ITEA (2003), Vol. 99V N.° 2, 208-213

CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE ALMENDRO (*Prunus amigdalus* Batsch) MEDIANTE EL POLIMORFISMO ENZIMÁTICO

H.A. Altube, R.S. Rivata, M.G. Ontivero-Urquiza, R.J. Taborda

Departamento de Producción Vegetal: Fruticultura.
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba.
Casilla de Correo 509. (5000) Córdoba. Argentina.
e-mail: healtube@agro.uncor.edu

RESUMEN

La caracterización de variedades de almendro (*Prunus amígdalus* Batsch) se realiza tradicionalmente mediante las descripciones pomológicas y más recientemente se han introducido las caracterizaciones bioquímicas, particularmente las basadas en el polimorfismo isoenzimático. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización de 11 variedades de almendro mediante el polimorfismo isoenzimático de peroxidasas, catecol, oxidasas y esterasas. Se muestrearon tallos en período de reposo y se conservaron a < 20 °C hasta el momento del procesado. La separación electroforética se realizó en gel de acrilamida al 10%. Las isoenzimas estudiadas presentaron diferente grado de polimorfismo. Las peroxidasas permitieron caracterizar los cultivares Ferragnes, Peerless y AI; las catecol oxidasas Tuono y Emilito y las esterasas Ferragnes, Marcona, Ruby y Ferraduel quedando los demás cultivares reagrupados en diferentes modelos.

Palabras clave: Caracterización, Electroforesis, Variabilidad, Polimorfismo, Isoenzimas.

SUMMARY
CHARACTERIZATION OF ALMOND VARIETIES (*Prunus amigdalus* Batsch) THROUGH POLIMORPIC ISOZYME

Charactirization of almond varieties is traditionally done by pomological descriptors. Recently, biochemical characterization techniques, particularly those based on isoenzimatic polymorphism, have been introduced. The objective of this work was the characterization of 11 almond varieties thtough isoenzimatic polymorphism of peroxidase, catecol oxidase and esterase systems. Plant material was taken from stems and was kept at < 20 °C before analysis. Electrophoresis analysis was performed in acrylamide gel at 10%. Enzymes showed different polymorphism degrees. Peroxidase enzymes allowed the characterization of Ferragnes, Peerless and Al varieties~ Tuono and Emilito cultivars were characterized by catecol oxidase and Ferragnes, Marcona, Ruby y Ferraduel by esterase. The remaining cultivars were grouped in different models.

Key words: Characterization, Electrophoresis, Variability, Isozymes.

Introducción

El almendro es una de las Prunoideas cultivadas en Argentina desde hace mucho tiempo, con una producción que no satisface las necesidades del mercado interno, recurriéndose a la importación.

El moderno cultivo de la especie requiere material vegetal de alta calidad viverística, tanto por su sanidad como por la identidad genética. La metodología para la caracterización e identificación de las variedades de los frutales desde el punto de vista legal se basa en el estudio de los caracteres pomológicos (morfológicos, agronómicos). La UPOV (Unión para la Protección de las obtenciones Vegetales) ha elaborado una serie de descriptores para la algunas de las especies cultivadas y entre ellas varios frutales, basadas en la descripción de ramas, hojas, flores y frutos. Estos caracteres han permitido la identificación de numerosas variedades de frutales (BARRET y RODES, 1976; GUARDIOLA *et al.*, 1977; DELLA STRADA *et al.*, 1989).

Las variedades de almendro son numerosas, por ello la elaboración de una clasificación pomológica sistemática más o menos compleja resulta difícil (SAURA CALIXTO *et al.*, 1988), se complica aún más el trabajo por el hecho de no ser posible una clasificación dicotómica como ocurre en otras especies cuyos caracteres son monofactoriales (GRASSELLI, 1972). Los caracteres que se tienen en cuenta para una caracterización morfológica de variedades de almendro son: características del árbol, floración, cuajado de fruto, tamaño y forma del fruto, rendimiento, dureza de la cáscara, presencia de pepitas dobles y resistencia al frío. Resulta difícil encontrar escalas objetivas para estos caracteres, con el fin de poder comparar los resultados, contamos con la sugerida por BERENGUER (1972).

La multiplicidad de caracteres que pueden definir las variedades hace que todas las clasificaciones basadas en un único carácter sean parciales (SAURA CALIXTO *et al.*, 1988). Un criterio diferenciador puede ser la época de floración y se clasifican en: tempranas, medias y tardías (SAURA CALIXTO *et al.*, 1988).

También pueden clasificarse según el sabor dulce o amargo de la pepita, dureza de la cáscara (SAURA CALIXTO) y en función del contenido de aceites (CARRANTE Y CUCURACHI, 1966; PANDELLE, 1966).

Es difícil la identificación de variedades debido a las similitudes de las mismas. Por ello existe un gran interés en las caracterizaciones bioquímicas mediante las isoenzimas. La separación electroforética, en geles de acrilamida de enzimas, es una técnica utilizada en horticultura desde los trabajos de PIERCE y BREWBAGUER (1973). En almendro las isoenzimas han sido utilizadas en estudios genéticos (ARÚS *et al.*, 1994; VIRUEL *et al.*, 1995; ARUS, 1996; JOOBEUR *et al.*, 1998). El almendro presentó una gran variabilidad genética (HUAUGGE *et al.*, 1987 a-b). El polimorfismo isoenzimático permitió comparar cultivares australianos y californianos (VEZVAEI *et al.*, 1994) y en general diferentes materiales genéticos (BYRNE, 1989-90). Se han identificado híbridos de duraznero x almendros Nompareil (CHAPARRO *et al.*, 1987). El objetivo del presente trabajo fue caracterizar cultivares de almendro mediante las isoenzimas peroxidasas, catecol oxidasas y esterasas.

Material y métodos

El material vegetal provino del Huerto Fenológico de la Facultad de Ciencias Agro-

pecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Los cultivares de almendro utilizados en el estudio fueron: 1) Ferragnes, francesa, proveniente del cruzamiento de Cristomorto con Al. 2) Thompson, californiana, descendiente de Texas. 3) Merced, californiana, cruzamiento entre Texas y Non Pareil. 4) Peerless, californiana. 5) Tuono, italiana, origen desconocido. 6) Marcona, española. 7) Ruby, californiana, originada de semilla. 8) Ferraduel, francesa, cruzamiento entre Cristomorto con Al. 9) Emilito, argentina, cruzamiento de Peerless y Non Pareil. 10). Ferralise, francesa, cruzamiento de Ferraduel y Ferragnes. 11) Al, francesa.

Se muestrearon tallos en período de reposo y conservaron a < 20 °C hasta el momento del procesado. La extracción de las isoenzimas se realizó macerando 1 g de tejido con 3cc de tampón de extracción (ARULSEKAR y PARFITT, 1985). La separación electroforética se realizó en gel de acrilamida al 10%, con tampón de electrodos Tris-Glicocola pH 8,6. Las isoenzimas estudiadas fueron: peroxidasas (E.C.1.11.1.7.9), catecol oxidasas (E.C.10.3.1) y esterasas (E.C.13.1.16). Posteriormente se procedió a la tinción de los geles con los métodos tradicionales. (BREWER y SING, 1971).

Resultados y discusión

Las peroxidasas (figura 1) presentan entre ocho y trece bandas. Las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10 y 11 son comunes a todas las variedades; la banda 2 sólo se presenta en Thompson y Merced, la banda 8 en Ferragnes, Tompson, Peerless, Tuono y Marcona; la banda 9 en Ferragnes, Thompson y Merced; la banda 11 en Ferragnes, Thompson, Merced y Peerless y la banda 13 en Ferragnes, Emilito, Ferralise y Al. La combinación de las bandas configuran los siguientes modelos isoenzimáticos: Modelo I con las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con la variedad Ferragnes; modelo II con las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 con

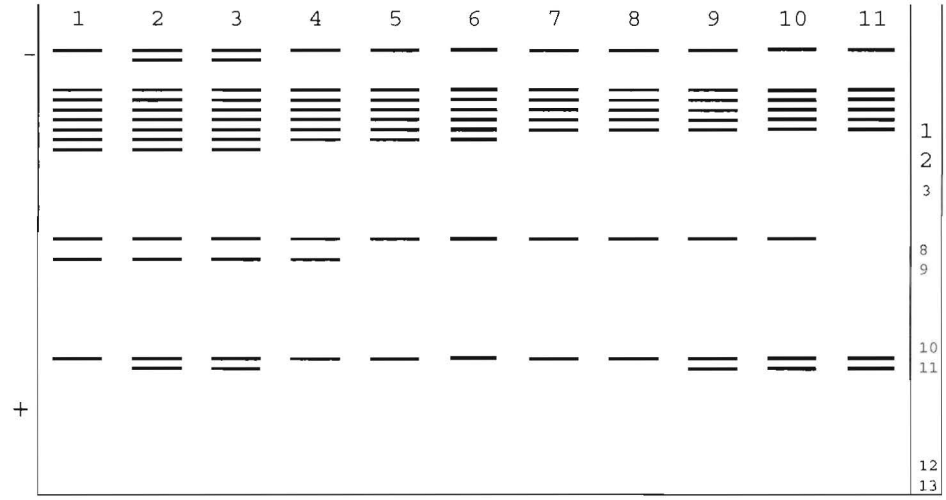


Figura 1. Zimogramas de peroxidasas en las distintas variedades de almendro.

Thompson y Merced; Modelo III con las bandas 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 con Peerless; modelo IV con las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 con Tuono y Marcona; modelo V con las bandas 1, 3, 5, 6, 7, 10 y 12 con Ruby y Ferraduel; el modelo VI con las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 y 13 con variedades Emilito y Ferralise y el modelo VII con las bandas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 12 y 13 con Al. Los modelos I, III y VII permiten caracterizar las variedades Ferragnes, Peerless y Al respectivamente; quedando las demás reagrupadas en los modelos II, IV y VI con dos variedades cada uno.

Las catecol oxidasas (figura 2) presentan entre cuatro y doce bandas. Las bandas 1, 2, 6 y 9 están presentes en todas las variedades; la banda 3 en Thompson y Merced; la banda 4 en Thompson, Merced, Emilito, Ferrralise y Al; la banda 5 en Emilito, Ferralise y Al; la banda 7 en Ferragnes, Thompson, Merced, Peerless y Tuono; la banda 8 en Ferragnes, Thompson, Merced, Peerless, Emilito, Ferralise y Al; la banda 10 en Emilito, Ferralise y Al y las bandas 11 y 12 sólo en Emilito. Las distintas bandas configuran diversos modelos isoenzimáticos: modelo I con las bandas 1, 2, 3, 6, 7, 8 y 9 con Ferragnes y Peerless; modelo II con las bandas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 9 con Thompson y Merced; el modelo III con las bandas 1, 2, 6, 7, y 9 con Tuono; modelo IV con las bandas 1, 2, 6, y 9 con Marcona, Ruby y Ferraduel; modelo V con las bandas 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 con Emilito y el modelo VI con las bandas 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, y 10 con Ferralise y Al. Los modelos III y V caracterizan las variedades Tuono y Emilito respectivamente; quedando el resto reagrupadas en los modelos isoenzimáticos I, II y IV con dos y tres variedades cada uno.

Las esterasas (figura 3) presentan entre cuatro y doce bandas. Las bandas 3, 4, 10 y 11 están presentes en todas las variedades; las bandas 1, 2, 5, 7, 8 y 9 están presentes sólo en Ferragnes; la banda 6 en Ferragnes, Marcona, Ruby y Ferraduel; la banda 7 en Ferragnes, Marcona y Ruby y la banda 12 en Ferragnes y Marcona. La combinación de bandas forman diferentes modelos isoenzimáticos: modelo I con las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 con Ferragnes;

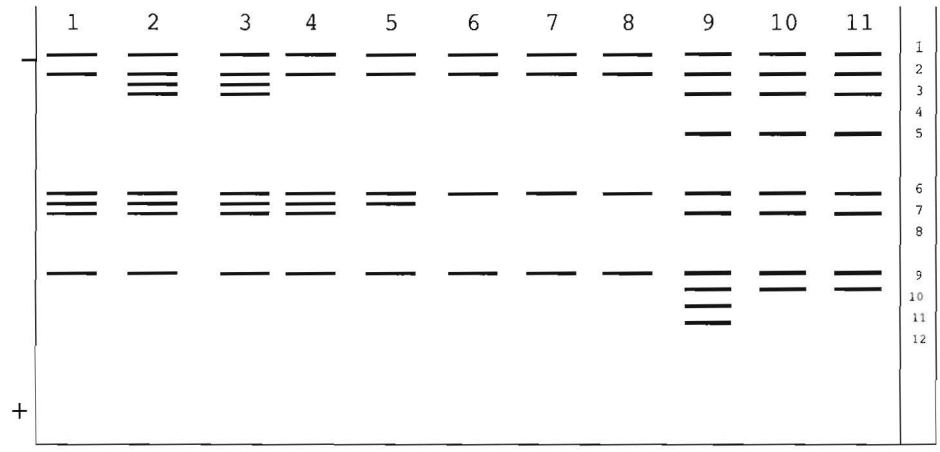


Figura 2. Zimogramas de catecol oxidasas en las distintas variedades de almendro.

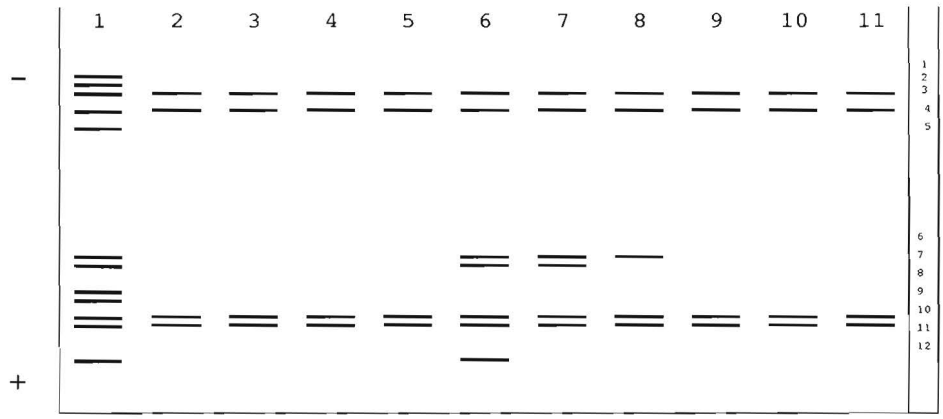


Figura 3. Zimogramas de esterasas en las distintas variedades de almendro.

modelo II con las bandas 3, 4, 10 y 11 con Thompson, Merced, Peerless, Tuono, Emilito, Ferralise y Al; el modelo III con las bandas 3, 4, 6, 7, 10, 11 y 12 con Marcona; el modelo IV con las bandas 3, 4, 6, 7, 10, 11 y 12 con Ruby y el modelo V con las bandas 2, 4, 6, 10, 11 con Ferraduel. Los modelos I, II, IV y V caracterizan las variedades Ferragnes, Marcona, Ruby y Ferraduel; quedando el resto reagrupadas en el modelo II con siete variedades.

Conclusiones

La potencialidad ofrecida por los marcadores bioquímicos en las distintas especies frutales demuestra ampliamente que se pueden agregar, a las tradicionales descripciones pomológicas o taxonómicas de los genotipos cultivados, metodologías basadas en descriptores de sistemas enzimáticos. Estos sistemas presentan posibilidades de difusión por ser poco costosos, simples, pero limitados por presentar menores capacidades discriminatorias. Las distintas isoenzimas estudiadas presentaron diferente grado de polimorfismo, pero no lo suficiente para distinguir un gran número de variedades. Las peroxidasas permitieron caracterizar las variedades Ferragnes, Peerless y Al, las demás quedaron reagrupados en los tres modelos restantes con dos variedades cada uno. Las catecol oxidasas caracterizaron las variedades Tuono y Emilito, las otras quedaron reagrupados en los tres modelos restantes con dos y tres variedades cada uno. Las esterasas caracterizaron las variedades Ferragnes, Marcona, Ruby y Ferraduel, quedando el resto reagrupadas en un modelo. Los reagrupamientos de variedades son difíciles de interpretar. Con el fin de lograr mayores niveles discriminatorios en futuros trabajos se deberían probar las isoenzimas AAT, GPI, LAP, PGM, IDH y SKDH. Del estudio surge que el análisis isoenzimático es una técnica válida para efectuar agrupamientos varietales, dentro de los cuales investigar con métodos de mayor resolución como RFLP, PCR y RADPs, técnicas de biología molecular que investigan una número mayor de locus genéticos, permitiendo la identificación de distintas variedades, hasta eventuales mutantes clonales de ellas.

Bibliografía

ARULSEKAR S., PARFITT D.E., 1986. Isoenzymes analysis procedure for some fruits: almonds, grape, walnut, pistachio and fig. Hort Science 21: 928-932.

ARÚS P., 1996. Developping tools a more efficient fruit breeding. The European *Prunus* mapping proyet. Nucis 5: 6-8.

ARÚS P., OLARTE C., ROMERO M., VARGAS F.J., 1994. Linkaje analysys often isoenzyme genes in Fl segregation almond progenies. *I.* Amer. Soc. Hort. Sci., 119: 339-344.

BERENGUER T., 1972. Caracteres de interés para la selección de variedades de almendra. I:A:M:Z. España.

BYRNE D.H., 1989. Electrophoretic variability in four diploid stone fruits. Acta Horticulturae 254: 29-34.

BYRNE D.H., 1990. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared whith other perennial plants. J. Her 81 (1): 68-71.

BREWER G.J., SING C.F., 1971. Introduction to isozyme techniques. New York. Acad. Press. 186.

CARRANTE V., CUCURAC M.A., 1966. Andamento de la inoliazione, caratteristiche chimicofisiche e composizione acidica dell'olio di mardorle Pugliese. Prima Giornata del Mandorlo. Bari. Italia.

GRASSELLY C., CROSSA-RAYNAUD C., 1984. El Almendro. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 461.

HUAUGGE R., KESTER D.E., SAYRA A., 1987a. Isozyme variation among California almond cultivars: I Inheritance. J. Amer. Soc. Hort. Sc. 112: 687-693.

HUAUGGE R., KESTER D.E., ARULSEKAR S., PARFITT D.E., LM L., 1987b. Isozyme variation among California almond cultivar. II Cultivar characterization and origins. J.Amer. Soc. Hort. Sci 112 (4): 693-698.

JOOBEUR T., VLRUEL M.A., DE VICENTE M.C., JAUREGUI B., BALLESTER J., DETTORI M.T., VERDE I., TRUCO M.J., MESSEGUER R., BATTLE I., QUART A.R., DIRIENWANGER E., ARÚS P.P., 1998. Construction o a sturated marker linkage map *for Prunus* suing an almond x peach F2 progenie. Theor. App. Genet. (submitted).

PANDELLE I., 1966. Le caracteres biochimiques des principales varietés de noix demandes et de noissettes de la République de Rumanie et I' etablissement de correlátion métaboliques générales. Inst. Ceerc. Hort. Vit. Lucra. Stiint, T.9.

SAURA CALIXTO F., CAÑELLAS MUT J., SOLER L., 1988. La almendra. Composición, variedades, desarrollo y maduración. Ministerio de Agricultura Pesca y alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. España. 173 p.

VEZVAEI A., CLARKE G.R., JACKSON J.F., 1994. Characterization of australian almond cultivars and comparation with californian cultivar by isoenzymes polimorfism. Aust. J. Exp. Agr. 34: 511-514.

VLRUEL M.A., MESSEGUER R., DE VICENTE M.C., GARCIA MASS J., PUIDDOMENECH P., VARGAS F.J., ARÚS P., 1995. Alinkage map with RPLF and isozyme maters for almond. Theor. App. Gen. 91: 964-971.

(Aceptado para publicación el 25 de mayo de 2003).