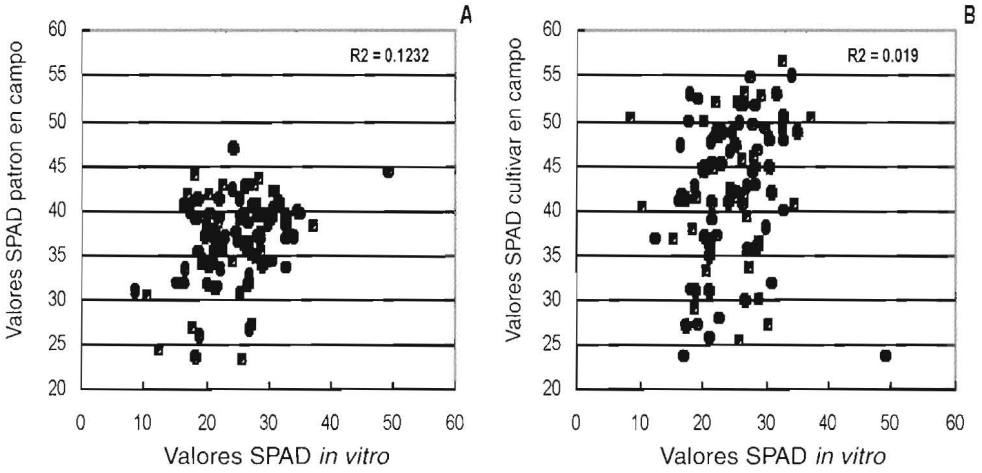


Figura 4. Correlación entre los niveles individuales de clorofila (valores SPAD) después del ensayo de tolerancia *in vitro* a la clorosis férrica y durante el segundo año de crecimiento en un suelo calizo de los patrones (A) y del cultivar 'Conference' (B) injertado sobre cada individuo.

Figure 4. Correlation between the individual chlorophyll levels (SPAD values) given after the in vitro *test for tolerance to iron chlorosis and during the second season of growth in a calcareous soil of (A) the rootstocks and (B) the scion 'Conference' grafted on each individual.*

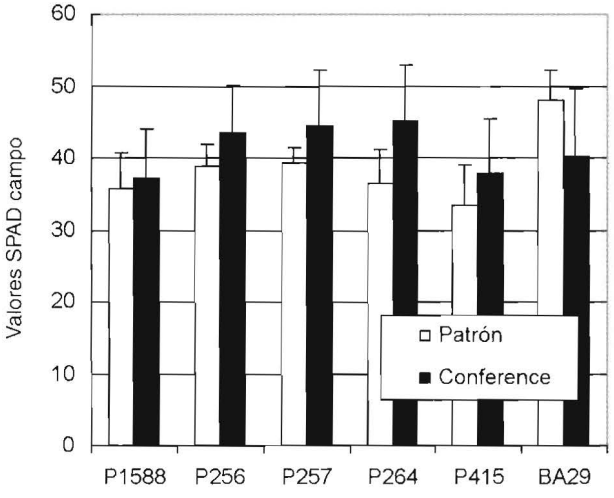


Figura 5. Niveles medios de clorofila (valores SPAD), durante el segundo año de crecimiento en un suelo calizo, de los patrones de cada cruzamiento y el cultivar 'Conference' injertado sobre ellos.

Figure 5. Average chlorophyll levels (SPAD values), during the second season of growth in a calcareous soil, of the rootstocks in each cross and the scion 'Conference' grafted on them.

Agradecimientos

Trabajo financiado por un programa de colaboración en investigación entre INRA – IRTA.

Bibliografía

BUNNAG S., DOLCET-SANJUAN R., MOK D.W.S., MOK M.C., 1996. Responses of two somaclonal variants of quince (Cydonia oblonga) to iron deficiency in the greenhouse and field. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 121: 1054-1058.

CHANEY R.L., COULOMBE B.A., BELL P.F., ANGLE J.S., 1992. Detailed method to screen dicot cultivars for resistance to Fe-chlorosis using FeDTPA and bicarbonate in nutrient solutions. J. Plant Nutr. 15(10): 2063-2083.

DOLCET-SANJUAN, R., MOK D.W.S., MOK M.C., 1992. Characterization and in vitro selection for iron efficiency in Pyrus and Cydonia. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 28P: 25-29.

LOMBARD P.B., WESTWOOD M.N., 1987. Pear rootstocks. En: Rootstocks for fruits crops (C.R. Rom y R.F. Carlson, eds.), pp. 145-183.

MARQUARD R.D., TIPTON J.L., 1987. Relationship between extractable chlorophyll and an in situ method to estimate leaf greenness. HortScience 22(6): 1327.

SAMUELSEN A.I., MARTIN R.C., MOK D.W.S., MOK M.C., 1998. Expression of the yeast FRE genes in transgenic tobacco. Plant Physiol. 118: 51-58.

TAKAHASHI M., NAKANISHI H., KAWASAKI S., NISHIZAWA N.K., MORI S., 2001. Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. Nature Biotechnol. 19: 466-469.