

TESIS DOCTORAL

Efecto de la consanguinidad sobre la expresión
y la transmisión de la autocompatibilidad
en el almendro (*Prunus amygdalus* Batsch)

José Manuel Alonso Segura
2004



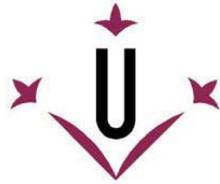
Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agraria



Universidad de Lleida



**GOBIERNO
DE ARAGON**
Departamento de Ciencia, Tecnología
y Universidad



Universitat de Lleida



**Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària de Lleida**

Departament d'Hortofructicultura Botànica i Jardineria

TESIS DOCTORAL

**Efecto de la consanguinidad sobre la expresión
y la transmisión de la autocompatibilidad
en el almendro (*Prunus amygdalus* Batsch)**

DOCTORANDO:

**José Manuel Alonso Segura
Ingeniero Agrónomo**

DIRECTOR:

**Rafael Socias i Company
Dr. Ingeniero Agrónomo**

TUTOR:

**Valero Urbina Vallejo
Dr. Ingeniero Agrónomo**

Zaragoza, Marzo de 2004

REALIZADA EN LA UNIDAD DE FRUTICULTURA DEL CITA



A mi familia y a Mónica.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuído, de manera diversa, a la realización de esta Memoria.

En especial, al Dr. Rafael Socias i Company, por la dirección de esta Tesis Doctoral, la coordinación de todos los ensayos y la ayuda prestada durante estos cuatro años de trabajo. Gracias por el tiempo que has dedicado en mi formación, el apoyo logístico y los consejos, académicos y humanos, que me ayudaron a superar los momentos difíciles.

De igual modo, quiero agradecer al Dr. Valero Urbina su cordial disposición durante la tutela de esta Tesis, así como sus consejos y las correcciones realizadas a los textos presentados en la universidad.

Al Dr. Ignasi Battle y a D. Francisco Vargas, por enseñarme la técnica para la identificación las S-RNasas, durante mi estancia en el departamento de Arboricultura Mediterránea del centro IRTA-Mas Bové. Gracias a Mercè y Mourad por su colaboración y compartir las intrigas de esta técnica conmigo.

Al Dr. Thomas Gradziel, por su amable acogida en su laboratorio en el "Department of Pomology" de la Universidad de California en Davis y al Dr. Pedro Martínez-Gómez por enseñarme la aplicación de la técnica PCR en la identificación de los alelos S en el almendro. Gracias Pedro, por tu generosidad al compartir desinteresadamente tus conocimientos con los demás, virtud que escasea mucho en estos tiempos.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), y al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA-GA), por la financiación aportada durante la realización de esta tesis doctoral.

A los proyectos de investigación CICYT AGF98-0211-C03-01, CICYT AGL2001-1054-C03-02, INIA RF02-001 y CONSID P066/2000, dentro de los cuales se han realizado los trabajos que se presentan en esta tesis doctoral.

Agradecer su amabilidad a todos los integrantes de la Unidad de Fruticultura y en especial a Amalia Escota, Julio Búbal, José Miguel Ansón, Mayte Espiau, Olga Frontera, Reyes López y Cruz Altariba, por la ayuda prestada en los momentos álgidos durante las floraciones, así como a Jesús Castillo y José Sánchez por mantener las plantas en las mejores condiciones posibles.

A Pilar Bergua, nuestra secretaria, por su ayuda y eficiencia en todas las gestiones administrativas. Buen trabajo.

A mi compañero Ossama Kodad, por sus comentarios, apreciaciones y consejos, así como por su amistad.

A todos mis amigos, en especial a Gabriel, por venirme a buscar todos los días para ir a comer, y a los "de suelos", gracias por hacerme reír un rato todos los días.

Y en especial, a mis nuevos amigos, José Miguel y Mayte, integrantes del "Equipo del almendro", gracias por vuestra disposición para ayudarme en todo momento y por abrirme vuestro corazón.

ÍNDICE

Agradecimientos	V
Índice	VII
Relación de figuras	XI
Relación de cuadros	XIII
Resumen	XVII
Summary	XIX
Resum	XXI
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Descripción del almendro	3
1.1.1 Características botánicas	3
1.1.2 Taxonomía del almendro	4
1.1.3. Origen, evolución y expansión del almendro	5
1.2 Magnitudes del cultivo del almendro.....	8
1.2.1 El cultivo del almendro en el mundo	8
1.2.2- El cultivo del almendro en España	9
1.2.3 El cultivo del almendro en Aragón	11
1.3 El cultivo intensivo del almendro: el camino a seguir para rentabilizar la producción ...	11
1.4 Necesidad de la obtención de material vegetal adaptado.....	14
1.5. La autoincompatibilidad sexual en el reino vegetal.....	17
1.5.1 El sistema de autoincompatibilidad gametofítico	17
1.5.2 El sistema de autoincompatibilidad esporofítico	19
1.5.3 La auto-incompatibilidad heteromórfica	20
1.6 La autoincompatibilidad en el almendro.....	23
1.6.1 La autoincompatibilidad y los grupos de inter-incompatibilidad del almendro	23
1.6.2 La autocompatibilidad en el almendro	24
1.6.3 Fuentes de auto-compatibilidad para el almendro.....	25
1.6.4 La transmisión de la autocompatibilidad y su determinación.....	26
1.7 La endogamia y sus efectos en el almendro.....	28
1.8 Debate sobre la transmisión de la autocompatibilidad en el almendro	30
1.9 Objetivos y estructura de la memoria	33
2. MATERIAL VEGETAL UTILIZADO	35
3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN LAS PROGENIES MEDIANTE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA INTERACCIÓN POLEN-ESTILO	43
3.1. Introducción	45
3.2. Material y Métodos	47
3.2.1 Obtención de las muestras y autopolinización manual	47
3.2.2 Observación microscópica de los tubos polínicos	48
3.2.3 Determinación del nivel de penetración de los tubos polínicos en el tejido estilar..	48
3.3. Resultados.....	50
3.3.1 Fenotipo en función de la cantidad de pistilos con tubos polínicos en la base del estilo	50
3.3.2 Fenotipo en función de la cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo	60
3.4 Discusión	66
3.4.1 Proporciones fenotípicas	67
3.4.2 Información agronómica de la observación de los tubos polínicos.....	70

3.5. Conclusiones	71
4. DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DEL LOCUS S MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS S-RNASAS ESTILARES	73
4.1 Introducción	75
4.1.1 Descubrimiento de las S-RNAsas	75
4.1.2 Características estructurales de las S-RNAsas	76
4.1.3 Correlación de las S-RNAsas con los genotipos de incompatibilidad	78
4.2 Material y métodos	80
4.2.1 Proporciones genotípicas esperadas en el material vegetal	80
4.2.2- Identificación de las S-RNAsas mediante la NEpHGE	81
4.2.2.1 Extracción de las proteínas estilares	81
4.2.2.2 Separación electroforética de las proteínas estilares	81
4.2.2.3 Revelado específico de las RNAsas en geles de poliacrilamida	83
4.3 Resultados obtenidos	83
4.3.1 Puesta a punto de la NEpHGE	83
4.3.2 Interpretación de los zimogramas	84
4.4 Discusión	88
4.5 Conclusiones	89
5. IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO S MEDIANTE MARCADORES DE PCR	91
5.1 Introducción	93
5.2 Material y métodos	96
5.2.1 Material vegetal y extracción del DNA genómico	96
5.2.2 Cuantificación del DNA	97
5.2.3 Aplicación de la técnica PCR	97
5.3 Resultados	98
5.3.1 Estrategia seguida para el conocimiento de los cebadores a utilizar	98
5.3.2 Obtención de los genotipos S mediante la aplicación de la PCR en las familias estudiadas	104
5.3.3 Proporciones genotípicas en las diferentes familias	108
5.3.4 Presencia de individuos autoincompatibles en los que se ha detectado el alelo S_f	110
5.4. Discusión	111
5.4.1 Variación de las frecuencias genotípicas dependiendo del parental masculino autoincompatible	111
5.4.2 La presencia del alelo S_f no siempre implica un fenotipo autocompatible	112
5.4.3 Aplicación de cebadores específicos en la PCR para la identificación de los alelos de autoincompatibilidad	114
5.5 Conclusiones	116
6. ESTUDIO DE LOS INDIVIDUOS CON FENOTIPO NO CONCORDANTE A SU GENOTIPO S	117
6.1 Introducción	119
6.2 Material y métodos	120
6.3 Resultados	120
6.4 Discusión	122
6.5 Conclusiones	124
7. EVALUACIÓN DE LOS CUAJADOS DE RAMAS EMBOLSADAS EN INDIVIDUOS AUTOCOMPATIBLES Y SU RELACIÓN CON LA MORFOLOGÍA FLORAL	127

7.1	Introducción	129
7.2	Material y métodos	131
7.2.1	Obtención de cuajados en ramas embolsadas.....	131
7.2.2	Morfología de la flor.....	133
7.3	Resultados.....	134
7.3.1	Cuajados observados en las ramas embolsadas	134
7.3.2	Morfología de la flor en individuos autocompatibles estudiados.....	135
7.3.3	Relación entre los cuajados observados y la posición de las anteras superiores en relación a la del estigma	136
7.4	Discusión	139
7.5	Conclusiones	142
8.	EL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS SEGÚN LA RELACIÓN DE PARENTESCO CON EL ESTILO.....	143
8.1	Introducción	145
8.2	Material y métodos	147
8.2.1	Material vegetal utilizado	147
8.2.2	Métodos.....	148
8.2.3	Toma de datos y análisis estadístico.....	149
8.3	Resultados.....	150
8.3.1	Influencia del tipo de polinización sobre el crecimiento de los tubos polínicos.....	150
8.3.2	Variabilidad del crecimiento de los tubos polínicos entre los individuos	154
8.3.3	Comparación entre individuos dentro de cada tipo de polinización	155
8.3.4	Estudio del crecimiento de los tubos polínicos en cada individuo	157
8.4	Discusión	158
8.4.1	Influencia del grado de parentesco en la eficiencia de la polinización.....	158
8.4.2	La influencia de los genotipos en el crecimiento de los tubos polínicos	161
8.5	Conclusiones	163
9.	DISCUSIÓN GENERAL	165
9.1	El fenotipo de la autocompatibilidad	167
9.2	Determinación del genotipo del locus S.....	168
9.3	Proporciones genotípicas en las familias estudiadas	170
9.4	Individuos con fenotipo no concordante a su genotipo	171
9.5	Cuajados en ramas embolsadas y morfología floral	172
9.6	Dinámica de los tubos polínicos en polinizaciones de diferente parentesco.....	173
10.	CONCLUSIONES GENERALES	177
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	183
12.	ANEJOS.....	199
ANEJO I	- Protocolo para la técnica electroforética NEpHGE vertical de ribonucleasas estilares(S-RNasas) de almendro	201
ANEJO II	- Protocolo para la aplicación de técnica PCR en la amplificación de los alelos de incompatibilidad y autocompatibilidad.....	205
ANEJO III	- Fenotipo observado y genotipo S de los individuos de las familias estudiadas	217
ANEJO IV	- Información adicional al Apartado 8.....	219

RELACIÓN DE FIGURAS

Fig. 1.1 - Superficie y producción mundial del almendro	9
Fig. 1.2 - Superficie, producción y exportación de almendra española.....	10
Fig. 1.3 - Superficie y producción de almendro en Aragón.....	12
Fig. 1.4 - Sistemas más comunes de autoincompatibilidad.....	21
Fig. 1.5 - Modelos de interacción de incompatibilidad polen-estilo.....	22
Fig. 1.6 - Transmisión de la autocompatibilidad en el almendro.....	27
Fig. 2.1 - Composición alélica de las descendencias estudiadas y genealogía de 'Ferragnès' y 'Ferralise'.....	37
Fig. 2.2 - Detalle de la distancia de plantación y etiquetado del material vegetal estudiado .	38
Fig. 3.1 - Proporciones fenotípicas esperadas en las descendencias.....	47
Fig. 3.2 - Emasculación de las flores.....	49
Fig. 3.3 - Detalle de la colocación de las flores en bandeja.....	49
Fig. 3.4 - Microscopio de fluorescencia.....	49
Fig. 3.5 - Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo.....	56
Fig. 3.6 - Número y porcentaje de individuos autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI) en cada familia.....	57
Fig. 3.7 - Distribución de los individuos en función de la porción de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base de los estilos.....	57
Fig. 3.8 - Distribución de los individuos en función de la cantidad media de tubos polínicos con llegada a base de los estilos.....	65
Fig. 4.1 - Representación esquemática de las regiones conservadas y variables de las S-RNAsas estilares.....	77
Fig. 4.2 - Representación de la estructura cristalina de la S ₃ -RNasa de <i>Pyrus pyrifolia</i>	77
Fig. 4.3 - Proporciones genotípicas esperadas en las descendencias estudiadas.....	80
Fig. 4.4 - Ejemplo de la interpretación de los zimogramas obtenidos tras la NEpHGE II de los extractos estilares y posterior tinción para la actividad RNasa.....	85
Fig. 5.1 - Diagrama esquemático de la reacción PCR.....	94
Fig. 5.2 - Fracción del alineamiento de la secuencia S3 (AF157008) con los cebadores ConF, ConFS ₃ y ConR.....	100
Fig. 5.3 - Pruebas con cebadores ConF/ConR, ConFS ₃ /ConR y 8/2 para la amplificación de los alelos presentes en los individuos de las poblaciones.....	100
Fig. 5.4 - Prueba del funcionamiento de los cebadores con la variedad 'Ferralise'.....	102
Fig. 5.5 - Esquema de las estructuras de los alelos S _f , S ₁ y S ₃	102
Fig. 5.6 - Identificación de los alelos S mediante los cebadores ConF-ConR en individuos 'Ferralise' x 'Tuono'.....	105
Fig. 5.7 - Identificación de los alelos S mediante los cebadores ConF-ConR en individuos 'Tuono' x 'Ferralise'.....	105
Fig. 5.8 - Identificación de la presencia del alelo S ₃ mediante los cebadores S ₃ F-ConR.....	105
Fig. 5.9 - Identificación de la presencia del alelo S _f mediante los cebadores S _f F-S _f R.....	105
Fig. 5.10 - Distribución de los genotipos S en las familias.....	109
Fig. 6.1 - Porción de una rama emasculada para realizar la autopolinización en campo.....	120
Fig. 6.2 - Comportamiento conjunto de los genotipos autoincompatibles fisiológicos.....	122

Fig. 7.1 - Embolsado de ramas en individuos con fenotipo autocompatible	132
Fig. 7.2 - Morfología de la flor	133
Fig. 7.3 - Cuajados obtenidos en ramas embolsadas de individuos autocompatibles	135
Fig. 7.4 - Características generales de los descendientes autocompatibles.....	137
Fig. 7.5 - Variabilidad observada en la morfología floral	138
Fig. 7.6 - Distribución de los cuajados en función de la morfología floral	139
Fig. 8.1 - Colocación de las flores emasculadas del individuo M-2-21 en bandejas por bloques de 60 flores.....	149
Fig. 8.2 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos según el tipo de polinización	151
Fig. 8.3 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos según el individuo	156
Fig. I.1 - Extracción proteica de los estilos	201
Fig. I.2 - Cubeta vertical PROTEAN® II xi Cell de BIO-RAD	202
Fig. I.3 - Montaje de las piezas para la preparación de un gel de poliacrilamida	202
Fig. I.4 - Electroforesis dentro de frigorífico.	203
Fig. II.1 - Programa realizado en el termociclador.	210
Fig. II.2 - Identificación de genotipos S mediante la amplificación de fragmentos de DNA procedentes de los genes S.....	215
Fig. IV.1 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en el conjunto de los tipos de polinización según el genotipo S de los individuos	220
Fig. IV.2 - Evolución de la porción del estilo atravesada (%) por los tubos polínicos en los individuos en los diferentes tipos de polinización	221
Fig. IV.3 - Evolución de la longitud de los tubos polínicos (mm) en los individuos en los diferentes tipos de polinización	222
Fig. IV.4 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'L-3-22', 'L-3-63' y 'M-1-86'	223
Fig. IV.5 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'M-2-01', 'M-2-02' y 'M-2-16'	224
Fig. IV.6 - Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'M-2-21', 'M-2-26' y 'M-2-36'	225
Fig. IV.7 Relación entre la velocidad media de crecimiento de los tubos polínicos y la longitud del pistilo en los individuos.....	226
Fig. IV.8 Relación entre la velocidad media de crecimiento de los tubos polínicos y la longitud del pistilo en las flores.....	227

RELACIÓN DE CUADROS

Cuadro 1.1 - Superficie de almendro, producciones y rendimientos	14
Cuadro 1.2 - Ideotipo de variedad de almendro	16
Cuadro 1.3 - Transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' en sus descendencias con 'Ferragnès' y 'Ferralise'	33
Cuadro 2.1 - Porcentajes de supervivencia respecto a semillas obtenidas en los cruzamientos	38
Cuadro 3.1 - Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès'. Fenotipo asignado según los resultados.....	50
Cuadro 3.2 - Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono'. Fenotipo asignado según los resultados.....	51
Cuadro 3.3 - Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'. Fenotipo asignado según los resultados	52
Cuadro 3.4 - Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Ferralise' x 'Tuono'. Fenotipo asignado según los resultados	53
Cuadro 3.5 - Prueba de Chi-cuadrado de las proporciones fenotípicas y nivel de significación	55
Cuadro 3.6 - Frecuencias de llegada de tubos polínicos a la base de los estilos.....	59
Cuadro 3.7 - Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès'.....	60
Cuadro 3.8 - Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono'.....	61
Cuadro 3.9 - Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'.....	62
Cuadro 3.10 - Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Ferralise' x 'Tuono'.....	63
Cuadro 3.11 - Estadística descriptiva sobre la cantidad media de tubos polínicos en la base de los estilos de los individuos autocompatibles y autoincompatibles..	66
Cuadro 3.12 - Proporciones fenotípicas observadas en las descendencias y cómputo de las mismas	67
Cuadro 4.1 - Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Tuono' (S_1S_1) x 'Ferragnès' (S_1S_3).....	86
Cuadro 4.2 - Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Ferragnès' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_1).....	86
Cuadro 4.3 - Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Tuono' (S_1S_1) x 'Ferralise' (S_1S_3)	87
Cuadro 4.4 - Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Ferralise' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_1)	87
Cuadro 5.1 - Listado de los cebadores obtenidos de las regiones conservadas de las S-RNAs del almendro.....	98
Cuadro 5.2 - Combinaciones de los cebadores para la identificación específica de los alelos S_3 y S_f	101
Cuadro 5.3 - Acciones de las secuencias en base de datos GenBank de NCBI de los alelos S del almendro.....	103

Cuadro 5.4 - Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Tuono' (S_1S_7) x 'Ferragnès' (S_1S_3)	106
Cuadro 5.5 - Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Ferragnès' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_7)	106
Cuadro 5.6 - Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Tuono' (S_1S_7) x 'Ferralise' (S_1S_3).....	107
Cuadro 5.7 - Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Ferralise' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_7).....	107
Cuadro 5.8 - Resumen de la determinación del genotipo S en las distintas familias	110
Cuadro 6.1 - Individuos con fenotipo no acorde a su genotipo en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'	121
Cuadro 6.2 - Individuos con fenotipo no acorde a su genotipo en la familia 'Ferralise' x 'Tuono'	121
Cuadro 8.1 - Individuos estudiados y tratamientos de polinización aplicados	147
Cuadro 8.2 - Velocidad media de los tubos polínicos en cada período para los distintos tratamientos de polinización (mm/h)	153
Cuadro 8.3 - Velocidad media de los tubos polínicos en cada individuo para cada período de recogida de muestras (mm/h).....	155
Cuadro 8.4 - Pistilos con tubos polínicos en la base del estilo en los distintos individuos según el tipo de polinización	157
Cuadro I.1 - Composición del Triton X-100 al 10%	201
Cuadro I.2 - Composición del tampón de extracción por orden de adición	201
Cuadro I.3 - Composición de la solución - gel acrilamida.....	202
Cuadro I.4 - Composición del stock de poli(acrilamida).....	202
Cuadro I.5 - Composición del Persulfato amónico al 10%	202
Cuadro I.6 - Composición de las soluciones tampón de los electrodos	203
Cuadro I.7 - Condiciones de migración NEpHGE II.....	203
Cuadro I.8 - Composición Tampón pH 5,8	204
Cuadro I.9 - Composición solución de RNA	204
Cuadro I.10 - Composición de azul de toluidina	204
Cuadro I.11 - Lista de reactivos utilizados para la NEpHGE	204
Cuadro II.1 - Solución base para el tampón de extracción	207
Cuadro II.2 - Solución del tampón extracción de DNA	207
Cuadro II.3 - Solución de Cloroformo-Isoamil Alcohol.....	208
Cuadro II.4 - Solución de Acetato amónico 5 M	208
Cuadro II.5 - Solución de lavado	208
Cuadro II.6 - Preparación de solución TE	208
Cuadro II.7 - Creación del PCR-MIX	210
Cuadro II.8 - Solución EDTA 0,5M	213
Cuadro II.9 - Tampón concentrado TAE 50X	213
Cuadro II.10 - Lista de productos utilizados para la utilización de la PCR.....	214
Cuadro III.1 - Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Tuono' (S_1S_7) x 'Ferragnès' (S_1S_3) ..	217
Cuadro III.2 - Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Ferragnès' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_7) ..	217
Cuadro III.3 - Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Tuono' (S_1S_7) x 'Ferralise' (S_1S_3).....	217
Cuadro III.4 - Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Ferralise' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_7).....	218
Cuadro IV.1 - Análisis de varianza del crecimiento de los tubos polínicos para cada día de muestreo	219

Cuadro IV.2 - Velocidad media de los tubos polínicos en cada individuo para cada intervalo y tipo de polinización (mm/h)	226
--	-----

RESUMEN

El almendro (*Prunus amygdalus* Batsch), salvo unas pocas excepciones, es una especie alógama y requiere la polinización cruzada para producir semillas. Las condiciones ambientales adversas durante la polinización dificultan el intercambio de polen en las plantaciones bivarietales y, junto con la incidencia de las heladas primaverales, son las causantes de las oscilaciones en la producción de almendra que se registran de año en año. Estas fluctuaciones en la producción pueden ser amortiguadas con el uso de variedades autógamas de floración tardía adaptadas a las distintas zonas de cultivo, explotadas en un sistema de cultivo intensivo con los mismos cuidados que cualquier otro árbol frutal.

La base genética del almendro se ha ido reduciendo poco a poco, primero con la selección empírica y la propagación clonal de las variedades y, más tarde con la utilización de un número reducido de genotipos como parentales en los programas de mejora. Fruto de esta reducción ha sido la aparición de síntomas de consanguinidad en descendencias procedentes de retrocruzamientos, cruzamientos entre hermanos completos, cruzamientos de medios hermanos, así como en descendencias procedentes de autopolinizaciones de variedades autocompatibles.

En este trabajo se ha comprobado que la diferente expresión y transmisión de la autocompatibilidad desde 'Tuono' a sus descendencias obtenidas en los cruzamientos con 'Ferragnès' y 'Ferralise', en los dos sentidos posibles de cruzamiento, se deben a la consanguinidad presente en la variedad 'Ferralise', ya que procede del cruzamiento entre dos hermanas completas, 'Ferraduel' y 'Ferragnès'.

Mediante el estudio del crecimiento de los tubos polínicos tras la autopolinización en laboratorio de los individuos pertenecientes a estas familias, se observó que la consanguinidad que transmite 'Ferralise' a su descendencia afecta negativamente a la proporción de pistilos con tubos polínicos en su base y al número de tubos en la base, en comparación con la calidad de la autocompatibilidad observada en los descendientes de 'Ferragnès'.

Esta consanguinidad se expresa en algunos descendientes genéticamente autocompatibles de 'Ferralise' como la incapacidad de los tubos polínicos propios de llegar con normalidad a la base del estilo, siendo la interacción polen-estilo la causante de la carencia de vigor en estos tubos polínicos, que se traduce en una velocidad menor de su crecimiento e incluso su parada en el último cuarto del estilo, mientras que el comportamiento del polen y de los pistilos de estos individuos en otro tipo de polinizaciones es completamente normal.

Gracias a las nuevas técnicas moleculares que permiten conocer precozmente el genotipo de las descendencias segregantes cuando se dispone de las primeras flores o hojas, fue posible establecer los genotipos en el locus S de los individuos que componen las familias en estudio. El estudio genético permitió señalar la consanguinidad presente en 'Ferralise' como la causa presumible de la desviación de las frecuencias genotípicas del locus S en la descendencia 'Tuono' x 'Ferralise', en la que la presencia de individuos autoincompatibles es mayoritaria, quizás debido a la expresión de genes letales ligados con el alelo Sf que obligarían de forma mayoritaria a la descendencia a una fecundación procedente de una polinización cruzada, como mecanismo para ampliar la heterocigosis y producir descendencias vigorosas.

Al igual que en otras descendencias de 'Tuono' que presentaban consanguinidad, los cuajados obtenidos en individuos autocompatibles procedentes de las familias en estudio fueron muy erráticos. Se comprobó que los cuajados eran independientes de la morfología floral pero que sufrían de una gran influencia ambiental.

A pesar de todos estos inconvenientes, algunos descendientes de estas familias muestran interés para seguir su evaluación con el fin de obtener variedades autocompatibles de almendro, sobre todo los descendientes de 'Ferragnès'. En algunos de estos individuos se ha observado que la eficiencia en el crecimiento de los tubos polínicos propios fue similar a la de un polen extraño o a la del polen de sus antepasados, confirmando que en estos individuos no existe una interacción negativa entre el estilo y un polen genéticamente relacionado que afecte al vigor de crecimiento de los tubos polínicos, como se había observado en individuos con presencia de consanguinidad.

La sustitución de 'Tuono' como fuente de transmisión de la autocompatibilidad, tanto por algún descendiente suyo selecto como por otra variedad comercial autocompatible, con el fin de obtener nuevo material vegetal autocompatible, de floración tardía y con pepitas de elevado valor comercial, permitirá ampliar la base genética del material autocompatible dentro de los programas de mejora, así como eliminar los caracteres negativos que transmite 'Tuono' a la descendencia.

SUMMARY

The effect of inbreeding on the expression and the transmission of self-compatibility in almond (*Prunus amygdalus* Batsch)

Almond (*Prunus amygdalus* Batsch), with a few exceptions, is an allogamous species, thus requiring cross-pollination to produce seeds. The adverse weather conditions at blooming time make pollen exchange in bivarietal orchards difficult and, jointly with the incidence of late frosts, are responsible for the fluctuation of almond production from year to year. These production oscillations may be diminished by the utilization of late-blooming and autogamous varieties adapted to the different growing regions and managed according to an intensive production system like any other fruit crop.

The almond genetic pool has been gradually reduced, first with the empirical selection and clonal propagation of varieties and, later on, with the utilization of a reduced number of genotypes as parents in the breeding programmes. As a consequence, inbreeding symptoms have appeared in the offspring coming from backcrosses, from crosses of full sibs, from crosses of half sibs and from selfing of self-compatible varieties.

In this work, the different expression and transmission of self-compatibility from 'Tuono' to its offspring when crossed with 'Ferragnès' and 'Ferralise', in the two ways of the cross, have been shown to be due to the inbreeding present in 'Ferralise', as it comes from the cross of two full sibs, 'Ferraduel' and 'Ferragnès'.

The observation of the pollen tube growth after selfing in laboratory conditions has shown that the inbreeding transmitted by 'Ferralise' to its offspring negatively affects the proportion of pistils with pollen tube at their base and the number of pollen tubes at the pistil base in comparison with the level of self-compatibility observed in the offspring of 'Ferragnès'.

Inbreeding is expressed in some genetic self-compatible seedlings of 'Ferralise' like the inability of their own pollen tubes to reach the style base, being the pollen-style interaction the reason for this low pollen tube vigour as proven by a slower growth rate and even the halt in the last style quarter, whereas the behaviour of the pollen and the pistils of these seedlings is fully normal in unrelated pollinations.

Thanks to the new molecular techniques that allow the genotype of the segregant offspring when producing the first flowers or leaves to be determined at an early stage, it was possible to establish the locus *S* genotypes of the seedlings of these families. The genetic study identified the inbreeding present in 'Ferralise' as the probable reason for the deviation from the genotypic frequencies in the family 'Tuono' x 'Ferralise', where most seedlings are self-incompatible, probably as a consequence of the expression of lethal genes linked to the *Sf* allele which would oblige cross-breeding in the offspring as a mechanism of increasing heterozygosity and producing vigorous offspring.

As other offspring from 'Tuono' showing inbreeding, fruit sets obtained in self-compatible seedlings from the studied families were very erratic. Fruit sets were independent of the floral morphology but suffer from a great environmental influence.

In spite of these shortfalls, some seedlings show promise for further evaluation in the search for new self-compatible almond varieties, mainly in the seedlings from 'Ferragnès'. Some of these plants have shown the growth of their own pollen tubes as efficient as that of a foreign pollen or of the pollen of their ancestors, confirming that in these plants there is no negative interaction between the style and a genetically related pollen affecting the growth vigour of pollen tubes, as observed in seedlings with inbreeding.

The substitution of 'Tuono' as a source for self-compatibility, either by some seedling derived from it or by another self-compatible commercial variety, with the aim of obtaining new self-compatible clones, late blooming and with kernels of high commercial value, would widen the genetic pool of self-compatible material for the breeding programmes, and would obviate the negative traits transmitted from 'Tuono' to its offspring.

RESUM

Efecte de la consanguinitat en l'expressió i la transmissió de l'autocompatibilitat a l'ametller (*Prunus amygdalus* Batsch)

L'ametller (*Prunus amygdalus* Batsch), amb unes poques excepcions, es una espècie al·lògama, pel que exigeix d'una pol·linització encreuada per a produir les ametlles. Les condicions atmosfèriques adverses al moment de la floració dificulten l'intercanvi de pol·len a les plantacions bivarietales i, junt amb la incidència de les gelades tardanes, són responsables de l'oscil·lació de la producció d'ametlla d'any en any. Aquestes fluctuacions de la producció poden disminuir-se amb la plantació de varietats autògames i de floració tardana, adaptades a les diferents zones de producció i conreades d'acord amb un sistema intensiu de producció com qualsevol altre arbre fruiter.

La base genètica de l'ametller s'ha reduït a poc a poc, primer amb la selecció empírica del material i la propagació clonal de les varietats i més envant amb la utilització d'un nombre reduït de genotips com a parentals en els programes de millora. D'això se'n deriva l'aparició de símptomes de consanguinitat en les descendències de retro-encreuaments, d'encreuaments de germans sencers o de mig germans, i de l'autopol·linització de varietats autocompatibles.

En aquest treball s'ha mostrat que l'expressió i la transmissió diferencial de l'autocompatibilitat des de 'Tuono' a la seva descendència per encreuament amb 'Ferragnès' i 'Ferralise', en els dos sentits de l'encreuament, depenen de la consanguinitat present a 'Ferralise', ja que prové de l'encreuament de dos germans sencers, 'Ferraduel' i 'Ferragnès'.

L'observació del creixement dels tubs pol·línics després de l'autopol·linització al laboratori ha mostrat que la consanguinitat transmesa per 'Ferralise' a la seva descendència afecta negativament a la proporció de pistils amb tubs pol·línics a llur base i el nombre de tubs pol·línics a la base del pistil en comparació amb el nivell d'autocompatibilitat que es va determinar a la descendència de 'Ferragnès'.

L'autocompatibilitat s'expressa en diversos plançons genèticament autocompatibles provinents de 'Ferralise' per la incapacitat del tubs del propi pol·len d'abastar la base de l'estil. La interacció pol·len-estil és la raó d'aquest vigor reduït dels tubs pol·línics, com es comprova per llur velocitat de creixement més baixa i fins i tot per llur aturada al quart inferior de l'estil, mentre que el comportament del pol·len i dels pistils d'aquests plançons és totalment normal en les pol·linitzacions sense parentesc.

Gràcies a les noves tècniques moleculars que permeten de conèixer precoçment el genotip dels individus de famílies segregants en produir les primeres flors o fulles, fou possible d'establir els genotips S dels plançons d'aquestes famílies. L'estudi genètic va permetre d'assenyalar la consanguinitat present a 'Ferralise' com a la probable raó de la desviació de les freqüències genotípiques a la família 'Tuono' x 'Ferralise', en la qual la majoria de plançons són autoincompatibles, probablement com a conseqüència de l'expressió de gens letals lligats a l'al·lel *Sf* que forçarien cap a una pol·linització encreuada en aquesta descendència com a mecanisme d'augmentar l'heterozigosi i de produir una descendència vigorosa.

Com en d'altres descendències de 'Tuono' que mostren consanguinitat, els quallats de fruit obtinguts en els plançons autocompatibles de les famílies estudiades va resultar molt erràtic. Els quallats foren independents de la morfologia floral, però patiren molt de la influència ambiental.

Malgrat aquests defectes, hi ha plançons que mostren un gran interès per a la seva futura evaluació amb el fi d'obtenir noves varietats d'ametller autocompatibles, especialment entre els descendents de 'Ferragnès'. Qualcun d'aquests individus mostra un creixement dels seus propis tubs pol·línics tan eficient com el d'un pol·len estrany o el del pol·len dels seus avantpassats, el que confirma que en aquests plançons no hi ha cap interacció negativa entre l'estil i un pol·len genèticament emparentat que pugui afectar el vigor de creixença dels tubs pol·línics, com s'havia observat en els plançons amb consanguinitat.

La substitució de 'Tuono' com a donant de l'autocompatibilitat, tant per qualche plançó que en derivi com per una altra varietat comercial autocompatible, amb l'objectiu d'obtenir noves seleccions autocompatibles, de floració tardana i amb ametlles d'alt valor comercial, permet d'ampliar la base genètica del material autocompatible en els programes de millora i al mateix temps d'obviar les característiques negatives transmeses per 'Tuono' a la seva descendència.

1.INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción española de almendra supone aproximadamente el 15% de la mundial. La producción de almendra oscila considerablemente año a año, condicionada principalmente por las adversidades ambientales durante la polinización y la incidencia de las heladas primaverales. España es el país con mayor superficie dedicada al almendro, aunque una alta proporción de la misma, se encuentra en terrenos marginales, sin dedicación cultural ni orientación industrial. Las ayudas de la Unión Europea a las Organizaciones de Productores de Frutos Secos durante los últimos años han permitido organizar el sector y mejorar la productividad de las plantaciones, así como la difusión de las nuevas obtenciones de los programas de mejora españoles, destacando la variedad autocompatible 'Guara', que ocupa más del 50% de las nuevas plantaciones. A pesar de ello, la mayor parte de la producción se basa todavía en plantaciones tradicionales en secano, con pocas posibilidades de mantener su rentabilidad. Sin embargo, el uso de variedades autógamas, adaptadas a las distintas zonas de cultivo, plantadas con un diseño que permita la máxima mecanización, y cultivadas con los mismos cuidados que cualquier otro árbol frutal, permiten considerar el almendro un cultivo con muchas posibilidades. La realización de esta tesis, se enmarca en los primeros pasos de la selección del material vegetal autocompatible, dentro del Programa de Mejora Genética del Almendro desarrollado en el CITA de Aragón (Zaragoza), más concretamente en el estudio de la transmisión de la autocompatibilidad a la descendencia.

1.1 DESCRIPCIÓN DEL ALMENDRO

1.1.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El almendro es una especie cultivada compuesta principalmente por árboles alógamos, de hasta 12 metros de altura. Tanto el tronco como las ramas del almendro tienen una corteza lisa, de color marrón o grisáceo durante los primeros años. Con la edad y el crecimiento en grosor, la corteza se agrieta y se oscurece. En el ramo del año, se distribuyen las hojas, dispuestas en espiral, guardando unas distancias llamadas entrenudos. En la axila o base de cada hoja se encuentran las yemas laterales, vegetativas y florales. Las yemas de flor aparecen normalmente en las posiciones de las yemas estipulares. En cada nudo puede haber un número variable de botones florales, entre uno y tres. En el caso de que se encuentren más de tres botones en un nudo es porque se ha producido un pequeño crecimiento que ha dado lugar a un ramillete de mayo. Las hojas son simples, de tipo lanceolado, de 6-15 cm de longitud y de 2-3 cm de anchura, y normalmente presentan un dentado aserrado muy fino. La flor del almendro es hermafrodita unicarpelar y

generalmente se presentan solitarias. El cáliz es caduco, con cinco lóbulos y con prefloración imbricada. La corola está compuesta por cinco pétalos que pueden ser blancos o rosados, existiendo una variabilidad continua en sus dimensiones y coloración. El número de estambres puede ser de 15 o superior, insertos en el tálamo cupular, con filamentos filiformes y libres. Las anteras son bitecas de dehiscencia longitudinal. El ovario es súpero, unilocular y con dos óvulos, cuya viabilidad depende de las variedades y de las condiciones, dando lugar a pepitas sencillas o dobles. El estilo, de longitud variable, puede presentar una curvatura en la parte superior, que normalmente se endereza a las pocas horas de abrirse la flor. El estigma se encuentra en el extremo del estilo, formando una especie de expansión o almohadilla de superficie irregular que produce en la antesis una secreción pegajosa que favorece la adhesión del polen y proporciona un medio favorable para su germinación. El fruto, es una drupa especial, ya que no experimenta la fase de engrosamiento del mesocarpio, sino que en el momento de la madurez se seca y cae, dejando libre el endocarpio leñoso, que constituye la cáscara. La dureza, forma y aspecto de la cáscara son características de cada variedad, y su observación y descripción ayuda a definir las y diferenciarlas. El fruto completo tiene un peso que puede variar entre 8 y 20 g. En el interior del endocarpio se encuentra la semilla, parte comercial del cultivo, que contiene el embrión recubierto por los tegumentos. El peso de la pepita oscila normalmente entre 0,6 y 1,5 g, aunque algunas variedades pueden superar ligeramente los 2 gramos.

1.1.2 TAXONOMÍA DEL ALMENDRO

Esta especie tiene un número básico de cromosomas (n) de 8, mientras que el somático ($2n$) es de 16 (DARLINGTON, 1930). A lo largo de la historia, el almendro ha sido denominado de numerosas formas, muchas veces con un criterio subjetivo del autor, prevaleciendo sobre criterios objetivos de la especie vegetal. Ello ha conducido al estado actual, en el que existen diversos sinónimos, que pueden crear confusiones. De esta manera, la primera denominación del almendro la realizó LINNAEUS (1735) como *Amygdalus communis* L. Muchos botánicos, como SPACH (1843), VAVILOV (1930), JUKOVSKI (1950), RIKHTER (1969), BROWICZ (1969, 1972), SERAFIMOV (1971) y GRASSELLY (1976,a y b) siguieron considerando a *Amygdalus* como género, y denominaron al almendro con la denominación linneana de *Amygdalus communis* L.. MILLER (WEBB, 1967) fue el primero que incluyó al almendro en el género *Prunus* en 1768, designando al almendro como *Prunus dulcis*, aunque creó la confusión en relación con el almendro amargo, que difiere del dulce en un único alelo. La especie fue llamada más tarde *Prunus amygdalus* por BATSCH (1801). ARCHANGELI (1882) fue el último en denominar de forma distinta al almendro, como *Prunus*

communis. SCHNEIDER (1904) y REHDER (1947) definieron *Prunus amygdalus* Batsch como el mejor nombre científico para el almendro, y con el cual se ha referido, durante muchos años, la literatura internacional de carácter botánico y hortícola. La controversia de la denominación científica del almendro se intentó zanjar en el Congreso Internacional de Botánica de 1964, donde el Comité General de Nomenclatura Botánica propuso *Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb para el almendro dulce cultivado (PUNT, 1964), aceptando *Prunus amygdalus* Batsch (1801) y *Prunus communis* (L.) Archang. 1882, como sinónimos. Pese a ello, unos años después, en los "Resúmenes de Bibliografía del Género *Prunus*" de la Agencia de Agricultura de la Commonwealth de 1965 se seguía denominando al almendro como *Prunus amygdalus* Batsch (KNIGHT, 1969). Recientemente, BROWICZ Y ZOHARY (1996) propusieron una clasificación de las especies relacionadas con el almendro, fundada sobre la consideración de *Amygdalus* como género, al igual que LINNEAUS, en vez de *Prunus*, mantenida por la mayor parte de las publicaciones botánicas, asignado al almendro cultivado la denominación *Amygdalus communis* L., fomentando de esta manera la posible confusión. Esta denominación también ha sido adoptada por LADIZINSKY (1999). El último trabajo de clasificación taxonómica de las especies de almendro (SOCIAS I COMPANY, 1998), define al almendro como perteneciente a la Familia *Rosaceae*, Género *Prunus* L. (1735), Subgénero *Amygdalus* (L.) Focke, Serie *Icosandrae* Spach (1843), Sección *Euamygdalus* Spach (1843), Grupo *Amygdalus*, Nombre *P. amygdalus* Batsch (1801) siendo sinónimos *Amygdalus communis* L., *Amygdalus dulcis* Mill., *Prunus communis* (L.) Archang., *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb.

1.1.3. ORIGEN, EVOLUCIÓN Y EXPANSIÓN DEL ALMENDRO

El almendro, al igual que algunos otros frutales de hueso, como el melocotonero, el albaricoquero y varios ciruelos, tiene su centro de origen en las regiones montañosas de Asia Central, en una zona extendida entre el Norte de Irán, Afganistán, Oeste de Pakistán y Tadjikistán (GRASSELLY, 1976; LADIZINSKY, 1999).

Numerosos botánicos rusos expusieron distintas teorías sobre la evolución de las especies frutales, a partir del estudio de sus antepasados silvestres en toda la meseta central de Asia (GRASSELLY Y CROSSA-RAYNAUD, 1984). Actualmente existen discrepancias acerca de si el almendro apareció de forma espontánea o si es fruto de cruzamientos ocurridos en la zona de origen entre distintas especies silvestres y que se pueden considerar como sus especies originarias. Las especies descritas como más próximas al almendro son *P. fenzliana* Fritsch, *P. bucharica* (Korsh.) Hand.-Mazz. y *P. kuramica* (Korsh.) Kitam., incluidas también en la sección *Euamygdalus*

(GRASSELLY, 1976A; 1976B; BROWICK Y ZOHARY, 1996), y descritas como especies ancestrales del almendro (GRASSELLY, 1976A; KESTER *ET AL.*, 1991). Sin embargo, LADIZINSKY (1999) ha indicado recientemente que el almendro procede sólo de *P. fenzliana*. Otras hipótesis han sugerido que en la evolución del almendro en la Cuenca Mediterránea, es posible que también haya intervenido *P. webbii* (Spach) Vierh., ya que ambas especies conviven de forma silvestre en diversas regiones de los Balcanes, Sicilia y otras zonas del Mediterráneo. En España existe una población en estado silvestre de *P. webbii*, localizada en la provincia de Toledo, que podría haber intervenido en la formación de ciertas variedades españolas (FELIPE Y SOCIAS I COMPANYY, 1978).

El almendro es una especie relacionada con otras especies frutales de clima templado, como el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), el ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.) y sobre todo el melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batsch). Se cree que el almendro y el melocotonero pueden proceder de una misma especie originaria surgida en Asia Central, de manera que el almendro se expandió hacia las zonas áridas del oeste, lo que le obligó a desarrollar un sistema de autoincompatibilidad gametofítico, permitiéndole así una mayor diversidad y capacidad de adaptación, mientras que el melocotonero se expandió hacia el este, hacia unas zonas más húmedas y fértiles, lo que le permitió mantenerse autocompatible (WATKINS, 1979).

La proximidad de las poblaciones silvestres del almendro con algunos centros de civilización en estas zonas montañosas del centro de Asia, posibilitó el cultivo del almendro desde épocas muy remotas, en torno a cuatro o cinco mil años. Estas regiones forman el "centro primario de expansión" de la especie (VAVILOV, 1951) y en ellas es posible encontrar la mayor variabilidad de genotipos de almendro.

La diseminación del almendro a diferentes países asiáticos se vio favorecida por el hecho de que la semilla era al mismo tiempo la unidad de propagación y la parte comestible. Se distribuyó por Persia, Mesopotamia (KESTER *ET AL.*, 1990), y a través del intercambio comercial de la época a Grecia y el Oriente Próximo. En el período de hace tres mil a dos mil años, los fenicios a través del Mediterráneo y los romanos en sus conquistas por el norte de la cuenca mediterránea, se encargaron de expandir el cultivo del almendro por toda la región mediterránea (CERDÁ JUAN, 1973). El almendro no se extendió hacia las zonas de oriente, debido probablemente, al clima menos favorable de los inmensos territorios de la Asia continental. Durante los siglos VI y VII, los bereberes y árabes también extendieron el cultivo por el norte África (MAHOU Y DENNIS, 1992). En la península ibérica, según datos arqueológicos, la introducción del almendro se realizó antes de la era actual por el Mediterráneo (CERDÁ JUAN, 1973) y durante el siglo I a través de los Pirineos (GRASSELLY, 1976a, DICENTA, 1991) y posteriormente también por África, desde el comienzo de la época de la ocupación

musulmana del sur de la península ibérica en el siglo VIII.

Durante mucho tiempo, el cultivo evolucionó muy poco, debido a que la propagación de la especie se realizó casi exclusivamente por semilla hasta el siglo XIX. El almendro se cultivó en zonas cálidas costeras del mar Mediterráneo, asociado frecuentemente al olivar y la viña, y también se plantó en borduras como indicadores de límites de parcelas o bordeando caminos.

Debido a la repetida multiplicación por semilla, el cultivo fue sometido a la acción del medio produciéndose una selección natural acompañada de la selección ejercida por el hombre, que fue descartando las plantas con caracteres desfavorables, dando lugar a la aparición de poblaciones características o ecotipos locales adaptados a determinadas regiones geográficas. Es por ello que la cuenca mediterránea se considera como un "centro secundario de domesticación" de la especie.

Aunque en California la introducción del almendro tuvo lugar a finales del siglo XVIII mediante la actividad de las misiones españolas, el hecho más relevante para la posterior evolución de su cultivo fue la introducción de variedades procedentes del sur de Francia (Región de Languedoc) durante el Siglo XIX (KESTER *ET AL.*, 1991; GRADZIEL Y KESTER, 1996).

Esta evolución del cultivo del almendro ha conducido a la existencia de varios ecotipos, muy diferentes entre sí (GRASSELLY, 1976a; GRASSELLY Y CROSSA-RAYNAUD, 1980), que a continuación se describen de forma resumida:

1. Ecotipo del norte de Portugal: Árboles con porte muy abierto y ramificado de floración precoz. Almendra de cáscara muy dura y pepita normalmente única. Destacan los grupos de las "Bonitas" y los "Duros".

2. Ecotipo del este de España: Variedades de floración precoz y cáscara dura. Destacan dos grupos, el de las "Desmayo", originario del Valle del Ebro, de fruto alargado, porte llorón y maduración tardía, y el de las "Marcona", originario de Alicante, de fruto casi esférico.

3. Ecotipo de los Alpes de Provenza (Francia): Presentan una sola flor por yema y no tienen pepitas dobles. Las variedades más importantes son 'Tournefort' y 'Tardive de la Verdrière'.

4. Ecotipo de la Apulia (Italia): Variedades con un porte poco o nada ramificado, yemas florales muy globosas, con escamas pubescentes y abundancia de flores gemelas. Época de floración tardía y frutos de cáscara dura, con elevados porcentajes de semillas dobles. Presencia de variedades autocompatibles como 'Filippo Ceo', 'Genco' y 'Tuono'.

5. Ecotipo de Sfax (Tunisia): Se caracterizan por sus exiguas necesidades en frío, lo que les confiere una floración muy precoz. Presentan cáscaras gruesas y blandas. Las variedades más

significativas son 'Achaak', 'Constantini' y 'Zahaf'.

6. Ecotipos rumanos: Se caracterizan por su gran vigor, alcanzando el árbol gran tamaño. Tienen hojas y flores grandes. El color de las flores suele ser rosado. No muestran gran fertilidad.

7. Ecotipos californianos: Debido a la extensión del cultivo en California, también se considera como otro "centro de diversificación" de la especie. Se caracteriza por derivar casi toda la población de la variedad 'Nompareil', habiéndose utilizado en muchas ocasiones como genitor en la genealogía de la mayoría de variedades. El otro genitor suele ser 'Texas'. Se caracterizan por presentar cáscara blanda o muy blanda.

1.2 MAGNITUDES DEL CULTIVO DEL ALMENDRO

1.2.1 EL CULTIVO DEL ALMENDRO EN EL MUNDO

La gran variabilidad genética que encierra el almendro, le ha permitido adaptarse a condiciones ambientales muy diversas, desde las zonas cálidas de la cuenca mediterránea hasta las zonas montañosas y frías del centro y suroeste de Asia. Ello ha permitido que el cultivo del almendro se encuentre diseminado por los cinco continentes, aunque sólo en las zonas donde el clima le es más favorable.

La superficie mundial del almendro se ha incrementado en los últimos años, alcanzando 1.730.000 ha en el año 2002, aunque en los países de cultivo tradicional, la superficie se está estabilizando (Fig.1.1-A). España es el país del mundo con más superficie dedicada al almendro, con 664.000 ha, lo que supone aproximadamente el 38% de la superficie mundial. Estados Unidos es el segundo país en superficie con 245.000 ha (14%), seguido por Tunicia con 202.000 ha (12%).

El promedio de la producción mundial de los últimos años (1998-2002), es de 1.340.000 t de almendra en cáscara (FAO, 2002). Estados Unidos es el primer productor de almendra en cáscara con 382.000 t (29%) y junto con España, con 259.000 t (19%), comprenden más de la mitad de la producción mundial de almendra en cáscara (Fig.1.1-B). Otros países productores importantes son Italia e Irán, cada uno con un 7%, y con menos de un 5% cada uno, Marruecos, Siria, Grecia, Tunicia, Turquía, Líbano, Libia y Argelia.

Sin embargo, en algunos de estos países, la producción de almendra que se destina a la comercialización e industrialización es mínima, dedicándose en su mayor parte al consumo local. Así, en términos económicos y comerciales, el liderazgo de Estados Unidos se acentúa, con una producción media, para los años 1995 a 2003, de 313.000 t grano (Fig. 1.1-C), un 76% de la

producción comercial mundial, mientras que la producción de almendra grano en España es de 58.400 t (14,2%) (ALMOND BOARD, 2003).

En la Fig.1.1-D se puede apreciar la importante fluctuación anual de la producción mundial, así como el peso relativo sobre ésta de las producciones americana y española. Estas fluctuaciones, en muchos casos, pueden ser debidas a factores climáticos desfavorables, capaces de reducir la producción a la mitad, como ocurrió con la producción americana del año 1996, respecto a la de 1995.

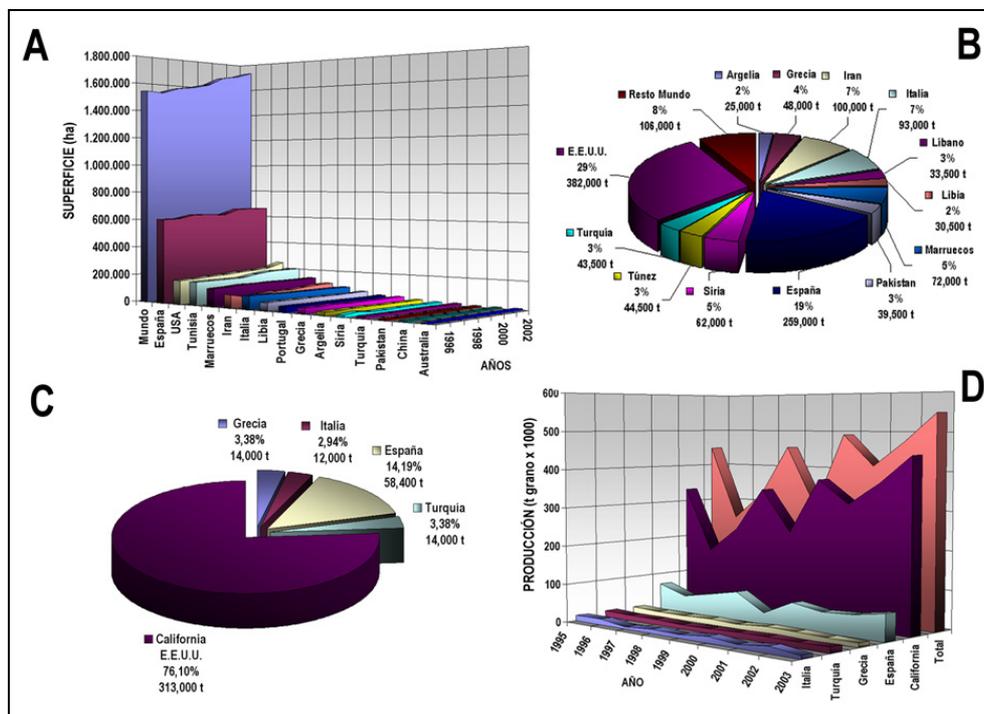


Fig.1.1 - Superficie y producción mundial del almendro
 A) Evolución de la superficie de almendro. (Fuente F.A.O)
 B) Distribución de la producción de almendra en cáscara por países.Promedio del período 1998-2002. (Fuente F.A.O)
 C) Distribución de la producción de almendra en pepita por países.Promedio 1998-2003. (Fuente Almond Board)
 D) Evolución de la producción de almendra en pepita en los principales países productores. (Fuente Almond Board)

1.2.2- EL CULTIVO DEL ALMENDRO EN ESPAÑA.

En España el 93 % de la superficie de almendro es en seco, (MAPA, 1999). Andalucía es la comunidad autónoma con la mayor superficie de almendro, con 199.000 ha (30,4%), seguida por la Comunidad Valenciana con 120.000 ha (18,3%), Murcia con 73.000 ha (11,1%), Cataluña con 70.000 ha (10,6%), Aragón con 69.000 ha (10,5%) y Baleares con 62.000 ha (9,5%) (Fig. 1.2-A).

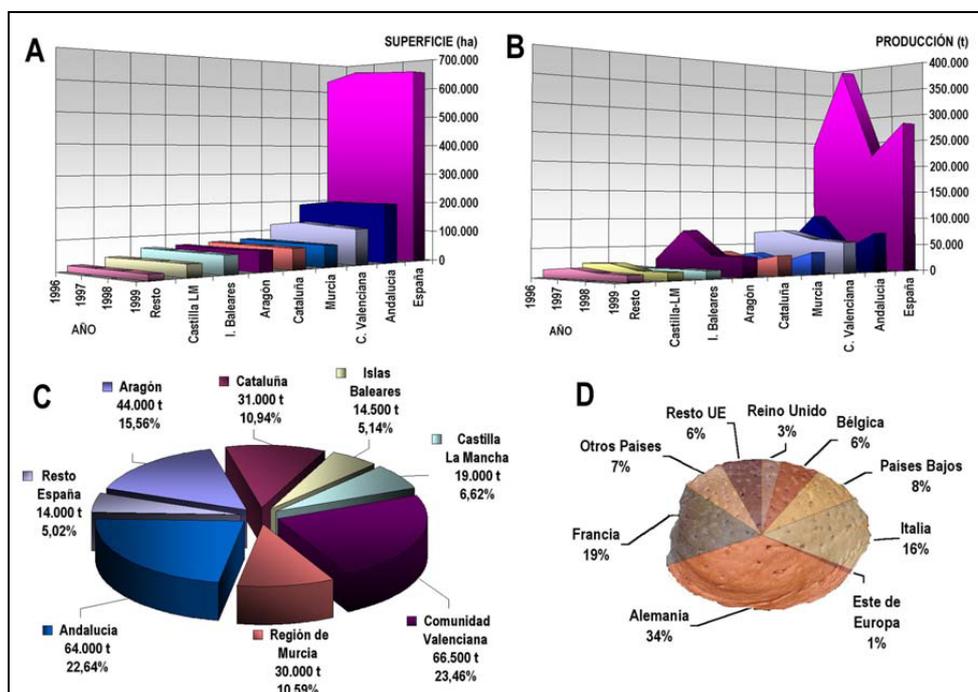


Fig. 1.2 - Superficie, producción y exportación de almendra española.
 A) Evolución de la superficie en las principales regiones productoras. (M.A.P.A.)
 B) Evolución de la producción de almendra en cáscara en las principales regiones productoras. (M.A.P.A.)
 C) Distribución de la producción española. Promedio de 1996 a 1999. (M.A.P.A.)
 D) Destino de las exportaciones españolas de almendra. (Fuente: Almendrave, modificado)

La evolución de la superficie del almendro en España es de un crecimiento pausado desde 1985 (572.000 ha) hasta 1997 (664.000 ha), aunque en los últimos años (Fig 1.2-B), la tendencia ha sido ligeramente descendente, hasta las 654.000 ha registradas en el año 1999 (MAPA, 1999).

Las producciones anuales de almendra por comunidades presentan una elevada variabilidad (Fig.1.2-C), determinada sobre todo por las incidencias climáticas, como las heladas y las sequías, lo que dificulta los pronósticos de cosecha a nivel nacional. Se observa que no existe una relación entre la superficie de cultivo y la producción. Así, las comunidades autónomas que muestran unos rendimientos medios superiores para el período 1996-1999, en almendra cáscara, son Aragón con 0,67 t/ha y la Comunidad Valenciana con 0,53 t/ha, mientras que en Andalucía se da un rendimiento muy bajo, 0,33 t/ha al igual que en las Islas Baleares, 0,24 t/ha, lo que indica que en estas comunidades existe una mayor superficie de almendro no productivo o en abandono.

España, a pesar de ser el segundo exportador mundial de almendra (43.000 t de grano), se ha convertido también en uno de los principales importadores (26.000 t). La mayoría de estas importaciones se realizan de Estados Unidos, y se canalizan nuevamente al exterior después de su

industrialización. Más del 55% de la producción española de almendra se destina a los mercados exteriores, ascendiendo las exportaciones a unos 185 millones de euros. El primer importador de almendra española es la Unión Europea (90%), destacando Alemania que absorbe más del 30% de la exportación española de almendra (Fig. 1.2-D).

Casi la mitad de la almendra producida en España se dedica a la industria de dulces navideños, como el turrón y el mazapán, pero tiene importancia en pastelería, aperitivos, helados, confitería, chocolates, cosmética y farmacia. La almendra, como los otros frutos secos, es un alimento energético, rico en proteínas, fibra, ácido oleico, minerales y vitaminas, resultando un componente importante en la Dieta Mediterránea, que ha formado parte desde siempre de la vida cotidiana de nuestro país.

1.2.3 EL CULTIVO DEL ALMENDRO EN ARAGÓN

El almendro es un cultivo de importancia en Aragón, ya que se le dedican en torno a 70.000 ha. Unas 4.000 ha no son productivas ya que corresponden a nuevas plantaciones o plantaciones en reconversión. Únicamente el 2,5% de la superficie se encuentra en regadío. La superficie de almendro en Aragón tiene una tendencia ascendente (Fig. 1.4-A), aumentando la superficie cultivada durante el período de 1997 a 2001 en unas 10.000 ha. Zaragoza presenta más de la mitad de la superficie aragonesa de almendro con 34.800 ha (52%), siendo la superficie en Teruel de 17.600 ha y en Huesca de 13.500 ha (Fig. 1.4-B).

La producción de almendra en Aragón presenta también una elevada variabilidad (Fig. 1.4-C). Así, mientras que en 1997 Aragón produjo unas 76.000 t de almendra en cáscara, en 2001 sólo se produjeron 32.000 t. Las producciones por provincias siguen una distribución similar a la de las superficies: la provincia de Zaragoza produce en torno a 40.000 t en cáscara, Teruel sobre 13.500 t y Huesca sobre 12.000 t (Fig. 1.4-D)

1.3 EL CULTIVO INTENSIVO DEL ALMENDRO: EL CAMINO A SEGUIR PARA RENTABILIZAR LA PRODUCCIÓN

En los datos de las superficies y producciones mundiales (Fig 1.1), se observa que no existe una relación entre superficie y producción. Así, la superficie dedicada al almendro en España triplica casi a la de Estados Unidos, y sin embargo la producción de Estados Unidos es en torno a seis veces superior a la española. Estas diferencias se deben principalmente al diferente manejo del cultivo. Mientras que en los países de la Cuenca Mediterránea predomina el cultivo tradicional, en

Estados Unidos y Australia el cultivo es intensivo, un sistema que actualmente se está implantando en los países desarrollados de la Cuenca Mediterránea.

El cultivo tradicional en los países mediterráneos está caracterizado por darse en explotaciones pequeñas, con una gran riqueza de variedades, generalmente de floración temprana y cáscara dura, cultivadas con muy poca tecnificación, en suelos pobres y normalmente en secano, obteniéndose rendimientos muy bajos, condicionados principalmente por factores climáticos, tanto durante la floración (lluvias, frío, viento, heladas primaverales), como durante el desarrollo de la pepita, (sequía, lluvias durante la recolección...), siendo España un buen ejemplo de esta situación.

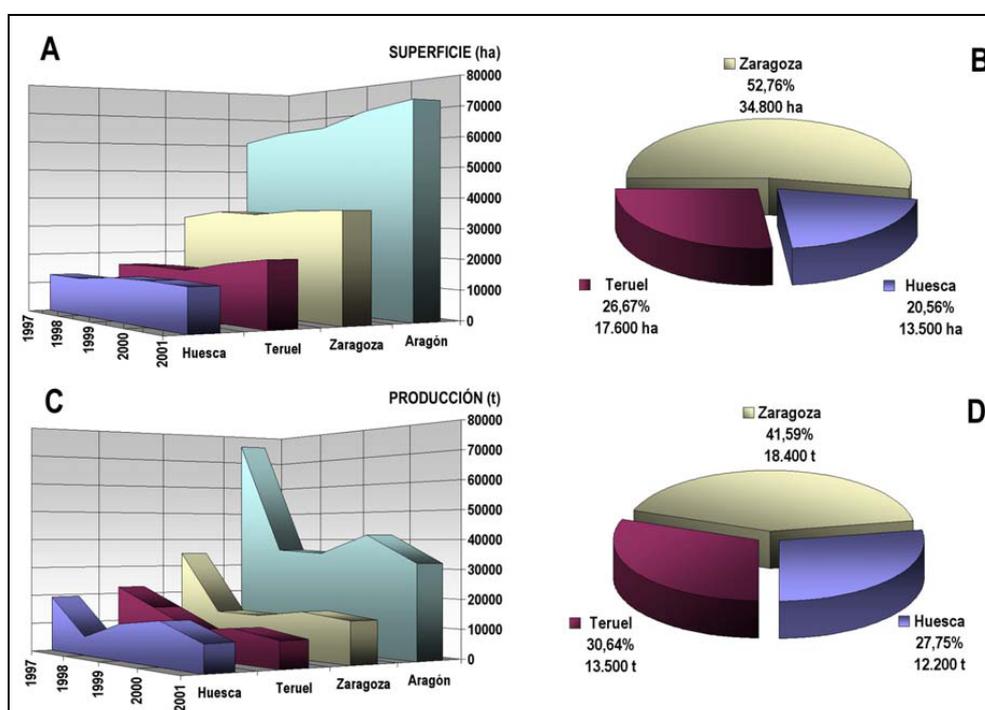


Fig. 1.3 - Superficie y producción de almendro en Aragón. (Fuente: Anuario Estadístico Agrario. D.G.A.)

- A) Evolución de la superficie de almendro en Aragón.
- B) Distribución de la superficie de almendro en Aragón. Datos de 2001.
- C) Evolución de la producción de almendra cáscara en Aragón.
- D) Distribución de la producción de almendro en Aragón. Datos de 2001.

La creencia generalizada de que este frutal, por su gran rusticidad, no necesitaba cuidados especiales condujo a la realización de un gran número de plantaciones en terrenos de baja calidad cuando no marginales, con resultados de muy bajos rendimientos medios, unos 410 kg (en cáscara)/ha (Cuadro 1.1). Esta cosecha media de almendra está muy por debajo de la que se estima necesario para cubrir los costes que ocasiona una hectárea en una explotación de secano

mínimamente atendida que, dependiendo de la zona y año, se encuentra en el intervalo de 700 a 1000 kg pepita/ha (MAPA, 2002).

Teniendo en cuenta que en muchas explotaciones la producción es bastante mayor a la media nacional, es evidente que hay una considerable superficie de almendro que se encuentra en abandono cuya producción es nula, siendo su destino racional el arranque.

Por el contrario, el sistema intensivo desarrollado en Estados Unidos introduce prácticas de cultivo orientadas a maximizar la producción y eliminar cualquier factor limitante. Este sistema de producción se caracteriza por la utilización de un reducido número de variedades, aunque todas ellas autoincompatibles, muy adaptadas al medio, entre las que destacan 'Nonpareil' (con 38% de la superficie), 'Carmel' (18%), 'Butte' (11%), 'Monterrey' (5%) y 'Texas' (4%) (ALMOND BOARD, 2003). Estas variedades presentan unas características comunes como la cáscara blanda (mayor rendimiento en el descascarado), la época de floración media y los frutos muy similares a los de 'Nonpareil'. Debido al carácter autoincompatible de estas variedades, las plantaciones incorporan hileras de dos o más variedades intercompatibles, siendo una práctica habitual el uso de colmenas durante la floración para garantizar una adecuada polinización.

Todas las plantaciones se caracterizan por estar en regadío, generalmente en riego por aspersión, sometidas a un control exhaustivo, con especial hincapié en una fertilización adecuada, con aportes elevados de nitrógeno. El tamaño medio de la explotación californiana es de 33 ha, si bien algunas plantaciones alcanzan hasta 2.000 ha, lo que permite considerar este cultivo como un frutal de regadío más, al que los agricultores se dedican a tiempo completo. Las labores de poda, el control de las malas hierbas, los tratamientos fitosanitarios y la recolección están muy mecanizados y programados. Los costes de producción son altos, pero debido a los grandes rendimientos que se obtienen (en torno a los 1.500 kg pepita/ha) (Cuadro 1.1) y el gran tamaño de las explotaciones hacen que el cultivo del almendro sea muy rentable en esas condiciones, ya que además los precios del agua y del transporte son muy bajos, lo que hace que la almendra californiana controle el mercado mundial. La comparación entre los rendimientos por hectárea obtenidos en California respecto a los demás países productores pone de manifiesto el abismo que separa los dos sistemas de producción actualmente existentes.

Cuadro 1.1 Superficie de almendro, producciones y rendimientos. Promedio 1995-2002.

	Superficie Año 2002 (1)	Producción almendra		Rendimiento		
		Cáscara (1)	Grano (2)	kg cáscara/ha	kg grano/ha	Descascarado
Mundo	1.618.490	1.321.435		817		
Australia	7.350	14.626		1.993		
Francia	1.700	4.432		2.607		
Grecia	40.645	50.762	14.237	1.248	350,3	28,1
Italia	89.932	92.948	12.502	1.034	139,0	13,4
Marruecos	136.239	61.609		450		
Portugal	40.505	8.938		221		
España	635.350	260.661	57.068	410	89,8	21,9
Túnez	183.850	43.938		242		
Turquía	18.463	41.375	13.783	2.248	746,5	33,3
USA	196.098	390.153	296.997	2.007	1514,5	76,1

(1) Fuente FAO. (2) Fuente Almond Board

1.4 NECESIDAD DE LA OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL ADAPTADO

La aplicación del sistema de cultivo intensivo del almendro a las diferentes condiciones climáticas de la cuenca mediterránea, requirió la aparición de diversos planes de mejora de la especie con el objetivo de obtener variedades comerciales adaptadas a las zonas específicas de cultivo. Para ello, ha sido necesario el estudio de los factores locales limitantes del cultivo, como las condiciones ambientales (climáticas y de suelo), y ensayar el comportamiento del nuevo material vegetal generado (variedades y patrones), con unas técnicas de cultivo apropiadas, así como evaluar las interacciones entre los distintos factores (condiciones ambientales y material vegetal) (GARCÍA, 1986).

Las exigencias medioambientales del almendro han determinado las regiones geográficas en las que su cultivo es posible y puede resultar rentable (KESTER *ET AL.*, 1990). El almendro necesita inviernos relativamente suaves pero con ciertas horas de frío invernal, aunque soporta fríos importantes durante el reposo invernal.

Las condiciones mediambientales durante la floración son determinantes en la producción. La floración es el momento más susceptible al daño por heladas, ya que éstas pueden anular por completo la cosecha. También, las temperaturas bajas durante la floración, aunque sean superiores a 0°C, y la presencia de lluvias, repercuten en la cosecha posterior, ya que se reduce la actividad de las abejas durante la época de la polinización (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1979; THORP, 1996).

Los veranos mediterráneos se caracterizan por temperaturas elevadas y escasez de lluvias. El almendro tolera bastante la sequía, si bien su incidencia se traduce en una disminución en la

cantidad y la calidad de la cosecha. Además puede producir una defoliación temprana del árbol, parando su crecimiento. Si la sequía es muy acentuada puede afectar incluso a la calidad de las flores de la campaña siguiente, y por tanto a la cosecha futura. Además, se ha observado que un exceso de calor durante períodos continuados, puede afectar a la aparición de ciertas anomalías como caída de yemas o 'bud-failure' (KESTER Y ASAY, 1978). Por el contrario, si se producen lluvias abundantes durante las fechas previas a la recolección, se produce un retraso en el secado de los frutos y un aumento de la contaminación por hongos y bacterias patógenos en la semilla, afectando su calidad.

El almendro puede crecer en una amplia gama de suelos, siendo una especie relativamente poco exigente. En cuanto a textura, se desarrolla mejor en suelos sueltos y permeables, como los suelos francos, siempre que tengan la humedad y los nutrientes necesarios. Si los suelos son arenosos, el cultivo necesitará riego constante y abonado. La presencia de capas freáticas altas y horizontes impermeables de materiales finos limita el crecimiento del sistema radicular. El almendro, como todos los frutales, no tolera los suelos salinos.

Las condiciones del suelo condicionarán la elección del patrón y las condiciones climáticas condicionarán la elección de la variedad. La correcta elección del material vegetal para las distintas condiciones ambientales de la zona debe ir acompañada por unas buenas prácticas de cultivo. Así se deberá mantener la fertilidad del suelo mediante un abonado acorde con las características del suelo y el nivel productivo de la parcela. También se deberá mantener una estructura adecuada del suelo con el fin de mantener la humedad y, si es posible, se deberá cultivar en regadío. Por otra parte es necesario controlar las plagas y enfermedades, así como las malas hierbas, para mantener un estado sanitario óptimo.

La interacción del patrón con la variedad se traducirá en un vigor de la planta que condicionará el marco de plantación. Además, en el caso de la utilización de material vegetal no autógeno, se deberán elegir variedades intercompatibles que coincidan en la fecha de floración y se deberá determinar la proporción de cada una de ellas en la nueva plantación. Un aspecto a menudo olvidado por los productores es asegurar la presencia durante la floración de agentes polinizadores, como las abejas, de manera que es muy recomendable la presencia de colmenas en las parcelas durante la floración, tanto si están compuestas por variedades intercompatibles, como si se trata de bloques de variedades autógenas.

Por consiguiente, el material vegetal debe reunir una serie de características, difíciles de encontrar en una variedad y en un patrón, de manera que se definió el ideotipo del almendro (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1998) y el ideotipo del patrón para el almendro (FELIPE ET AL., 1998), en

los que se enumeran las características que deben evaluarse en la búsqueda de la variedad ideal (Cuadro 1.2) y de un patrón ideal de almendro para una zona determinada.

Cuadro 1.2. Ideotipo de variedad de almendro (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1998)

IDEOTIPO DEL ALMENDRO
CALIDAD DEL FRUTO
Calidad organoléptica: sabor (sin amargor), composición química, aptitud a las transformaciones industriales. Tamaño y forma (más de 1,2 g por pepita). Espesor pequeño y color claro del tegumento. Ausencia de pepitas dobles o defectuosas. Rendimiento en pepit a(30-40% en cáscara dura; 50-60% en cáscara blanda) Dureza de la cáscara. Endocarpo bien cerrado. Facilidad al descascarado y repelado. Posibilidad de almacenamiento.
CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS CON EL CLIMA
Necesidades en frío invernal (Bajas, intermedias, altas) Necesidades en calor primaveral (Bajas, intermedias, altas) Época de floración (Temprana, Tardía) Época de maduración
CARACTERÍSTICAS FITOPATOLÓGICAS
Resistencia a plagas y enfermedades (Hongos, Bacterias, Insectos, Ácaros, Nemátodos...)
CARACTERÍSTICAS VEGETATIVAS
Porte. Ramificación compensada. Crecimiento inicial rápido que facilite la formación del árbol. Crecimiento posterior al en trar en producción que limite la poda. Poca fromación de chupones.
CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS
Productividad elevada. Rápida entrada en producción. Producción estable, sin vecería. Autogamia. Yemas de flor en ramilletes de mayo o brotes cortos (alta densidad floral). Poca caída de frutos al alcanzar la madurez, pero fácil desprendimiento después.
OTRAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS
Fotosíntesis. Relaciones hídricas. Resistencia a heladas.

De esta manera, el tema desarrollado en esta tesis se centra en la determinación de la presencia de la autocompatibilidad polen-estilo en el nuevo material vegetal generado en el Programa de Mejora Genética del Almendro desarrollado en Zaragoza. Se trata de un proceso de selección muy laborioso, al que el mejorador debe dedicar gran parte de su esfuerzo durante las primeras floraciones del nuevo material. La autocompatibilidad es un requisito inicial e imprescindible del nuevo material, previo al estudio de todas las demás características que debe reunir.

1.5. LA AUTOINCOMPATIBILIDAD SEXUAL EN EL REINO VEGETAL

La autoincompatibilidad sexual es uno de los mecanismos que muchas plantas superiores han desarrollado para prevenir la tendencia a la autofertilización, debida a la proximidad de los órganos reproductivos masculino y femenino en sus flores. La autoincompatibilidad permite al pistilo de una planta rechazar su polen o el polen de individuos genéticamente similares, evitando la aparición de consanguinidad (KAO Y HUANG, 1994). Se cree que más de la mitad de las especies pertenecientes a las angiospermas son autoincompatibles (BREWBAKER, 1959), lo que ha convertido a la autoincompatibilidad en uno de los factores más importantes en el éxito de la evolución de estas plantas, ya que la autoincompatibilidad promueve la variabilidad dentro de las especies aumentando sus posibilidades de adaptación (WHITEHOUSE, 1951).

Globalmente los sistemas de autoincompatibilidad sexual se pueden agrupar en dos distintos grupos (DE NETTANCOURT, 2001), que a grandes rasgos se explican a continuación:

1.5.1 EL SISTEMA DE AUTOINCOMPATIBILIDAD GAMETOFÍTICO

El sistema gametofítico de autoincompatibilidad parece ser el más extendido en el reino vegetal y se ha señalado su presencia en más de 60 familias de angiospermas (CROWE, 1964) estando presente en las familias Rosaceae (manzano, peral, cerezo, almendro), Solanaceae (tabaco, patata...), Papaveraceae (amapola), Scrophulariaceae (bocas de dragón), Onagraceae (primulas) y Fabaceae (judías y guisantes) (NEWBIGIN, 1996).

El control genético de la autoincompatibilidad gametofítica viene determinado por una serie de alelos en un solo locus, que se denomina locus S. La reacción de incompatibilidad se rige por la coincidencia o diferencia de los alelos S en el grano de polen y en el pistilo, que como tejido materno y diploide tiene los dos alelos de la planta, mientras que el grano de polen, como célula haploide, contiene solamente un alelo S. Se produce la reacción de autoincompatibilidad cuando el alelo del grano de polen coincide con uno de los dos alelos del pistilo, con lo cual el tubo polínico crece lentamente y finalmente detiene su crecimiento.

De esta manera, si una planta (diploide) se considera del genotipo S_1S_2 , produce dos clases diferentes de granos de polen, con los genotipos S_1 y S_2 . Ambos son incapaces de crecer en los pistilos de la misma planta, porque éstos poseen uno de sus dos alelos idéntico con el del grano de polen.

Esta interpretación fue propuesta por EAST Y MANGELSDORF (1925) para explicar la intercompatibilidad de una planta con su descendencia y la existencia de grupos de

interincompatibilidad en *Nicotiana*. Estos dos fenómenos fueron descritos por primera vez por MUNRO (1868) en *Pasiflora alata* Dryand. ex Ait. y se explican por el hecho que la descendencia de una planta S_1S_2 debe ser S_1S_i o S_2S_i , $i \neq 1,2$, con lo cual las plantas hijas producen la mitad del polen capaz de fertilizar a la planta madre y viceversa, y que también pueden existir plantas con los mismos alelos de incompatibilidad, con lo cual sus polinizaciones recíprocas son incompatibles (Fig.1.4).

En este sistema los granos de polen incompatibles germinan con normalidad en la superficie estigmática, los tubos polínicos penetran en el estigma y entran en contacto en el estilo con el mucílago secretado por las células del tejido transmisor (HARING ET AL., 1990). La parada del crecimiento de los tubos polínicos se realiza en un punto intermedio del tejido transmisor que conduce al ovario (NEWBIGIN ET AL., 1993). Los granos de polen de las plantas con este sistema de autoincompatibilidad son generalmente binucleados (BREWBAKER, 1967).

Desde el punto de vista molecular, cada alelo del locus S está compuesto por al menos dos genes, el gen S del pistilo y el gen S del polen (LEE ET AL., 1994, MURFET ET AL., 1994). Los primeros estudios sobre la expresión de los alelos S se realizaron en *Nicotiana alata*, concluyendo que el producto de su expresión en el estilo son unas glicoproteínas con actividad RNasa (MCCLURE ET AL., 1989), responsables del rechazo del polen incompatible (HUANG ET AL., 1994), al estar supuestamente implicadas en la degradación del rRNA dentro de los tubos polínicos incompatibles (MCCLURE ET AL., 1990). Las S-RNasas se han asociado con la autoincompatibilidad gametofítica en tres familias: Rosaceae (SASSA ET AL., 1996), Solanaceae (ANDERSON ET AL., 1986), y Scrophulariaceae (XUE ET AL., 1996).

La identificación y caracterización del gen S del polen son esenciales para entender los mecanismos moleculares del sistema de incompatibilidad gametofítico (DICKINSON, 1994). Un posible mecanismo por el cual la auto-incompatibilidad pudiera funcionar es que los productos de expresión del locus S en el polen y en el estilo serían idénticos y al unirse en cruzamientos incompatibles formarían un dímero activo que paralizaría el crecimiento del tubo polínico (NEWBIGIN ET AL., 1993). A diferencia del sistema esporofítico, se cree que la síntesis del producto S en el grano de polen se realiza después de finalizar la meiosis de la microsporogénesis (PANDEY, 1970).

Recientemente, se ha identificado en *Antirrhinum* (Scrophulariaceae) (LAI ET AL., 2002), *Prunus mume* (Rosaceae) (ENTANI ET AL., 2003) y almendro (Rosaceae) (USHIJIMA ET AL., 2003), un gen del locus S con expresión específica en el polen y que presenta diversidad alélica. El producto de este gen, se ha denominado SLF (S-locus F-box) en *Antirrhinum* y *P. mume* y SFB (S haplotype-specific F-box protein) en almendro. Estas proteínas contienen en su extremo amino terminal un

dominio caja F y son un sólido candidato a ser el factor S del polen.

En la actualidad no se conoce de manera precisa como se inhibe el crecimiento de los tubos autoincompatibles en el estilo. Existen dos modelos hipotéticos que tratan de explicar las relaciones moleculares entre el polen y el estilo, el modelo de “receptor de membrana” y el modelo de “inhibidor dentro del citoplasma del tubo polínico” (THOMPSON Y KIRCH, 1992; MCCUBBIN Y KAO, 2000) (Fig.1.5). En el modelo en el que el producto S en el polen actuaría como “receptor de membrana”, se produciría un reconocimiento de la S-RNasa por el receptor de la membrana del tubo polínico si el genotipo del estilo coincide con el del tubo polínico, permitiendo atravesarla. Una vez en el interior del tubo polínico la S-Rnasa se activaría y degradaría el RNA, con lo que se produciría la parada del crecimiento del tubo polínico (Fig.1.5.A). El modelo “inhibidor en el citoplasma del tubo polínico”, a priori parecería una teoría más improbable debido a que la S-proteína codificada en el tubo polínico tendría que inhibir todas las S-RNasas excepto su específica (Fig.1.5.B). Sin embargo investigaciones inmunocitoquímicas han mostrado que las S-RNasas entran y se acumulan en el citoplasma de los tubos polínicos de todos los haplotipos sin especificidad de alelo S (LUU ET AL., 2000).

Basándose en las experiencias de LUU ET AL., (2000), las proteínas caja F identificadas en *Antirrhinum*, *P. mume* y almendro (LAI ET AL., 2002; ENTANI ET AL., 2003, USHIJIMA ET AL., 2003) deberían degradar las S-RNasas con alelos diferentes al suyo propio, dejando activas las S-RNasas con el mismo alelo S. LAI ET AL. (2002) sugieren que la proteína caja F tiene una mayor afinidad por las S-RNasas de alelos diferentes, lo que implicaría que se degradarían todas las ribonucleasas, pero los tubos polínicos que no tienen ningún alelo en común con el tejido estilar crecerían más rápidamente. Por el contrario, USHIJIMA ET AL. (2003) sugieren que las S-RNasas pueden identificar las proteínas con caja F del mismo alelo S, de manera que se unirían formando un pseudo-substrato que la mantendría activa produciéndose la parada del crecimiento del tubo polínico.

1.5.2 EL SISTEMA DE AUTO-INCOMPATIBILIDAD ESPOROFÍTICO

Este sistema se ha descrito en distintas especies de la familia Brassicaceae, como *Brassica oleracea*, *B. napus* y *B. campestris* (NASRALLAH Y NASRALLAH, 1989; 1993). El control genético de la autoincompatibilidad puede ser dialélico o multialélico en un locus (locus S) o en varios loci (normalmente dos; el locus S y el Z) (DE NETTANCOURT, 2001). En este sistema, la reacción de incompatibilidad no está determinada por el único alelo del grano de polen (gametofito) sino por ambos alelos S de la planta que lo produce (esporofito). Cada alelo S del esporofito puede provocar la reacción de incompatibilidad independientemente o puede haber una relación de dominancia

entre ellos (Fig.1.4), que incluso puede ser diferente en el polen y en el pistilo; con ello un grano de polen con el genotipo S_1S_2 , si hay acción independiente no crecerá en los pistilos S_1S_i ni en los S_2S_i , pero si hay dominancia, por ejemplo $S_1 > S_2$, no crecerá en los pistilos S_1S_i pero sí en los pistilos S_2S_i (suponiendo independencia en el pistilo). Esta interpretación no fue explicada hasta 1950, cuando la expusieron simultáneamente GERSTEL (1950) para *Parthenium argentatum* A. Gray y HUGHES Y BABCOCK (1950) para *Crepis foetida* L. con el fin de explicar las reacciones de incompatibilidad en estas plantas que quedaban sin explicación con el sistema gametofítico.

En este tipo de incompatibilidad los granos de polen son generalmente trinucleados y en caso de incompatibilidad normalmente no germinan sobre los estigmas o en todo caso los tubos polínicos no pueden penetrar a través de la película estigmática (BREWBAKER, 1967). Las plantas con este sistema de autoincompatibilidad suelen tener estigmas secos, cubiertos por una cutícula de cera, de manera que en las polinizaciones compatibles se establece entre el grano de polen y la célula papilar estigmática una conexión hídrica, lo que permite la hidratación y la germinación del grano de polen (DODDS ET AL., 1996). Una célula papilar puede discriminar entre dos granos de polen de diferente compatibilidad en contacto simultáneo con ella dejando germinar sólo al grano de polen compatible (DICKINSON, 1995).

Hasta ahora se ha encontrado que dos genes segregan con el locus S en Brassicaceae. Estos genes codifican unas proteínas que se expresan en las células papilares del estigma (DODDS ET AL., 1996, MCCUBBIN Y KAO, 2000). Una de ellas presenta una actividad quinasa y se denomina con el nombre SRK (S-locus receptor kinase) y la otra codifica para una glicoproteína llamada SLG (S-locus glycoprotein), a la que se le supone la especificidad de la incompatibilidad polen-estigma (FERRARI ET AL., 1981). En la actualidad, se desconoce la naturaleza del producto de expresión del locus S en el polen (NASRALLAH Y NASRALLAH, 1993), aunque se cree que se encuentra en las capas que rodean el grano de polen (DOUGHTY ET AL., 1993) y que son sintetizadas antes del final de la meiosis en la microsporogénesis (PANDEY, 1970).

1.5.3 LA AUTO-INCOMPATIBILIDAD HETEROMÓRFICA

Algunas especies presentan unas barreras de autoincompatibilidad causadas por diferencias morfológicas en sus flores, llamada autoincompatibilidad heteromórfica (BARRETT, 1990). Entre las numerosas diferencias morfológicas que se pueden encontrar, destacan, la heteroestilia (diestilia y triestilia), en la cual las anteras y los estigmas están dispuestos a distintos niveles. La heteroestilia suele tener ligadas otras diferencias morfológicas como la presencia de granos de

polen con distintos tamaños y texturas diferentes de sus superficies, así como en la superficie de los estigmas y en la estructura del tejido transmisor del estilo tal como describió LEWIS (1979) en *Primula vulgaris*.

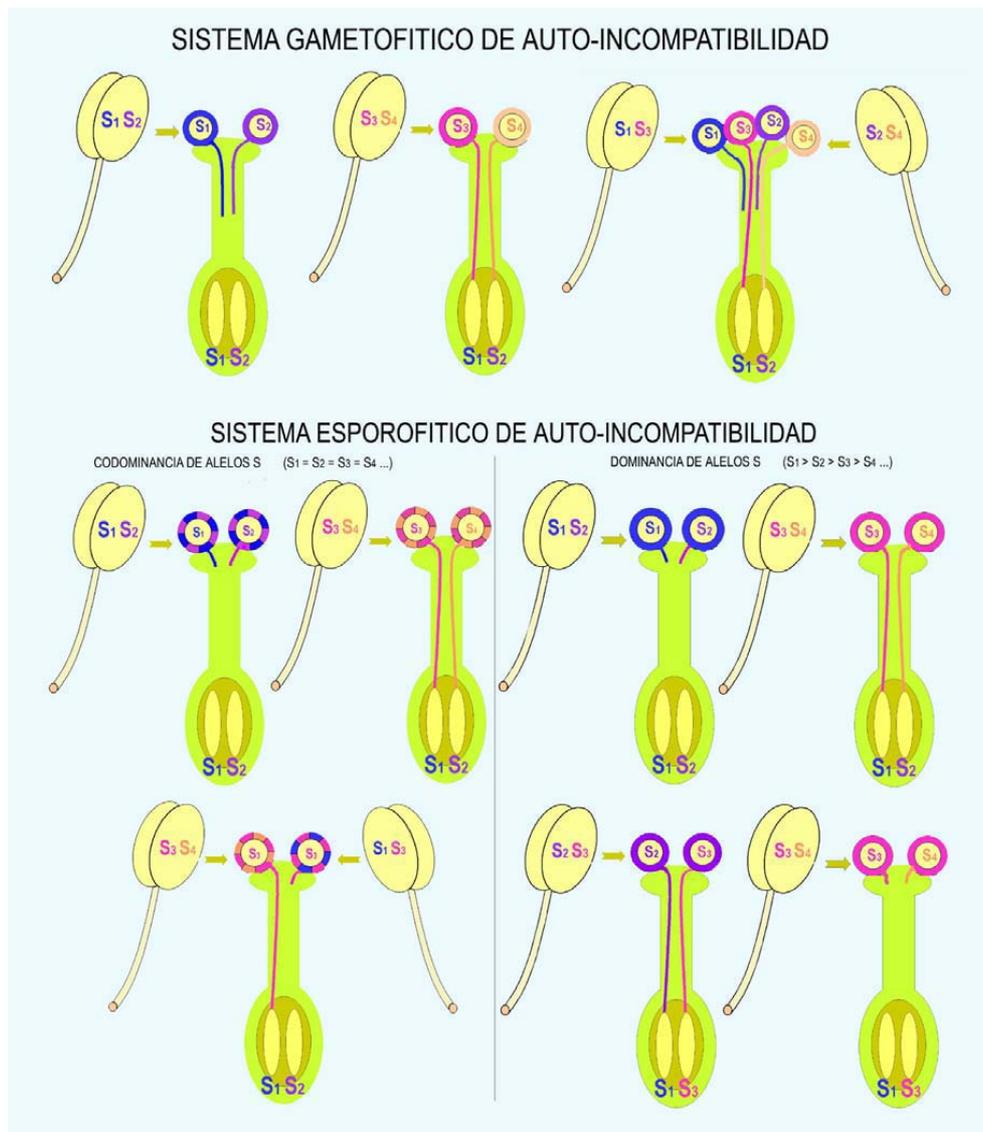


Fig. 1.4 Sistemas más comunes de autoincompatibilidad

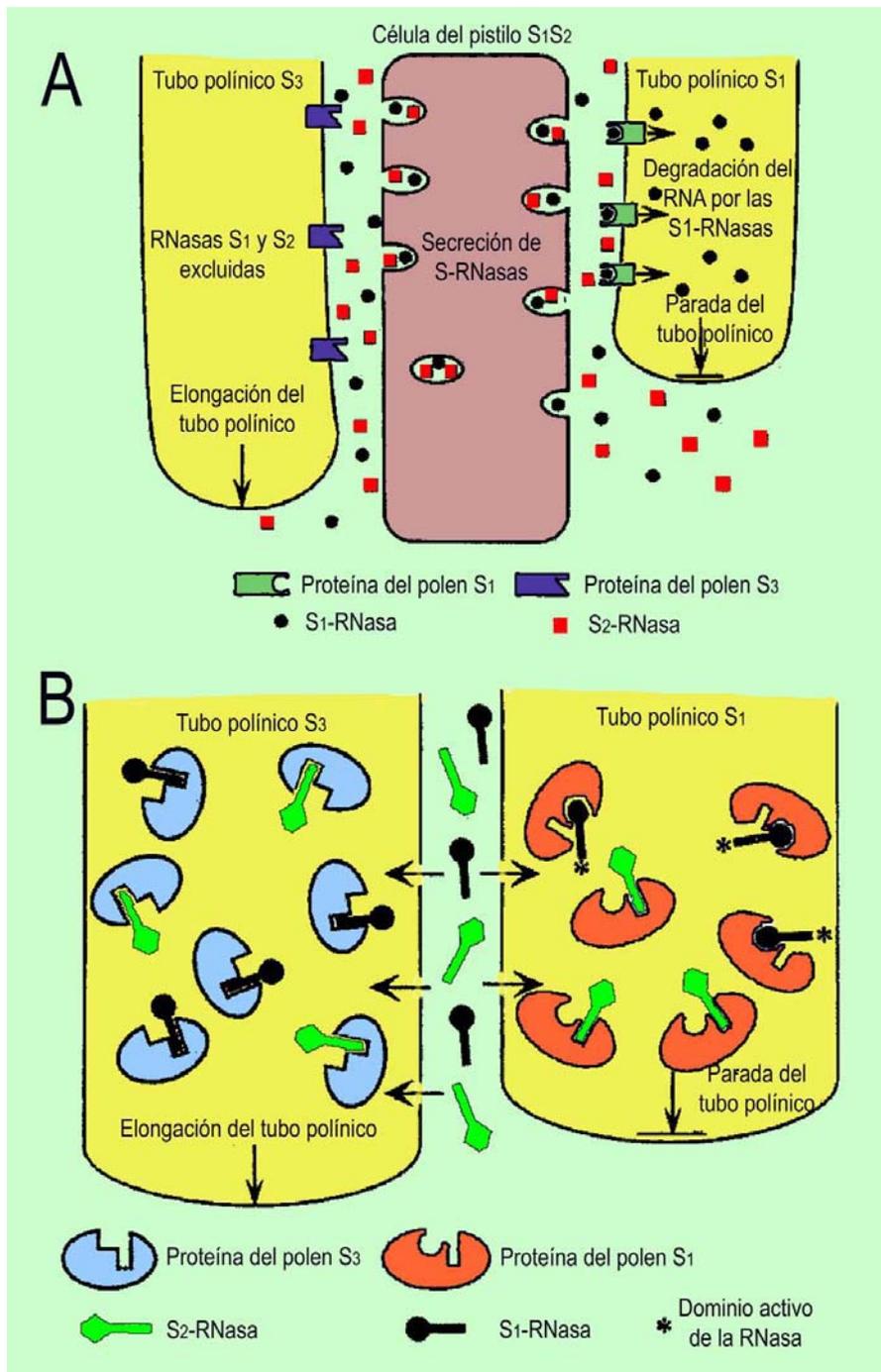


Fig 1.5. Modelos de interacción de incompatibilidad polen-estilo (adaptación de MCCUBBIN Y KAO, 2000).
 A) Modelo de receptor de membrana.
 B) Inhibidor en citoplasma del tubo polínico.

1.6 LA AUTOINCOMPATIBILIDAD EN EL ALMENDRO

1.6.1 LA AUTOINCOMPATIBILIDAD Y LOS GRUPOS DE INTER-INCOMPATIBILIDAD DEL ALMENDRO

El almendro es una especie autoincompatible y al igual que otras rosáceas, posee un sistema de autoincompatibilidad de tipo gametofítico (GAGNARD, 1954; CROWE, 1964; GODINI 1981; SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1987; 1988; SOCIAS I COMPANY, 1990). El control de la fertilización en el almendro se produce por una inhibición del crecimiento de los tubos polínicos incompatibles en el estilo (SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 1976; GODINI, 1977; SOCIAS I COMPANY, 1990).

El almendro, desde tiempos inmemoriales, fue multiplicado en su mayor parte por semilla hasta finales del siglo XIX, manteniéndose, por su alogamia, en un estado próximo a la panmixia, caso raro dentro de las especies cultivadas (CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY, 1985).

La propagación clonal de las variedades provocó la aparición de los primeros problemas de polinización. Posteriormente, el uso de un número limitado de genitores en los programas de mejora, o incluso, en la selección empírica, produjo la aparición de los primeros casos de interincompatibilidad, por lo que fue necesario el diseño multivarietal de las nuevas plantaciones.

En este sistema, las variedades plantadas además de ser intercompatibles deben coincidir en su fecha de floración, con el fin de que se produzca una correcta interpolinización de las mismas para obtener unas buenas producciones comerciales (KESTER Y ASAY, 1975).

Ya a principios del siglo XX en Estados Unidos surgió la conciencia de la importancia de la caracterización de la capacidad polinizadora de sus variedades. Las primeras evaluaciones de incompatibilidad entre variedades se realizaron mediante ensayos de polinización cruzada en campo y la evaluación posterior de sus cuajados. De esta forma se empezaron a determinar los Grupos de Incompatibilidad en el almendro (GI) (TUFTS, 1919 TUFTS Y PHILP, 1922; KESTER Y ASAY, 1975). Con el fin de evitar cuajados erráticos en los ensayos de interincompatibilidad, producidos principalmente por condiciones climáticas adversas, se comenzó a estimar la intercompatibilidad entre variedades mediante el examen microscópico del crecimiento de los tubos polínicos tras cruzamientos en laboratorio (HERRERO *ET AL.*, 1977; SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1977). CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY (1985) empezaron a denominar los alelos de autoincompatibilidad en el almendro. Así, asignaron a 'Cristomorto' el genotipo S_1S_2 a 'Aï' S_3S_4 y a 'Tardy Nonpareil' S_7S_8 , y a partir de éstos dedujeron los genotipos S de varias variedades. Después KESTER *ET AL.* (1994a) comenzaron a denominar los alelos S mediante una letra S seguida de un superíndice alfabético (S^a , S^b , S^c y S^d), creando 7 GI a partir de los parentales utilizados con más frecuencia en California, 'Mission' (S^aS^b) y 'Nonpareil' (S^cS^d), y de sus posibles descendientes (S^aS^c , S^aS^d , S^bS^c y S^bS^d), así

como otras variedades interincompatibles con genotipo $S^dS^?$. El sistema de denominación que se acabó imponiéndose en el almendro fue el numérico, comúnmente utilizado en las otras especies. Estudios posteriores permitieron determinar las concordancias alélicas entre las denominaciones europea y americana, de manera que $S_8 = S^d$, $S_7 = S^c$ (KESTER *ET AL.*, 1994b), $S_1 = S^b$ y $S_5 = S^a$ (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1997).

Actualmente se están identificando nuevos alelos S mediante la determinación de las RNAsas estilares (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1997, 1999 y 2003) y marcadores de ADN (USHIJIMA *ET AL.*, 1998 y 2001; TAMURA *ET AL.*, 2000; MA Y OLIVEIRA, 2001; CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001 y 2003), indicándose la existencia de al menos 23 alelos de autoincompatibilidad (CERTAL *ET AL.*, 2002), aunque, se cree que puede haber muchos más. Con los nuevos genotipos S caracterizados, se han desarrollado 15 grupos de interincompatibilidad en el almendro (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos mediante técnicas moleculares han tenido que validarse mediante cruzamientos en campo y laboratorio.

El conocimiento de los genotipos S en las distintas variedades, junto con sus fechas de floración, permite una evaluación más precisa de la eficiencia en la polinización de las futuras plantaciones, diseñar los cruzamientos en los programas de mejora, o establecer las posibles relaciones genéticas que pueden existir entre las variedades (KESTER *ET AL.*, 1994a).

1.6.2 LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN EL ALMENDRO.

La autocompatibilidad es la capacidad de una planta fértil de producir cigotos tras su autopolinización. En el almendro existen algunos genotipos que muestran autocompatibilidad, debida a la posesión del alelo de autocompatibilidad (S_f), que muestra alelismo con el sistema de autoincompatibilidad S (SOCIAS I COMPANY, 1990).

El origen del alelo de autocompatibilidad (S_f) en el almendro es incierto. El alelo S_f pudo aparecer como consecuencia de una mutación de un alelo del locus S (GRASELLEY Y OLIVIER, 1976; SOCIAS I COMPANY, 1990), como ocurrió con otras especies autoincompatibles del género *Prunus* (CRANE Y LAWRENCE, 1956). Este tipo de mutación pudo tener mayor incidencia en la región italiana de la Apulia y se habría mantenido por los agricultores, gracias a la selección por su productividad y floración tardía (GRASELLEY, 1985; CROSSA-RAYNAUD Y GRASELLEY, 1985). Otros autores opinan que el alelo S_f procedería de *P. webbii* y se habría introducido en el almendro por una hibridación natural, en las zonas donde ambas especies conviven de forma silvestre, como en la región italiana de la Apulia (GODINI, 1979; REINA *ET AL.*, 1985), los Balcanes o España (SOCIAS I COMPANY, 1991). En

cualquier caso, la incorporación de este alelo tendría que ser reciente, debido a que las variedades tradicionales autocompatibles son heterocigóticas para el locus de autocompatibilidad (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1988).

La autocompatibilidad empezó a interesar a los mejoradores cuando ALMEIDA (1945) destacó la presencia de cuajados superiores al 30% tras la autopolinización en las variedades autocompatibles 'José Dias' y 'Duro Italiano'. Fue el primer indicio de la posibilidad de obtener producciones comerciales rentables en plantaciones con una única variedad autocompatible. En la década de los 70, aparecieron varias variedades autocompatibles, 'Filippo Ceo' en Francia, aunque de origen italiano (GRASSELLY Y OLIVIER, 1976), 'Mazzetto' en Tunisia (EL GHARBI, 1973), también de origen italiano, 'Exinograd' en Chipre, 'Tuono', 'Falsa barese', 'Ferrante' y 'Filippo Ceo' en Italia (GODINI, 1975), 'A-S-1' en España (HERRERO Y FELIPE, 1975) y 'Truoïto' en Grecia (MOUKHTOURI-STYLIANIDES, 1977).

Recientemente, en la India, se han encontrado 16 selecciones de material autóctono con elevada autocompatibilidad (KUMAR Y KUMAR, 2000), si bien no se han dado explicaciones sobre su posible origen. Esta autocompatibilidad podría proceder del melocotonero (SOCIAS I COMPANY, 2001), ya que en la región india del Himalaya, de donde proceden estos almendros autocompatibles, existen híbridos naturales entre estas dos especies (KISHORE Y RANDHAWA, 1993).

1.6.3 FUENTES DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD PARA EL ALMENDRO.

Además de los cruzamientos dentro de la misma especie, se han utilizado otros medios para transmitir la autocompatibilidad en el almendro. Un método utilizado es la introgresión al almendro de la autocompatibilidad presente en otras especies. La especie más utilizada ha sido el melocotonero, de manera que en el programa de mejora de la UC-Davis y el USDA se desarrolló una línea de mejora para obtener genotipos autocompatibles de almendro adaptados a las condiciones ambientales de California (KESTER, 1970). También en Estados Unidos, en programas privados, se obtuvo la variedad 'LeGrand', cuyo comportamiento no resultó satisfactorio (WEINBAUM, 1985) y recientemente, 'Garden Princess' (GRADZIEL, 2000), de la que no se ha comunicado su comportamiento agronómico. Actualmente, en la UC-Davis, se está trabajando en unas líneas de incorporación de la autocompatibilidad al almendro a través de la hibridación con especies del tipo melocotonero (*P. persica* (L.) Batsch y *P. mira* Koehne) y distintas especies emparentadas con el almendro (*P. webbii* (Spach) Vierh., *P. fenziiana* Fritsch y *P. argentea* (Lam.) Rehd.). La hibridación es seguida de dos retrocruzamientos, con el fin de recuperar lo más posible la variedad de almendro

originaria (GRADZIEL Y KESTER, 1998).

Otro sistema de obtener la autocompatibilidad es mediante la inducción de mutaciones. De esta manera se obtuvo la variedad 'Supernova', tras irradiar yemas vegetativas de la variedad italiana 'Fascionello' con Co^{60} (MONASTRA ET AL., 1988).

El desarrollo de nuevas técnicas de ingeniería genética, y en especial la transformación genética, va a hacer posible la introducción de caracteres de interés en variedades ya adaptadas. La posibilidad de regeneración de plantas, a partir de embriones transformados por *Agrobacterium tumefaciens*, parece ser un camino viable de transformación genética en el almendro (MIGUEL Y OLIVEIRA, 1999). La introducción de la autocompatibilidad mediante transformación genética puede ser factible en Estados Unidos, donde variedades altamente productivas y adaptadas como 'Nonpareil' y 'Mission' (DANDEKAR ET AL., 2002) son firmes candidatas para ello.

1.6.4 LA TRANSMISIÓN DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD Y SU DETERMINACIÓN

La autocompatibilidad es dominante sobre la autoincompatibilidad (SOCIAS I COMPANY, 1984) y su transmisión presenta una distribución mendeliana (DICENTA Y GARCÍA, 1993) (Fig 1.6).

La autocompatibilidad se ha convertido en un carácter imprescindible en la mejora en esta especie. Su introducción en los programas de mejora se realiza mediante cruzamientos intraespecíficos del tipo A, B, E y F (Fig.1.6) (DICENTA Y GARCÍA, 1993), en los que la planta autoincompatible suele ser una variedad o una selección de interés. En las progenies segregantes, será necesario eliminar cuanto antes los individuos autoincompatibles, con el fin de ahorrar espacio en las parcelas de mejora y no dedicar recursos a su mantenimiento. En el resto, se realizará la evaluación de los caracteres deseables durante el tiempo que se considere necesario y se realizará la selección (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1988).

Las variedades más utilizadas como donadoras de la autocompatibilidad en los programas de mejora son 'Genco', y en especial 'Tuono', obteniéndose 'Lauranne' y 'Steliette' ('Ferragnès' x 'Tuono') (GRASSELLI Y CROSSA-RAYNAUD, 1980) en Francia, y 'Moncayo' ('Tardive de la Verdrière' x 'Tuono'), 'Aylés' (polización libre de 'Tuono'), Blanquerna (polinización libre de 'Genco'), 'Cambra' ('Tuono' x 'Ferragnès') (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1999), 'Antoñeta' ('Tuono' x 'Ferragnès') y 'Marta' ('Ferragnès' x 'Tuono') (EGEA ET AL., 1999) en España. Curiosamente, se desconoce la genealogía de la variedad autocompatible 'Guara' (FELIPE Y SOCIAS I COMPANY, 1988) que ha sido la variedad más plantada durante la última década.

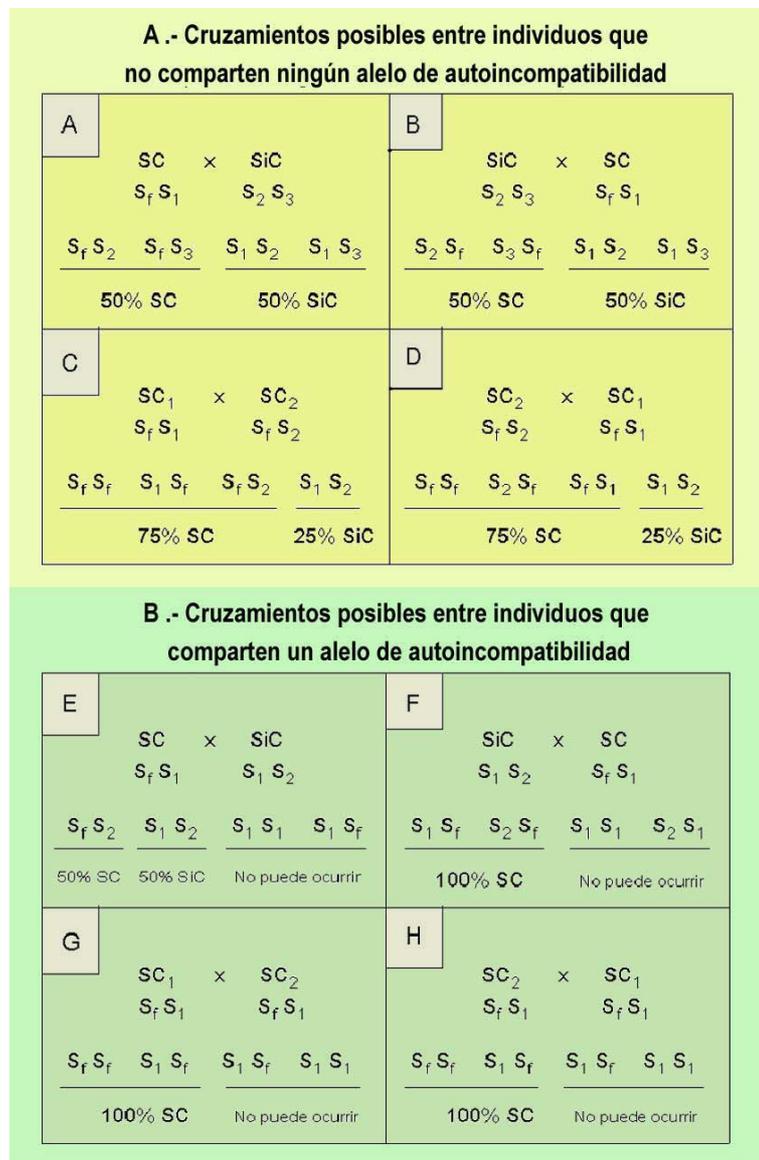


Fig. 1.6 Transmisión de la autocompatibilidad en el almendro (DICENTA Y GARCÍA, 1993).

Comúnmente, se han utilizado estudios de polinización para determinar la presencia de la autocompatibilidad en variedades y selecciones. Estos consisten en la evaluación de los cuajados de frutos producidos tras la autopolinización o la observación microscópica del crecimiento de los tubos polínicos propios hasta la llegada a la base del estilo. Estos ensayos requieren gran cantidad de tiempo y recursos del mejorador, ya que la planta tiene que permanecer en campo hasta que produce flores.

Recientemente se empezaron a identificar los genotipos de incompatibilidad en el almendro mediante métodos moleculares. Un método que ha mostrado su utilidad en la selección de individuos autocompatibles en progenies segregantes de mejora ha sido la separación de los extractos proteicos estilares mediante electroforesis y la identificación de S-RNasas (BATLLE *ET AL.*, 1997; BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1996, 1997, 1998, 1999 y 2003). Actualmente se está trabajando en el diseño de cebadores para la identificación de alelos *S* mediante la técnica PCR (polymerase chain reaction), previo clonado de varios de ellos (USHIJIMA *ET AL.*, 1998 y 2001; TAMURA *ET AL.*, 2000; CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001 y 2003; MA Y OLIVEIRA, 2001).

Las nuevas técnicas moleculares pueden permitir la eliminación temprana de las plantas autoincompatibles de la parcela tras la obtención de las primeras flores, realizando el análisis de las S-RNasas estilares, e incluso antes de ser plantadas en parcela, mediante la extracción de ADN de hojas y realizando la identificación alélica del locus *S* mediante PCR alelo específicas. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas moleculares en el almendro está en proceso de experimentación y investigación.

Existen diversos estudios agronómicos sobre la transmisión de la autocompatibilidad, bien mediante el cuajado obtenido en ramas embolsadas y autopolinizaciones en campo, bien mediante la observación del crecimiento de los tubos polínicos propios hasta la base del estilo en el laboratorio. Por otra parte, se han realizado muy pocos estudios de identificación de los alelos *S* en poblaciones de mejora mediante el análisis de las S-RNasas estilares. Actualmente, se está profundizando en la búsqueda de marcadores de ADN para la identificación de los alelos *S*. No parece posible la obtención de un sólo par de cebadores que amplifiquen todos los alelos de autoincompatibilidad, de manera que se están diseñando cebadores específicos de ADN para unos pocos alelos. Ello implica que hasta el momento no se ha caracterizado la transmisión de la autocompatibilidad en poblaciones de mejora mediante la combinación de las técnicas agronómicas y moleculares para la determinación de la autocompatibilidad.

1.7 LA ENDOGAMIA Y SUS EFECTOS EN EL ALMENDRO

Desde los primeros tiempos de la historia ha existido una tendencia a asociar la consanguinidad con efectos biológicos desfavorables, ya que suele ir acompañada por un debilitamiento general del material vegetal, manifestándose por la reducción del tamaño de las plantas, como consecuencia de un menor vigor, una tasa de fecundidad baja y un mayor número de plantas defectuosas.

Los efectos de la consanguinidad se acusan más en las especies alógamas que en las autógamas. Las especies alógamas están compuestas por un gran número de individuos genéticamente diferentes, muchos de los cuales portan genes recesivos perjudiciales ocultos en los loci heterocigóticos. La causa más probable para la reducción del vigor causada por la endogamia es la expresión de estos genes recesivos deletéreos, que se expresan en homocigosis, pero se mantienen silenciados por un alelo dominante en heterocigosis. Los alelos deletéreos se originan cuando la secuencia de DNA correspondiente a un alelo funcional se altera por una mutación, pasando a codificar el gen un producto defectuoso, que muestra una funcionalidad más o menos reducida, o simplemente el gen puede quedar tan dañado que puede perder su capacidad de codificación proteica. Las mutaciones afectan al DNA de todas las plantas y animales, de manera que todos ellos, contienen genes recesivos deletéreos. Sin embargo, en los cruzamientos no emparentados, es bastante improbable que se produzca homocigosis para estos genes dañados. Con los cruzamientos endogámicos, la probabilidad de que se produzca homocigosis en estos genes es mucho mayor. Además, debido a que las mutaciones deletéreas, son transmitidas a lo largo de las líneas familiares, los hermanos y hermanas tienen mucha más probabilidad de compartir los mismos alelos deletéreos respecto a los individuos no emparentados. En general, los efectos negativos de la expresión de estos genes dañados son plantas sin clorofila, con flores anormales, semillas defectuosas, etc., que tienen un efecto letal por impedir su reproducción o supervivencia. En otros individuos estos genes no producen su extinción directa, pero obstaculizan su desarrollo, afectando a su vigor, floribundidad y fecundidad. En muchas de estas plantas se producen sistemas radiculares deficientes, enanismo y deficiencia parcial de clorofila.

El almendro, como se ha indicado anteriormente, salvo unas pocas excepciones, tiene una naturaleza alógama y necesita de la polinización cruzada para producir semillas. Esta característica, junto a su propagación por semilla hasta finales del siglo XIX, mantuvo a la especie en un estado cercano a la panmixia, caso raro dentro de las especies cultivadas (CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY, 1985). Sin embargo, esta situación ha ido cambiando poco a poco, reduciéndose la base genética de la especie sensiblemente, primero con la selección empírica y propagación clonal mediante el injerto, y más tarde con la utilización de un número reducido de genotipos como parentales en los principales programas de mejora, sobre todo para la transmisión de la autocompatibilidad, apareciendo síntomas de consanguinidad en algunas descendencias (GRASSELLY, 1981; KESTER Y ASAY, 1975; SOCIAS I COMPANY, 1990).

Los síntomas de la consanguinidad observados en el almendro incluyen una reducción general del vigor, caracterizada por un desarrollo vegetativo anormalmente débil, que puede

desembocar en la aparición de individuos enanos, una producción reducida de flores, una proporción alta de flores estériles, el agrietamiento de la corteza del tronco, acompañado por exudaciones o "gomosis", a veces de tal gravedad, que causan la muerte de la planta, así como la aparición de necrosis en ramas y hojas de un año. Estos síntomas fueron descritos en progenies consanguíneas de 'Nonpareil' y 'Ai' por KESTER Y ASAY (1975) y GRASSELLY (1981), indicando su origen genético y no patógeno. Además, en muchos descendientes de la variedad autocompatible 'Tuono', tanto procedentes de su autopolinización como polinización abierta, se observó la necrosis antes citada (GRASSELLY Y OLIVIER, 1988), lo que podría hacer sospechar que 'Tuono' sea una variedad con consanguinidad, ya que podría proceder de una autopolinización o de un cruzamiento entre genotipos emparentados. Estos síntomas también aparecen en descendencias procedentes de retrocruzamientos, cruzamientos entre hermanos completos, cruzamientos de medios hermanos, así como en descendencias procedentes de autopolinizaciones de variedades autocompatibles (GRASSELLY, 1981). La depresión por consanguinidad puede, por lo tanto, representar un riesgo en la mejora del almendro debido a la reducción de la base genética utilizada en los cruzamientos (KESTER *ET AL.*, 1991) y la utilización repetida de 'Tuono' como donante de la autocompatibilidad en la mayoría de los programas de mejora del almendro (SOCIAS I COMPANYY, 2002).

1.8 DEBATE SOBRE LA TRANSMISIÓN DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN EL ALMENDRO

Desde que la autocompatibilidad se convirtió en un objetivo prioritario en la búsqueda de nuevas variedades de almendro, se ha estudiado la transmisión de este carácter en las progenies de mejora obtenidas porque esta transmisión difiere en función de los parentales implicados en el cruzamiento (SOCIAS I COMPANYY, 1990, DICENTA Y GARCÍA, 1993). Sin embargo, a lo largo del estudio de la transmisión de la autocompatibilidad ha habido ocasiones en que las proporciones fenotípicas esperadas no se cumplían. La transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' a las descendencias tras su cruzamiento con las variedades autoincompatibles 'Ferragnès' y 'Ferralise' (GRASSELLY *ET AL.*, 1985) es un ejemplo de estas diferencias.

El primer estudio de la transmisión de la autocompatibilidad desde 'Tuono' a sus descendencias lo realizaron SOCIAS I COMPANYY Y FELIPE (1977), mostrando que la autocompatibilidad no se transmitía a todos los descendientes lo que implicaba que la expresión del alelo S_f era dominante sobre los alelos S de autoincompatibilidad y que 'Tuono' era heterocigótico para este carácter.

Más tarde, GRASSELLY *ET AL.* (1981) estudiaron varias descendencias procedentes de

cruzamientos entre la variedad autocompatible 'Filippo Ceo' y algunas otras autoincompatibles, así como las descendencias de la autopolinización de distintas variedades autocompatibles. El grado de compatibilidad se relacionó con los cuajados obtenidos tras realizar la autopolinización de los individuos de estas descendencias por medio del embolsamiento a prueba de insectos de sus ramas. Tras analizar los cuajados obtenidos, se sugirió la hipótesis de que las variedades autocompatibles eran homocigóticas para la autocompatibilidad, y que los cuajados nulos o bajos de ciertas plantas no eran debidos a la autoincompatibilidad, sino mayoritariamente a efectos de endogamia.

Posteriormente, la condición homocigótica del locus S en 'Filippo Ceo' fue descartada por SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1982) al examinar los cruzamientos de GRASELLEY *ET AL.* (1981) de manera conjunta, encontrando un buen ajuste a la proporción 1 : 1 (individuos autocompatibles : individuos autoincompatibles).

En una contribución posterior, GRASELLEY Y OLIVIER (1984) estudiaron distintas descendencias de la variedad autocompatible 'Tuono' utilizada como parental masculino, distinguiendo la transmisión de la autocompatibilidad según el parental femenino. Así, en los cruzamientos con 'Tardy Nonpareil' y 'Ferrastar' se obtuvo un ajuste perfecto a la proporción 1:1, de acuerdo con la hipótesis de la condición heterocigótica del locus S de 'Tuono'. En los cruzamientos con 'Ferragnès' (Cuadro 1.3) y dos selecciones ('Cristomorto' x 'Tardy Nonpareil') - 28 y ('Ferraduel' x 'Tardy Nonpareil') -9, por el contrario, predominaron los individuos autocompatibles. En estos casos, el predominio de individuos autocompatibles se consideró un resultado anómalo, y se indicó como posible causa la presencia de un antepasado común, 'Cristomorto', que podía tener relaciones de parentesco con 'Tuono', ya que ambas proceden de la región italiana de la Apulia. Sin embargo, en la descendencia de 'Ferrastar' x 'Tuono' la proporción de individuos autocompatibles y de autoincompatibles fue similar, y 'Ferrastar' procede del cruzamiento 'Cristomorto' x 'Ardéchoise', por lo que también presenta a 'Cristomorto' en su genealogía (GRASELLEY Y CROSSA-RAYNAUD, 1980).

Seguidamente, GRASELLEY *ET AL.* (1985) completaron los resultados presentados por GRASELLEY Y OLIVIER (1984), añadiendo los resultados de la transmisión de la autocompatibilidad de los cruzamientos de 'Ferralise' (Cuadro 1.3) y la selección ('Ferralise' x ('Cristomorto' x 'Ai'))-3 con 'Tuono', ajustándose de manera aproximada a la proporción 1:1. En este trabajo, GRASELLEY *ET AL.* (1985) presentaron una hipótesis para explicar el predominio de individuos autocompatibles en los cruzamientos de 'Ferragnès' (Cuadro 1.3), ('Cristomorto' x 'Tardy Nonpareil') - 28 y ('Ferraduel' x 'Tardy Nonpareil') - 9, en las que 'Tuono' siempre ha sido el parental femenino. Esta hipótesis suponía que el alelo de incompatibilidad de 'Tuono' debía estar también presente en las variedades

utilizadas como parentales femeninos, que lo habrían heredado de 'Cristomorto'. De esta manera, asignaron el genotipo S_1S_7 a 'Tuono' y S_1S_2 a 'Cristomorto' y dedujeron que 'Ferragnès' (S_1S_3), habría heredado el alelo S_1 de 'Cristomorto' y el S_3 de 'Aï'. Esta configuración alélica explicaría el predominio de individuos autocompatibles en el cruzamiento 'Ferragnès' x 'Tuono', ya que sólo los granos de polen de 'Tuono' portadores del alelo S_7 serían capaces de progresar en los estilos de 'Ferragnès'. Este mismo razonamiento debería ser válido para el cruzamiento 'Ferralise' x 'Tuono', ya que 'Ferralise' y 'Ferragnès' son interincompatibles, al poseer los mismos alelos S (CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY, 1985). Sin embargo, en la descendencia del cruzamiento 'Ferralise' x 'Tuono' no se observó un predominio de individuos autocompatibles, sino sólo una ligera desviación de la proporción 1:1.

DICENTA Y GARCÍA (1993) obtuvieron una descendencia totalmente autocompatible en un cruzamiento de 'Ferragnès' x 'Tuono' (Cuadro 1.3), confirmando la existencia de un alelo en común entre 'Ferragnès' y 'Tuono', como indicaron GRASSELLY *ET AL.* (1985). Sin embargo, observaron como en la descendencia recíproca 'Tuono' x 'Ferragnès' (Cuadro 1.3), la proporción de individuos autocompatibles resultó mayor de la esperada, tal como ya habían observado SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1988) (Cuadro 1.3).

SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1994), tras confirmar la inter-incompatibilidad de 'Ferragnès' y 'Ferralise', indicaron que su diferente comportamiento en la transmisión de la autocompatibilidad procedente de 'Tuono' a sus descendencias no se podía atribuir a sus alelos S , sino a otros factores genéticos, probablemente a genes letales o deletéreos que podían afectar a estas dos variedades de forma diferente, concordando con las hipótesis anteriores de SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1988) y SOCIAS I COMPANY (1990). Estas mismas hipótesis parecen deducirse de la observación del crecimiento de los tubos polínicos en todas las combinaciones posibles que afecten a 'Tuono', 'Ferragnès' y 'Ferralise' (SOCIAS I COMPANY Y ALONSO, 2004).

BALLESTER *ET AL.* (1998) estudiaron otra población de 'Ferragnès' x 'Tuono' (Cuadro 1.3), observando que la mayoría de individuos eran autocompatibles. La determinación alélica del locus S mediante la identificación de las S-RNAsas, indicó que salvo en un individuo, en todos se había transmitido el alelo S_7 de 'Tuono', y que los alelos de 'Ferragnès' se transmitieron a la descendencia en la proporción 1:1.

En otra población de 'Ferragnès' x 'Tuono', PALASCIANO *ET AL.* (1998) obtuvieron unos resultados de transmisión anómalos (Cuadro 1.3), en una proporción 3:2, si bien sólo se evaluaron los individuos que habían superado una primera fase de la selección, por lo que la presencia de incompatibilidad en estos individuos no parece estar relacionada con la ocurrencia de endogamia, sino más bien por el método de evaluación mediante el embolsado de ramas.

Para concluir esta pequeña revisión hay que reseñar que DUVAL *ET AL.* (2001) estudiaron la misma población que GRASELLY *ET AL.* (1985) de 'Ferralise' x 'Tuono', la única reseñada en la bibliografía, ya que todas las anteriores son 'Ferragnès' x 'Tuono'. Su conclusión, tras evaluar la expresión de las RNAsas estilares, fue que la transmisión de la autocompatibilidad se produjo en todos los descendientes (Cuadro 1.3), sugiriendo de esta manera que el alelo S_r de 'Tuono' se transmitió de forma similar en la progenie de 'Ferralise' x 'Tuono' a la de 'Ferragnès' x 'Tuono', de acuerdo con la identidad de sus alelos S.

Cuadro 1.3 Transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' en sus descendencias con 'Ferragnès' y 'Ferralise'.

Familias	Total	AC	AI	Método	Cita
'Ferragnès' x 'Tuono'	149	136	13	Embolsado	GRASELLY Y OLIVIER, 1984
'Ferragnès' x 'Tuono'	154	142	12	Embolsado	GRASELLY <i>ET AL.</i> , 1985
'Ferralise' x 'Tuono'	36	21	15		
'Tuono' x 'Ferragnès'	18	11	7	Microscopía	SOCIAS I COMPANY, 1988
'Ferragnès' x 'Tuono'	50	50	0	Microscopía	DICENTA Y GARCÍA, 1993
'Tuono' x 'Ferragnès'	53	36	17		
'Ferragnès' x 'Tuono'	49	29	20	Embolsado	PALASCIANO <i>ET AL.</i> , 1998
'Ferragnès' x 'Tuono'	58	53	5	Embolsado	BALLESTER <i>ET AL.</i> , 1998
		58	0	Microscopía	
		58	0	S-RNAsas	
'Ferralise' x 'Tuono'	31	30	1	S-RNAsas	DUVAL <i>ET AL.</i> , 2001

AC: nº de individuos autocompatibles; AI: nº de individuos autoincompatibles.

1.9 OBJETIVOS Y ESTRUCTURA DE LA MEMORIA.

La hipótesis de partida de esta tesis es que las diferencias observadas previamente en la transmisión de la autocompatibilidad procedente de 'Tuono' en las descendencias obtenidas en los cruzamientos con 'Ferragnès' y 'Ferralise' (Apartado 1.8), están causadas por la consanguinidad presente en la variedad 'Ferralise', ya que, es la única variedad de almendro que procede del cruzamiento entre dos hermanas completas, 'Ferraduel' y 'Ferragnès'.

Por ello, se planteó realizar un estudio detallado de la transmisión de la autocompatibilidad en un conjunto de familias obtenidas por el cruzamiento de 'Ferragnès' y 'Ferralise' con 'Tuono', en los dos sentidos posibles de cruzamiento, combinando las técnicas de la determinación agronómica de la autocompatibilidad y las técnicas moleculares emergentes para ahondar en su evaluación.

Así para la realización de esta tesis se han abordado los siguientes objetivos:

Objetivo 1. Determinación de las proporciones fenotípicas de la autocompatibilidad / autoincompatibilidad. Para ello se realizó en laboratorio la autopolinización manual de flores de las

distintas plantas y se observó la llegada o no de tubos polínicos a la base del estilo a través de un microscopio de luz ultravioleta incidente. Este estudio fisiológico de la autocompatibilidad se documenta en el apartado 3º de esta memoria.

Objetivo 2. Identificación de los genotipos del locus S en los distintos individuos de las descendencias mediante la expresión de las S-RNAsas estilares. Para ello se analizaron los patrones de distribución de las RNAsas en el conjunto de los extractos proteicos estilares mediante su separación electroforética, como se detalla en el apartado 4º.

Objetivo 3. Aplicación y desarrollo de marcadores de ADN para la identificación de los alelos S y comprobación de la correlación con la expresión de las distintas S-RNAsas implicadas, para la determinación de las proporciones genotípicas de los genotipos S. El uso de marcadores moleculares específicos en la identificación del alelo de autocompatibilidad y de los alelos de autoincompatibilidad mediante la técnica de la PCR se analiza en el apartado 5º de esta memoria.

Objetivo 4. Correlación de las proporciones fenotípicas y genotípicas de las descendencias y análisis de la utilidad de las diferentes metodologías aplicadas en la identificación de la autocompatibilidad. La confrontación entre la compatibilidad agronómica y la genética se analiza en el apartado 5º y el estudio de los individuos en los que la consanguinidad interfiere en la expresión de la autocompatibilidad se analiza en el apartado 6º.

Objetivo 5. Evaluación de la conveniencia de la utilización de ramas embolsadas para la determinación de la capacidad autógena de los descendientes autocompatibles y de la relación entre la morfología de la flor y la autopolinización natural. El análisis de los cuajados obtenidos en individuos autocompatibles descendientes de 'Tuono' y su carencia de relación con la morfología floral se estudia en el apartado 7º.

Objetivo 6. Evaluación de la capacidad autopolinizadora en individuos autocompatibles sin síntomas de consanguinidad con antepasados posiblemente emparentados ('Cristomorto' y 'Tuono'), y discusión de su posible utilización como genitores. Para ello, se va a detallar la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos en el estilo en polinizaciones con diferente grado de parentesco en plantas procedentes de estas poblaciones de mejora en el apartado 8º.

2. MATERIAL VEGETAL

2. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en la realización de esta tesis pertenece a las descendencias de cuatro cruzamientos (Fig. 2.1), creadas para la selección de individuos autocompatibles en el programa de mejora genética del almendro desarrollado en la Unidad de Fruticultura del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (C.I.T.A.).

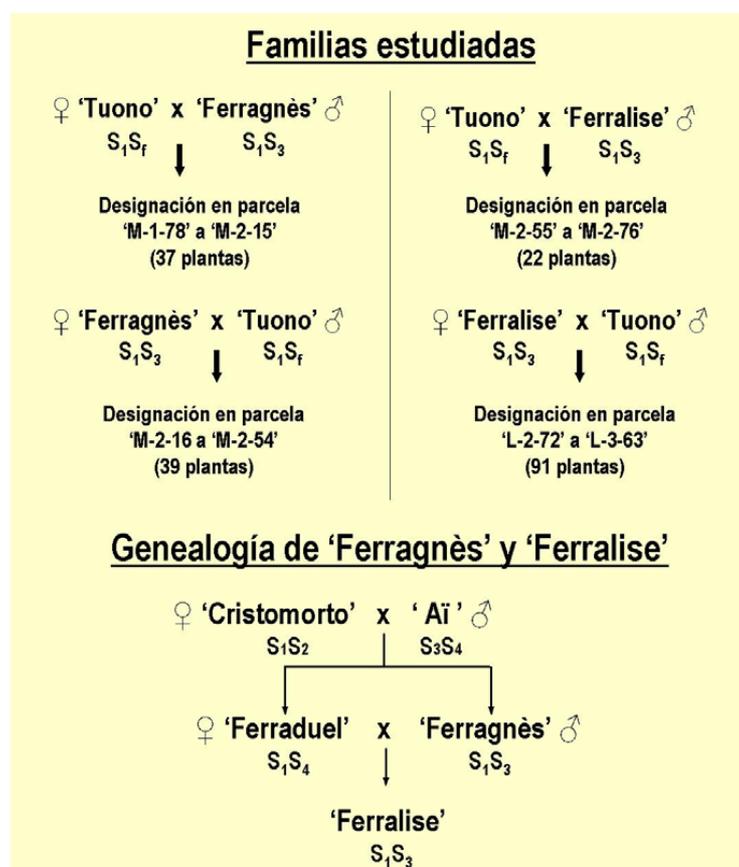


Fig. 2.1 Composición alélica de las descendencias estudiadas y genealogía de 'Ferragnès' y 'Ferralise'.

Como se puede observar en la Fig. 2.1, 'Ferralise' procede del cruzamiento de dos hermanas completas, 'Ferraduel' y 'Ferragnès', con lo que presenta un coeficiente de endogamia de 0,25 (LANSARI *ET AL.*, 1994). Es posible que la consanguinidad observada en parte de estas descendencias, no sólo se deba a la aportación genética por parte 'Ferralise', sino también a la de 'Tuono' y a su posible parentesco con 'Cristomorto', parental femenino de 'Ferraduel' y 'Ferragnès', ya que 'Tuono' y 'Cristomorto' proceden de la región italiana de la Apulia y poseen el alelo S_1 de autoincompatibilidad. En todo caso, los descendientes de 'Ferragnès' deberían mostrar un menor

efecto de la consanguinidad que los de 'Ferralise'. Sin embargo, los efectos de la consanguinidad sobre la supervivencia de los individuos hasta la evaluación de la transmisión de la autocompatibilidad, no parecen tener influencia según el parental autoincompatible, sino que parece tener más influencia el sentido del cruzamiento, presentando más mortalidad los individuos de las familias en las que 'Tuono' fue utilizado como parental femenino.

Los cruzamientos que generaron las descendencias estudiadas se realizaron durante la primavera de 1993. En otoño de ese año se recogieron los frutos (Cuadro 2.1) se estratificaron durante dos meses. En diciembre se colocaron en cajoneras de vivero, donde permanecieron desarrollándose durante todo el año 1994. En enero de 1995, se transplantaron en parcela colocándose a una distancia de 10 a 20 cm (Fig. 2.2). Cuatro años más tarde, se empezaron a recoger muestras de flores, para realizar los estudios de la autocompatibilidad en estas poblaciones.



Fig. 2.2 Detalle de la distancia de plantación y etiquetado del material vegetal estudiado.

Cuadro 2.1 Porcentajes de supervivencia respecto a semillas obtenidas en los cruzamientos.

Cruzamiento origen	Semillas obtenidas	Plantas a parcelas	Plantas en evaluación
'Tuono' x 'Ferragnès'	78	66 (84,6%)	37 (47,4%)
'Ferragnès' x 'Tuono'	76	41 (53,9%)	39 (51,3%)
'Tuono' x 'Ferralise'	72	36 (50,0%)	22 (30,5%)
'Ferralise' x 'Tuono'	133	111 (83,4%)	91 (68,4%)

A continuación se describen los parentales utilizados en las poblaciones estudiadas y sus antecesores conocidos.

'Ferragnès'. Variedad autoincompatible francesa, obtenida por Charles Grasselly (INRA) del cruzamiento 'Cristomorto' x 'Ai'. Comenzó a difundirse en 1967, teniendo un gran éxito en el área mediterránea. Variedad de referencia. Muestra un vigor medio, con porte semi-erecto, poco ramificado. La floración es tardía, sobre ramos mixtos y, preferentemente, en ramilletes de mayo. Muestra una elevada densidad de flor. La época de recolección es media y su recolección es fácil. El descascarado es mediocre por mostrar cáscara semi-dura y con capas. Buen rendimiento al descarado, en torno al 40%, aunque difícil por esta presencia de capas. Apta para repostería y, por no presentar pepitas dobles, también para peladillas. Variedad muy productiva, con buena adaptación. Fácil de formar y de podar, pero sensible a *Fusicoccum*.

'Ferralise'. Variedad autoincompatible francesa, obtenida por Charles Grasselly (INRA) del cruzamiento 'Ferraduel' x 'Ferragnès'. Comenzó a comercializarse en 1980, no alcanzando el éxito esperado. Presenta un vigor medio, con porte erecto muy ramificado. Florece más tarde que 'Ferragnès' sobre ramos mixtos y ramilletes de mayo, y muestra buena densidad floral. Los pétalos son blancos y el tamaño floral es medio-pequeño. Muestra una facilidad de recolección y de descascarado medias. La maduración es medio-temprana. Tiene cáscara semi-dura y el rendimiento al descascarado es bajo, del 28%. No presenta pepitas dobles y tienen un buen sabor, lo que las capacita para todos los usos. Es una variedad que pese a tener la floración muy tardía sufre heladas con facilidad, ya que es sensible al frío incluso antes de abrir la yema floral. Es sensible al *Fusicoccum*.

'Tuono'. Variedad autocompatible de genealogía desconocida. Originaria de la Apulia (Italia), se ha extendido por los países mediterráneos, en los que se ha utilizado ampliamente en los programas de mejora como donante de la autocompatibilidad. Árbol de buen vigor, con porte abierto y relativamente poco ramificado. Prácticamente florece sobre ramilletes de mayo, lo que le otorga una alta densidad floral. La floración es tardía y la maduración es de semitemprana a temprana. Es muy productiva. Se recolecta y descascara fácilmente. El fruto tiene cáscara dura, con un rendimiento medio, del 35%, y un porcentaje de pepitas dobles alto, del 25 al 35%. La pepita tiene buen sabor y aspecto, adaptable para todo uso. Entra rápidamente en producción y es bastante tolerante a heladas tardías, aunque es sensible a *Polystigma*.

'Ai'. Antigua variedad autoincompatible francesa de origen desconocido, bastante utilizada en el programa de mejora francés. Se ha tomado como variedad de referencia en muchos países del mediterráneo. Árbol vigoroso, de porte caedizo muy ramificado, característica que la hace de difícil poda. Muestra floración tardía sobre ramos mixtos, con una densidad abundante. El color de sus flores es blanco. Presenta una época de maduración media. El descascarado no es muy fácil debido a su cáscara semi-mollar. Rendimiento al descascarado del 40 al 42%. La proporción de pepitas dobles es muy baja. Las pepitas son de buena calidad, apropiadas para pastelería y aperitivos.

'Cristomorto'. Variedad autoincompatible originaria de la Apulia (Italia) de origen desconocido, bastante utilizada en algunos programas de mejora por su floración tardía. Árbol de porte semi-erecto, vigoroso, con ramificación media-escasa. Floración en ramilletes de mayo abundante, aunque un poco vecera, lo que conlleva una producción un tanto alternante. La fecha de maduración es media, es fácil de recolectar y descascarar. Tiene cáscara dura. El rendimiento al descascarado es del 30%. Muestra de un 20 a un 25% de pepitas dobles. Pepitas de buena calidad aptas para todo uso. Conviene plantarla en regadío, para aminorar la vecería.

Para la evaluación de la capacidad polinizadora y la dinámica de los tubos polínicos en algunos individuos de las poblaciones estudiadas, se tomaron pistilos y polen testigo de las siguientes variedades:

'Marcona'. Variedad autoincompatible procedente del Levante de España, probablemente de Alicante, con difusión a nivel nacional y cultivada en otros países. Muestra un vigor medio, con porte medio y ramificación abundante. Florece sobre ramos mixtos y brotes cortos. Muestra flores pequeñas, muy densas, con pétalos rosados y estrechos. La época de floración es media-temprana. Suele dar buenas producciones, aunque a veces es vecera. La fecha de maduración es media respecto a las otras variedades, mostrando facilidad de recolección y un excelente descascarado. Presenta un fruto redondeado, de cáscara dura, y un rendimiento al descascarado del 24 al 27%. Casi no tiene pepitas dobles, del 0 al 2%. Almendra de tamaño medio a grande, redondeada, con una forma muy característica y definitoria. Calidad excelente, para elaborar turrón tipo Alicante y almendra frita y salada. Variedad exigente en abonado y cuidados como la poda. Actualmente es la variedad que más se cotiza en el mercado por sus excelentes cualidades organolépticas.

'Titan'. Variedad originaria de California, procedente de la polinización libre de 'Tardy Nonpareil', seleccionada por su floración tardía con el propósito de la obtención de semillas híbridas

naturales almendro x melocotonero producto de su polinización por el melocotonero 'Nemaguard', para la producción de patrones francos (JONES, 1972). Como variedad no ha presentado interés comercial y se ha utilizado en algún programa de mejora como parental de floración tardía (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1999). Presenta un fruto amigdaloides, de cáscara blanda bien cerrada, y un rendimiento al descascarado en torno al 60%. No suele tener pepitas dobles. Almendra de tamaño medio a grande, con forma elíptica. El sabor de su pepita es de agradable a bueno.

**3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN
LAS PROGENIES MEDIANTE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA
DE LA INTERACCIÓN POLEN-ESTILO**

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN LAS PROGENIES MEDIANTE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA INTERACCIÓN POLEN-ESTILO

3.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado en la introducción general (Apartado 1.8), la mayoría de los estudios de la transmisión de la autocompatibilidad procedente de 'Tuono' a las descendencias obtenidas en los cruzamientos con 'Ferragnès' y 'Ferralise', han sido determinaciones fenotípicas, principalmente mediante la observación de los cuajados producidos en ramas embolsadas.

Los ensayos en campo son necesarios pero, sin embargo, no suelen ser concluyentes, debido a la influencia de muchas variables exteriores que causan diferencias significativas en el cuajado de un año a otro, o entre diferentes localidades (SOCIAS I COMPANY ET AL., 2002). En las determinaciones de la autocompatibilidad mediante el cómputo de los frutos cuajados en ramas embolsadas, debe considerarse la presencia de factores negativos, que pueden disminuir el cuajado, no relacionadas con la autocompatibilidad polen-estilo de la planta. La presencia de heladas desde el conteo de las yemas de flor hasta el conteo final de los frutos, pueden reducir e incluso anular el cuajado de frutos. La manipulación de las ramas cuando se coloca y se retira la bolsa suele dañar parte de las yemas de flor y de los frutos pequeños, que acaban cayéndose, obteniendo un cuajado final no real. Los vientos fuertes hacen golpear las ramas embolsadas produciendo un efecto "ariete", desprendimiento yemas dentro de las bolsas, con su influencia reductora en la estimación del cuajado. Las condiciones ambientales en el interior de la bolsa, principalmente la temperatura y la humedad, son distintas a las que soporta el resto de la planta. Se desconoce si el diferente ambiente en el interior de la bolsa influye en el crecimiento inicial del fruto, o si los frutos sufren estrés en la adaptación a las nuevas condiciones tras la retirada de la bolsa. Además, el cuajado obtenido no sólo depende de la autocompatibilidad de la planta, sino también de su capacidad de autopolinización, sin la presencia de vectores entomófilos del polen, es decir, se evalúa la autogamia de la planta, pero condicionada por unos factores ambientales impredecibles, que en muchos casos la desvirtúan.

Una forma de evitar los problemas relacionados con el trabajo en el campo y las contingencias ambientales que pueden afectar al estudio de la autocompatibilidad, es la realización de la autopolinización manual en flores individuales en el laboratorio y observar posteriormente a través del microscopio, el crecimiento de los tubos polínicos propios hasta la base del estilo.

Las autopolinizaciones en laboratorio se pueden realizar en ramas cortadas, emasculando y polinizando manualmente sobre ellas, pero ello requiere una gran cantidad de espacio, una alta densidad de yemas florales (SOCIAS I COMPANY, 1988), y puede suponer un daño importante en plantas jóvenes. Gran parte de estos problemas puedan ser solucionados mediante la recogida de flores individuales en parcela, su emasculación en laboratorio, y colocación en mallas flotantes o espuma de florista impregnada con agua, y su posterior polinización manual. Esta técnica permite recoger las yemas florales en el momento fenológico preciso, en varios días si es necesario o si la planta tiene pocas flores por su juventud, así como un estudio individualizado de cada flor. Los resultados de los ensayos en laboratorio son totalmente correlacionables con los de campo (SOCIAS I COMPANY, 2001), por lo que presentan una gran fiabilidad.

La tinción de la callosa de los tubos polínicos (CURRIER, 1957) con lacmoide (CHEADLE *ET AL.*, 1953) o con azul de anilina (LINSKENS Y ESSER, 1957), permite observar mediante el microscopio el comportamiento de los tubos polínicos y analizar la naturaleza de las polinizaciones realizadas en el laboratorio o en el campo. En las polinizaciones autoincompatibles se puede determinar el nivel del estilo al que se produce la parada del crecimiento y la expresión morfológica de la autoincompatibilidad en los tubos polínicos, como el crecimiento tortuoso final y el engrosamiento de sus extremos (SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 1976). En las polinizaciones compatibles, los tubos polínicos progresarán a través del estilo y una porción de ellos, llegarán a la base del estilo (SOCIAS I COMPANY Y ALONSO, 2004). Además, si se recogen muestras separadas en el tiempo desde que se realiza la polinización es posible determinar el momento de la parada de los tubos polínicos en polinizaciones autoincompatibles, calcular la tasa de crecimiento de los tubos polínicos en diferentes períodos y estimar el período efectivo de polinización.

Por todas estas razones, se decidió caracterizar el fenotipo de autocompatibilidad / autoincompatibilidad en las plantas de las progenies de 'Tuono' con las variedades 'Ferragnès' y 'Ferralise' mediante la autopolinización de flores individuales en laboratorio.

Las variedades 'Ferragnès' y 'Ferralise' comparten el alelo S_1 con 'Tuono' (GRASSELLY *ET AL.*, 1985), por lo que las proporciones fenotípicas esperadas (Fig. 3.1) deberían estar de acuerdo con las propuestas en los sistemas de incompatibilidad gametofítica (EAST Y MANGLESDORF, 1925), confirmadas para el almendro por DICENTA Y GARCÍA (1993). En los cruzamientos en los que 'Tuono' fue el parental femenino, la mitad de la descendencia debería ser autocompatible y la otra mitad autoincompatible. En las familias en las que 'Tuono' fue el parental masculino, las plantas obtenidas deberían ser todas autocompatibles, ya que sólo los granos de polen portadores del alelo S_f ,

estarían capacitados para superar las barreras de autoincompatibilidad de los pistilos de 'Ferragnès' y 'Ferralise' y aportar su dotación genética a la nueva generación.

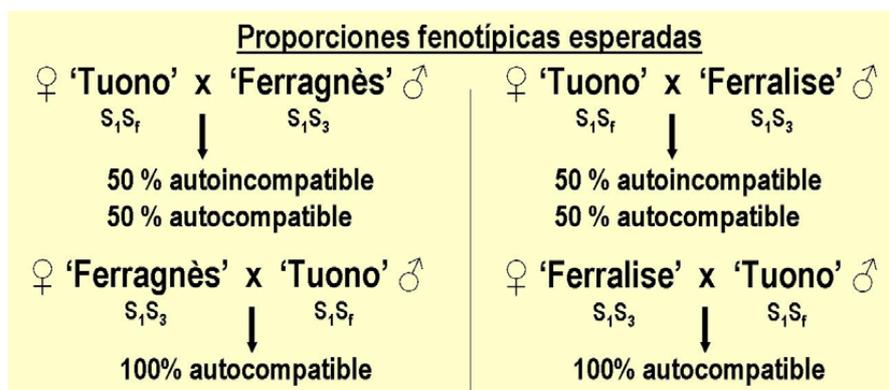


Fig. 3.1 Proporciones fenotípicas esperadas en las descendencias.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS Y AUTOPOLINIZACIÓN MANUAL

Durante las floraciones de 1998 a 2003, se recolectaron en los árboles de las familias (Fig. 2.1) una muestra al azar de 20 yemas de flor en estado D (FELIPE, 1977) con la máxima longitud de pedúnculo posible. Las yemas de cada individuo se colocaron en pequeñas bolsas debidamente etiquetadas, manteniéndolas frescas dentro de una nevera portátil, si la temperatura ambiental lo aconsejaba, hasta su traslado al laboratorio.

Una vez en laboratorio, las yemas se emascularon mediante unas pinzas especiales, dejando solamente el pistilo con la base del receptáculo floral y el pedúnculo (Fig.3.2). Las flores emasculadas se apoyaron cuidadosamente en mallas de plástico semirígido flotantes en el interior de bandejas, lo que permite el contacto del pedúnculo con el agua contenida en la bandeja (Fig.3.3). El polen de los 20 botones emasculados se recogió en pequeñas bandejas etiquetadas de papel, que se colocaron en bancadas a la temperatura del laboratorio, consiguiéndose una rápida dehiscencia de las anteras. Durante el proceso de emasculación y extracción del polen se extremaron las precauciones para evitar la contaminación con polen extraño, limpiando con etanol de 96° las superficies e instrumentos utilizados en cada cambio de muestra.

A las 48 horas de la emasculación se procedió a la autopolinización manual de los 20 pistilos de cada muestra, ya que se considera que el estigma está totalmente receptivo. El proceso de autopolinización manual se realizó en cada muestra de la forma siguiente: limpieza de las manos con alcohol de 96°, vertido de las anteras en un tubo de ensayo estéril, agitación del tubo tapándolo

con la yema del dedo índice y polinización frotando suavemente la yema del dedo índice sobre los estigmas.

A las 96 horas desde la autopolinización manual, tiempo más que suficiente para que los tubos polínicos lleguen a la base del estilo (SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 1976) a la temperatura del laboratorio (media día-noche de unos 15°C), se retiraron los pistilos del resto de la flor, introduciéndolos en pequeños frascos de cristal etiquetados con 5 ml de sulfito sódico al 5%. Seguidamente los frasquitos se mantuvieron en el autoclave a 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos, produciéndose el ablandamiento de los tejidos y la esterilización de las muestras de manera que éstas puedan conservarse perfectamente en un frigorífico a 4°C, libres de contaminación por hongos y bacterias hasta su observación.

3.2.2 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS TUBOS POLÍNICOS

La tinción de las muestras se realizó por inmersión de los estilos en azul de anilina al 0,1% en fosfato potásico 0,1 N, durante la noche previa a la observación microscópica. Previamente, los estilos se separaron del ovario y se les eliminó la pilosidad, que dificulta la observación, mediante una aguja de laboratorio, dejando sólo el tejido transmisor de los estilos (SOCIAS I COMPANY, 1979). Una vez teñidos, se colocaron ordenadamente 6 estilos sobre un portaobjetos y se realizó el aplastamiento del tejido estilar con ayuda del cubreobjetos, para su observación mediante el microscopio de fluorescencia ultravioleta (LINSKENS Y ESSER, 1957). Para ello se utilizó un microscopio Leitz Ortholux II, con un sistema de luz ultravioleta incidente incorporado, que utiliza como fuente luminosa una lámpara de alta presión de mercurio Osram HBO 200 W/4 (Fig. 3.4).

3.2.3 DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PENETRACIÓN DE LOS TUBOS POLÍNICOS EN EL TEJIDO ESTILAR

En todas las muestras se descartaron los pistilos en los que se observó una falta de polen en el estigma o una deficiente germinación y penetración en el tejido estigmático. Una observación anual se consideró positiva para la autocompatibilidad cuando una muestra de al menos 6 pistilos presentó la llegada de tubos polínicos propios a la base del pistilo de al menos el 50% de la muestra. Una planta se considera autocompatible cuando se producen dos o más observaciones anuales positivas, y autoincompatible si esto no sucede. En el caso de no llegar los tubos polínicos propios a la base del estilo, se anotó la altura a la que se detenían (en el primer, segundo o tercer tercio del estilo), así como los casos probables, pero sin certeza, de la llegada de tubos polínicos a la base del estilo. En los estilos con tubos polínicos en sus bases, se anotó su cantidad aproximada.

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de varianza y de separación de medias mediante el programa estadístico SAS V8 (SAS, 1999) y con las proporciones fenotípicas obtenidas se realizó la prueba de bondad de ajuste χ^2 con la corrección de continuidad de YATES (1934).

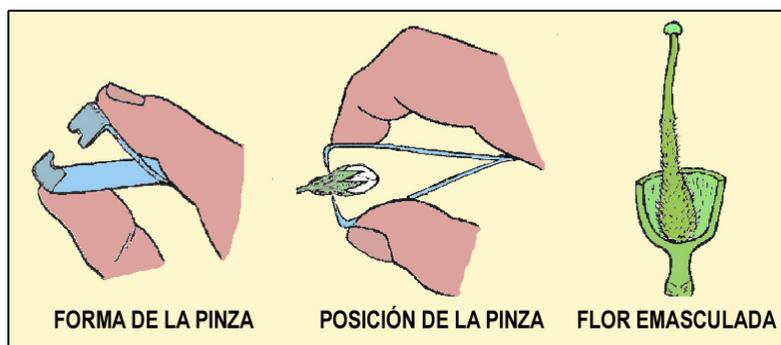


Fig. 3.2 Emasculación de las flores (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1977).



Fig. 3.3 Detalle de la colocación de las flores en bandeja.



Fig. 3.4 Microscopio de fluorescencia.

3.3.RESULTADOS

3.3.1 FENOTIPO EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE PISTILOS CON TUBOS POLÍNICOS EN LA BASE DEL ESTILO

En los Cuadros 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 se muestran los resultados del crecimiento de los tubos polínicos para los individuos de las distintas familias durante los años de estudio.

Cuadro 3.1 Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès'. Fenotipo asignado según los resultados.

Nº Planta	Año						Total	%	Fenotipo
	1998	1999	2000	2001	2002	2003			
M-1-78		0 de 6		12 de 14	11 de 12		23 de 32	72	Autocompatible
M-1-79			3 de 12		11 de 12	1 de 3	15 de 27	56	Autocompatible
M-1-80	0 de 3	0 de 2		0 de 3	0 de 12		0 de 20	0	Autoincompatible
M-1-81			12 de 12	11 de 12			23 de 24	96	Autocompatible
M-1-82	0 de 6		0 de 12				0 de 18	0	Autoincompatible
M-1-83		0 de 6	0 de 12	0 de 12			0 de 30	0	Autoincompatible
M-1-84			0 de 12	1 de 12			1 de 24	4	Autoincompatible
M-1-85			0 de 4			11 de 11	11 de 15	73	Dudoso
M-1-86		0 de 6	12 de 12	12 de 12	12 de 12	12 de 12	48 de 54	88	Autocompatible
M-1-87	4 de 12	3 de 6	12 de 12	9 de 9			28 de 39	72	Autocompatible
M-1-88						2 de 12	2 de 12	17	Falta de datos
M-1-89				1 de 8	0 de 8		1 de 16	6	Autoincompatible
M-1-90		1 de 2	12 de 12	11 de 12			24 de 26	92	Autocompatible
M-1-91		0 de 6		12 de 12	10 de 10		22 de 28	79	Autocompatible
M-1-92		1 de 6				5 de 6	6 de 12	50	Autocompatible
M-1-93	6 de 6	1 de 6	8 de 12	8 de 12			23 de 36	64	Autocompatible
M-1-94		3 de 6		5 de 5		9 de 9	17 de 20	85	Autocompatible
M-1-95	0 de 6		10 de 12	7 de 12			17 de 30	57	Autocompatible
M-1-96	6 de 6	1 de 6	12 de 12	9 de 12			28 de 36	77	Autocompatible
M-1-97			9 de 12	6 de 8			15 de 20	75	Autocompatible
M-1-98		6 de 6	12 de 12	12 de 12			30 de 30	100	Autocompatible
M-1-99									Sin datos
M-2-01		0 de 6	5 de 12		12 de 12		17 de 30	57	Autocompatible
M-2-02	6 de 12	5 de 6		6 de 6			17 de 24	71	Autocompatible
M-2-03		0 de 6	1 de 12	0 de 10			1 de 28	4	Autoincompatible
M-2-04				0 de 10	0 de 12		0 de 22	0	Autoincompatible
M-2-05			0 de 12	3 de 11			3 de 23	13	Autoincompatible
M-2-06	1 de 5		0 de 12	0 de 12	0 de 12		1 de 41	2	Autoincompatible
M-2-07	0 de 6	0 de 6	2 de 12	0 de 12			2 de 36	6	Autoincompatible
M-2-08			0 de 12	2 de 12			2 de 24	8	Autoincompatible
M-2-09			10 de 12	11 de 12			21 de 24	88	Autocompatible
M-2-10				11 de 11	12 de 12		23 de 23	100	Autocompatible
M-2-11	5 de 10	2 de 6	7 de 12	9 de 12			23 de 40	58	Autocompatible
M-2-12		4 de 6	12 de 12	10 de 12			26 de 30	86	Autocompatible
M-2-13									Sin datos
M-2-14	0 de 6	0 de 6	3 de 12	0 de 8			3 de 32	9	Autoincompatible
M-2-15	0 de 12	0 de 6	0 de 12	1 de 12			1 de 42	2	Autoincompatible

Fenotipo observado :

	Individuo autocompatible.
	Individuo autoincompatible.
	Individuo de fenotipo dudoso.
	Individuo sin datos o insuficientes.

Legada de tubos polínicos a la base :

	Muestra sin datos para ese año.
	Muestra menor de 6 pistilos.
	Muestra sin llegada de tubos polínicos.
	Muestra con llegada en menos del 50% de los pistilos.
	Muestra con llegada en más del 50% de los pistilos.

Cuadro 3.2 Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono'. Fenotipo asignado según los resultados.

N° Planta	Año						Total	%	Fenotipo
	1998	1999	2000	2001	2002	2003			
M-2-16	4 de 9		8 de 12	12 de 12		12 de 12	31 de 47	76	Autocompatible
M-2-17			7 de 12	12 de 12			19 de 24	79	Autocompatible
M-2-18			12 de 12	14 de 14			26 de 26	100	Autocompatible
M-2-19		0 de 6	12 de 12	11 de 11			25 de 29	79	Autocompatible
M-2-20		0 de 6	12 de 12	5 de 6			17 de 24	71	Autocompatible
M-2-21	6 de 12	0 de 6		12 de 12		2 de 3	20 de 33	61	Autocompatible
M-2-22				8 de 12	4 de 6		12 de 18	66	Autocompatible
M-2-23		2 de 6	8 de 12	10 de 11			20 de 29	69	Autocompatible
M-2-24	3 de 4	3 de 6	12 de 12	9 de 11			27 de 33	82	Autocompatible
M-2-25		6 de 6	9 de 11	11 de 11			26 de 28	93	Autocompatible
M-2-26		4 de 6	12 de 12				16 de 18	89	Autocompatible
M-2-27				6 de 12	10 de 12		16 de 24	66	Autocompatible
M-2-28				8 de 12			8 de 12	66	Falta de datos
M-2-29		6 de 6	12 de 12	6 de 12			24 de 30	80	Autocompatible
M-2-30	5 de 6			12 de 12	12 de 12		29 de 30	97	Autocompatible
M-2-31	5 de 6		12 de 12	8 de 12			25 de 30	83	Autocompatible
M-2-32			12 de 12	12 de 12			24 de 24	100	Autocompatible
M-2-33		0 de 6		7 de 10	12 de 12		19 de 28	68	Autocompatible
M-2-34			12 de 12	4 de 6			16 de 18	88	Autocompatible
M-2-35									Sin datos
M-2-36		6 de 6	11 de 11	12 de 12			29 de 29	100	Autocompatible
M-2-37						12 de 12	12 de 12	100	Falta de datos
M-2-38				10 de 12	12 de 12		22 de 24	92	Autocompatible
M-2-39				12 de 12			12 de 12	100	Falta de datos
M-2-40	6 de 6	5 de 6	12 de 12	12 de 12			35 de 36	97	Autocompatible
M-2-41	6 de 6	6 de 6	10 de 12	3 de 6			25 de 30	83	Autocompatible
M-2-42						1 de 3	1 de 3	33	Falta de datos
M-2-43						7 de 7	7 de 7	100	Falta de datos
M-2-44	4 de 6	1 de 6	12 de 12	11 de 12			28 de 36	78	Autocompatible
M-2-45	1 de 12	2 de 6		3 de 10		7 de 14	13 de 42	31	Dudoso
M-2-46									Sin datos
M-2-47				13 de 13		6 de 6	19 de 19	100	Autocompatible
M-2-48	5 de 12	6 de 6		5 de 6			16 de 24	66	Autocompatible
M-2-49									Sin datos
M-2-50			12 de 12	4 de 4	12 de 12		28 de 28	100	Autocompatible
M-2-51						9 de 9	9 de 9	100	Falta de datos
M-2-52				10 de 11		6 de 6	16 de 17	94	Autocompatible
M-2-53				6 de 6			6 de 6	100	Falta de datos
M-2-54				2 de 7		7 de 7	9 de 14	64	Autocompatible

Fenotipo observado :
 Individuo autocompatible.
 Individuo autoincompatible.
 Individuo de fenotipo dudoso.
 Individuo sin datos o insuficientes.

Llegada de tubos polínicos a la base :
 Muestra sin datos para ese año.
 Muestra menor de 6 pistilos.
 Muestra sin llegada de tubos polínicos.
 Muestra con llegada en menos del 50% de los pistilos.
 Muestra con llegada en mas del 50% de los pistilos.

Cuadro 3.3 Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'. Fenotipo asignado según los resultados.

N° Planta	Año						Total	%	Fenotipo
	1998	1999	2000	2001	2002	2003			
M-2-55		0 de 6	0 de 12	0 de 11			0 de 29	0	Autoincompatible
M-2-56	0 de 6	0 de 4	0 de 12	1 de 13			1 de 35	3	Autoincompatible
M-2-57	0 de 6	1 de 6		2 de 12	1 de 12		4 de 36	11	Autoincompatible
M-2-58		0 de 6	2 de 12	0 de 12			2 de 30	7	Autoincompatible
M-2-59	0 de 6		2 de 12	0 de 14			2 de 32	6	Autoincompatible
M-2-60	0 de 3	2 de 6		0 de 12		1 de 7	3 de 28	11	Autoincompatible
M-2-61			2 de 12	0 de 13			2 de 25	8	Autoincompatible
M-2-62									Sin datos
M-2-63	1 de 12	3 de 6	12 de 12	10 de 10			26 de 40	65	Autocompatible
M-2-64			0 de 12	0 de 12			0 de 24	0	Autoincompatible
M-2-65	6 de 6			8 de 8	8 de 12		22 de 26	85	Autocompatible
M-2-66	1 de 6		1 de 12	0 de 12			2 de 30	7	Autoincompatible
M-2-67	3 de 12		0 de 12	0 de 12			3 de 36	8	Autoincompatible
M-2-68		0 de 6	0 de 6	0 de 11			0 de 23	0	Autoincompatible
M-2-69		0 de 6	2 de 12	0 de 12			2 de 30	7	Autoincompatible
M-2-70	0 de 12	0 de 6	2 de 12				2 de 30	7	Autoincompatible
M-2-71	0 de 8	0 de 6	0 de 11	0 de 12			0 de 37	0	Autoincompatible
M-2-72	0 de 6	0 de 6	2 de 12	0 de 12			2 de 36	5	Autoincompatible
M-2-73	5 de 12	0 de 6	4 de 12	12 de 12			21 de 42	50	Autocompatible
M-2-74	0 de 6		0 de 13	0 de 12			0 de 31	0	Autoincompatible
M-2-75	6 de 6	6 de 6		12 de 12			24 de 24	100	Autocompatible
M-2-76			0 de 12	0 de 12			0 de 24	0	Autoincompatible

Fenotipo observado :

	Individuo autocompatible.
	Individuo autoincompatible.
	Individuo de fenotipo dudoso.
	Individuo sin datos o insuficientes.

Llegada de tubos polínicos a la base :

	Muestra sin datos para ese año.
	Muestra menor de 6 pistilos.
	Muestra sin llegada de tubos polínicos.
	Muestra con llegada en menos de 50% de los pistilos.
	Muestra con llegada en mas del 50% de los pistilos.

Cuadro 3.4 Pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo en la familia 'Ferralise' x 'Tuono'. Fenotipo asignado según los resultados.

N° Planta	Año						Total	%	Fenotipo
	1998	1999	2000	2001	2002	2003			
L-2-72			12 de 12	12 de 12			24 de 24	100	Autocompatible
L-2-73		3 de 6	8 de 12	9 de 12			23 de 30	77	Autocompatible
L-2-74		3 de 6	3 de 3	12 de 12			18 de 21	86	Autocompatible
L-2-75			8 de 12			1 de 10	9 de 22	41	Dudoso
L-2-76	6 de 6	3 de 6		12 de 12			21 de 24	88	Autocompatible
L-2-77	0 de 6	1 de 6	0 de 8	0 de 12	2 de 12	4 de 12	7 de 56	12	Autoincompatible
L-2-78				8 de 12	8 de 12		16 de 24	66	Autocompatible
L-2-79	0 de 6	0 de 6	1 de 12	0 de 12	0 de 12		1 de 48	2	Autoincompatible
L-2-80				2 de 12		6 de 9	8 de 21	38	Dudoso
L-2-81	5 de 6	4 de 6	7 de 7	6 de 12			22 de 31	69	Autocompatible
L-2-82		2 de 6				8 de 8	10 de 14	71	Autocompatible
L-2-83	6 de 6	4 de 6	12 de 12	8 de 12			30 de 36	83	Autocompatible
L-2-84	3 de 6	5 de 6	8 de 12	10 de 12			26 de 36	72	Autocompatible
L-2-85						10 de 10	10 de 10	100	Falta de datos
L-2-86						9 de 9	9 de 9	100	Falta de datos
L-2-87	3 de 6	4 de 6	12 de 12	12 de 12			31 de 36	86	Autocompatible
L-2-88	6 de 7	0 de 6			0 de 10		6 de 23	26	Dudoso
L-2-89	1 de 12	0 de 6	8 de 12	2 de 12	12 de 12		23 de 54	42	Dudoso
L-2-90		2 de 6	8 de 12	7 de 12			17 de 30	57	Autocompatible
L-2-91	6 de 6		12 de 12	6 de 12			24 de 30	80	Autocompatible
L-2-92	4 de 4	6 de 6	11 de 12	11 de 11			32 de 33	97	Autocompatible
L-2-93	1 de 3	6 de 6		12 de 12			19 de 21	90	Autocompatible
L-2-94	4 de 6		11 de 12	12 de 12			27 de 30	90	Autocompatible
L-2-95	3 de 5	4 de 6		9 de 10			16 de 21	76	Autocompatible
L-2-96	6 de 6	4 de 6		6 de 6			16 de 17	94	Autocompatible
L-2-97	4 de 6	1 de 6		3 de 6	3 de 12		11 de 30	37	Dudoso
L-2-98	6 de 6	2 de 6	5 de 12	12 de 12			25 de 36	69	Autocompatible
L-2-99	6 de 12	5 de 6	10 de 12	7 de 8			28 de 38	47	Autocompatible
L-3-01	5 de 5	3 de 6	12 de 12	11 de 12			31 de 35	89	Autocompatible
L-3-02	4 de 6	2 de 6	9 de 12	12 de 12			27 de 36	75	Autocompatible
L-3-03	8 de 12			3 de 4	10 de 11		21 de 27	78	Autocompatible
L-3-04	5 de 11	2 de 6		11 de 12			18 de 29	62	Autocompatible
L-3-05	3 de 3	5 de 6	8 de 12	9 de 10			25 de 31	81	Autocompatible
L-3-06	5 de 6	4 de 6		8 de 11			17 de 23	74	Autocompatible
L-3-07	4 de 6	0 de 6	8 de 12		6 de 12		18 de 36	50	Autocompatible
L-3-08				9 de 10	12 de 12		21 de 22	95	Autocompatible
L-3-09	6 de 6	4 de 6		11 de 11			21 de 23	91	Autocompatible
L-3-10	5 de 6	1 de 6	7 de 12	7 de 11			20 de 35	57	Autocompatible
L-3-11	6 de 6	3 de 6		12 de 12			21 de 24	88	Autocompatible
L-3-12	5 de 12	0 de 6		6 de 12	6 de 12		17 de 42	40	Dudoso
L-3-13	3 de 12		3 de 12	0 de 12	3 de 12		9 de 48	19	Autoincompatible
L-3-14	3 de 12	0 de 6		5 de 9	4 de 12	3 de 4	15 de 43	35	Dudoso
L-3-15	6 de 12	0 de 6		10 de 12	3 de 15		19 de 45	42	Dudoso
L-3-16	5 de 6		10 de 12	11 de 12			26 de 30	87	Autocompatible
L-3-17			7 de 7	6 de 11			13 de 18	72	Autocompatible
L-3-18	7 de 12	0 de 5	0 de 12	0 de 10	4 de 12		11 de 51	20	Autoincompatible
L-3-19		2 de 2		9 de 9			11 de 11	100	Autocompatible
L-3-20	5 de 6	5 de 6	6 de 9	11 de 11			27 de 32	84	Autocompatible
L-3-21		1 de 6	12 de 12				13 de 18	72	Autocompatible
L-3-22				12 de 12	12 de 12		24 de 24	100	Autocompatible

(Continúa en página siguiente)

Cuadro 3.4 (Continuación).

N° Planta	Año						Total	%	Fenotipo
	1998	1999	2000	2001	2002	2003			
L-3-23	6 de 6		11 de 12	10 de 10			27 de 28	96	Autocompatible
L-3-24			5 de 9	12 de 12			17 de 21	81	Autocompatible
L-3-25	4 de 12	4 de 6	7 de 12	3 de 5			18 de 35	51	Autocompatible
L-3-26	3 de 12	0 de 6	4 de 10	3 de 10		1 de 12	11 de 50	22	Autoincompatible
L-3-27	6 de 7	6 de 6		6 de 10			18 de 23	78	Autocompatible
L-3-28	6 de 6	2 de 6		12 de 12			20 de 24	83	Autocompatible
L-3-29	4 de 4	4 de 6	7 de 12				15 de 22	68	Autocompatible
L-3-30	5 de 6	3 de 6		15 de 15			23 de 27	85	Autocompatible
L-3-31									Sin datos
L-3-32	0 de 6	0 de 6	0 de 24	0 de 12		2 de 14	2 de 62	3	Autoincompatible
L-3-33		0 de 6		10 de 12	12 de 12		22 de 30	73	Autocompatible
L-3-34	2 de 8			12 de 12	12 de 12		26 de 32	81	Autocompatible
L-3-35		0 de 5	4 de 12	2 de 5	4 de 12	12 de 12	22 de 46	48	Autocompatible
L-3-36				8 de 9		12 de 12	20 de 21	95	Autocompatible
L-3-37	5 de 6	6 de 6	4 de 4	14 de 14			29 de 30	97	Autocompatible
L-3-38	6 de 6	6 de 6	12 de 12	12 de 12			36 de 36	100	Autocompatible
L-3-39	6 de 6	5 de 6	11 de 12	6 de 9			28 de 33	85	Autocompatible
L-3-40		0 de 6		0 de 7	3 de 11		3 de 24	12	Autoincompatible
L-3-41	6 de 6	6 de 6		12 de 13			24 de 25	96	Autocompatible
L-3-42		5 de 6		12 de 12			17 de 18	94	Autocompatible
L-3-43	6 de 6	1 de 6	4 de 4	7 de 11			18 de 27	67	Autocompatible
L-3-44	4 de 6	3 de 6	9 de 12	7 de 8			23 de 32	72	Autocompatible
L-3-45				3 de 12		1 de 4	4 de 16	25	Dudoso
L-3-46	5 de 12	5 de 7		8 de 10			18 de 29	62	Autocompatible
L-3-47				2 de 10	0 de 12		2 de 22	9	Autoincompatible
L-3-48	8 de 12	1 de 6	11 de 12	1 de 6	5 de 9		26 de 45	58	Autocompatible
L-3-49	6 de 6	4 de 6		11 de 12			21 de 24	88	Autocompatible
L-3-50	7 de 12	3 de 6	6 de 6	9 de 10			25 de 34	74	Autocompatible
L-3-51	5 de 6	7 de 7	12 de 12				24 de 25	96	Autocompatible
L-3-52	6 de 6	3 de 6	9 de 12	12 de 12			30 de 36	83	Autocompatible
L-3-53	5 de 6	2 de 5	6 de 6	7 de 9			20 de 26	77	Autocompatible
L-3-54	4 de 6	1 de 5		7 de 11	10 de 10		22 de 32	69	Autocompatible
L-3-55	6 de 6			10 de 10	12 de 12		28 de 28	100	Autocompatible
L-3-56	4 de 12	1 de 6		1 de 11	3 de 11	0 de 9	8 de 43	19	Autoincompatible
L-3-57	6 de 6	3 de 6		12 de 12	10 de 11		28 de 29	97	Autocompatible
L-3-58		0 de 6		10 de 10		8 de 8	18 de 24	75	Autocompatible
L-3-59	0 de 6	0 de 6	6 de 12	4 de 10			10 de 34	29	Dudoso
L-3-60	6 de 6	0 de 6	5 de 5	12 de 12			23 de 29	79	Autocompatible
L-3-61	5 de 6	1 de 6	12 de 12	12 de 12			30 de 36	83	Autocompatible
L-3-62	6 de 6	3 de 6		11 de 12			20 de 24	83	Autocompatible
L-3-63	6 de 12	0 de 3	12 de 12	12 de 12			30 de 39	77	Autocompatible

Fenotipo observado :

	Individuo autocompatible.
	Individuo autoincompatible.
	Individuo de fenotipo dudoso.
	Individuo sin datos o insuficientes.

Llegada de tubos polínicos a la base :

	Muestra sin datos para ese año.
	Muestra menor de 6 pistilos.
	Muestra sin llegada de tubos polínicos.
	Muestra con llegada en menos del 50% de los pistilos.
	Muestra con llegada en mas del 50% de los pistilos.

La autopolinización manual en laboratorio y la observación microscópica del crecimiento de los tubos polínicos es un método preciso en la determinación del fenotipo de la autocompatibilidad. A pesar de ello, existen individuos en los que ha resultado imposible determinar su fenotipo de forma segura, bien por producirse contradicción entre las observaciones, siendo denominados "fenotipo dudoso", o bien por no disponer de datos suficientes por falta de flores.

La autopolinización manual generalmente produjo el tapizado completo de la superficie estigmática por los granos de polen. Se observó además como los tubos polínicos penetraban en general entre las papilas estigmáticas de forma masiva, atravesando el tejido estigmático y la primera parte del tejido transmisor del estilo (Fig. 3.5.A). Los tubos polínicos crecen de manera intercelular a través del tejido transmisor, gracias a las reservas de la matriz extracelular. Se observó como los tubos polínicos en el primer tercio del estilo produjeron grandes depósitos de callosa y sus paredes eran gruesas. En los individuos con fenotipo autoincompatible, los tubos polínicos solían pararse en el tercio medio del estilo de forma progresiva, mostrando en muchos casos un crecimiento final tortuoso y engrosado. En los individuos con fenotipo autocompatible, se observó como la cantidad de tubos polínicos iba decreciendo, así como el grosor y la cantidad de los depósitos de callosa a medida que disminuía la distancia al ovario (Fig. 3.5.B y C), llegando sólo una fracción de los tubos polínicos iniciales a la base del estilo (Fig. 3.5.D), penetrando desde allí en el ovario.

En la Fig. 3.6 se representa gráficamente el resumen de los fenotipos obtenidos en las distintas familias, mostrando la diferente distribución en las descendencias de 'Ferragnès' respecto a las de 'Ferralise'. En las descendencias en las que 'Tuono' se utilizó como parental femenino, se esperaba que las proporciones fenotípicas fueran del 50%, pero en la descendencia 'Tuono' x 'Ferragnès' se observó mayor proporción de individuos autocompatibles y sin embargo, en la descendencia de 'Tuono' x 'Ferralise', predominaron de manera significativa los individuos autoincompatibles.

En el análisis conjunto de ambas descendencias (Cuadro 3.5), el rechazo de la hipótesis de igualdad de proporciones fenotípicas en la descendencia supone un riesgo de error del 49,8%, mientras que con los resultados de 'Tuono' x 'Ferralise' sólo supone un riesgo de error del 0,9%.

Cuadro 3.5 Prueba de Chi-cuadrado de las proporciones fenotípicas y nivel de significación.

Familia	Autocompatibles	Autoincompatibles	χ^2	α
'Tuono' x 'Ferragnès'	20 (60,6%)	13 (39,4%)	1,09	0,296
'Tuono' x 'Ferralise'	4 (19,1%)	17 (80,9%)	6,85	0,009
'Tuono' ♀	24 (44,4%)	30 (55,6%)	0,46	0,498

(χ^2 =valor obtenido de chi-cuadrado, α = nivel de significación.)

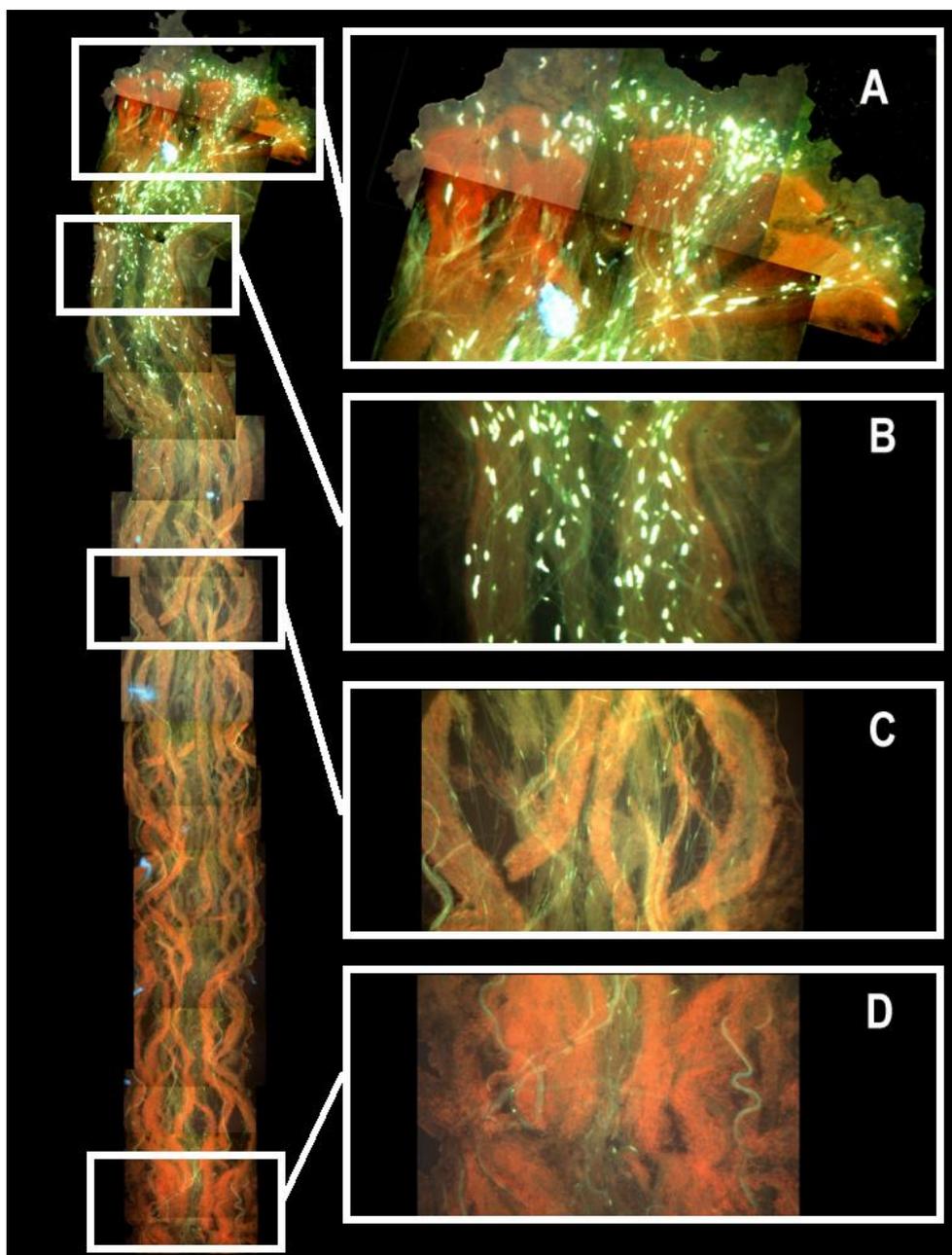


Fig. 3.5 Crecimiento de los tubos polínicos en el estilo.

A) Crecimiento de los tubos polínicos en la zona del estigma y penetración en el tejido transmisor.

B) Crecimiento de los tubos polínicos en el primer tercio del estilo.

C) Crecimiento de los tubos polínicos en el tercio medio del estilo.

D) Llegada de los tubos polínicos a la base del estilo.

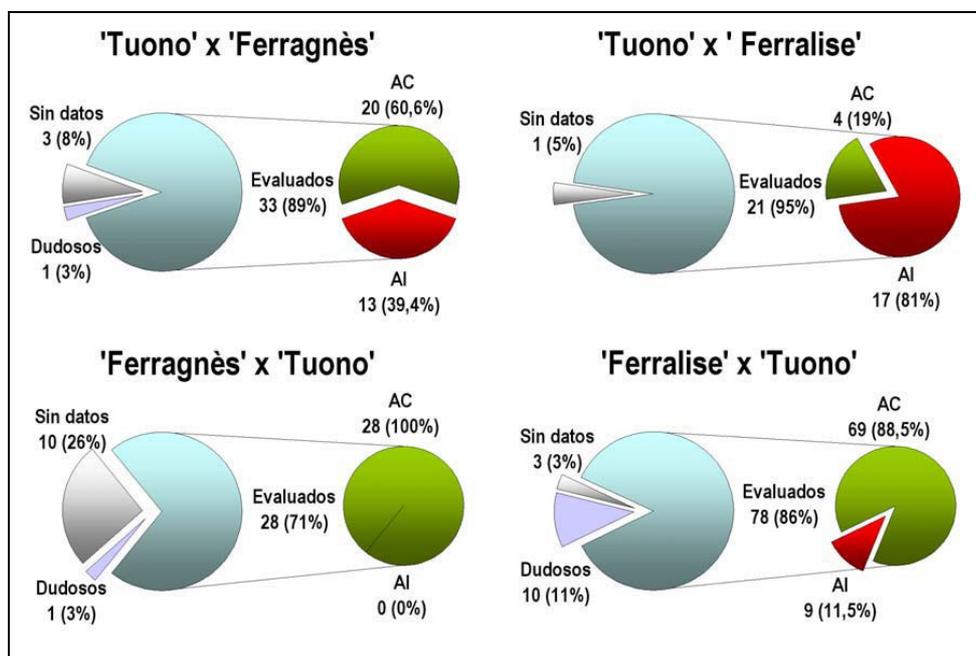


Fig. 3.6 Número y porcentaje de individuos autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI) en cada familia

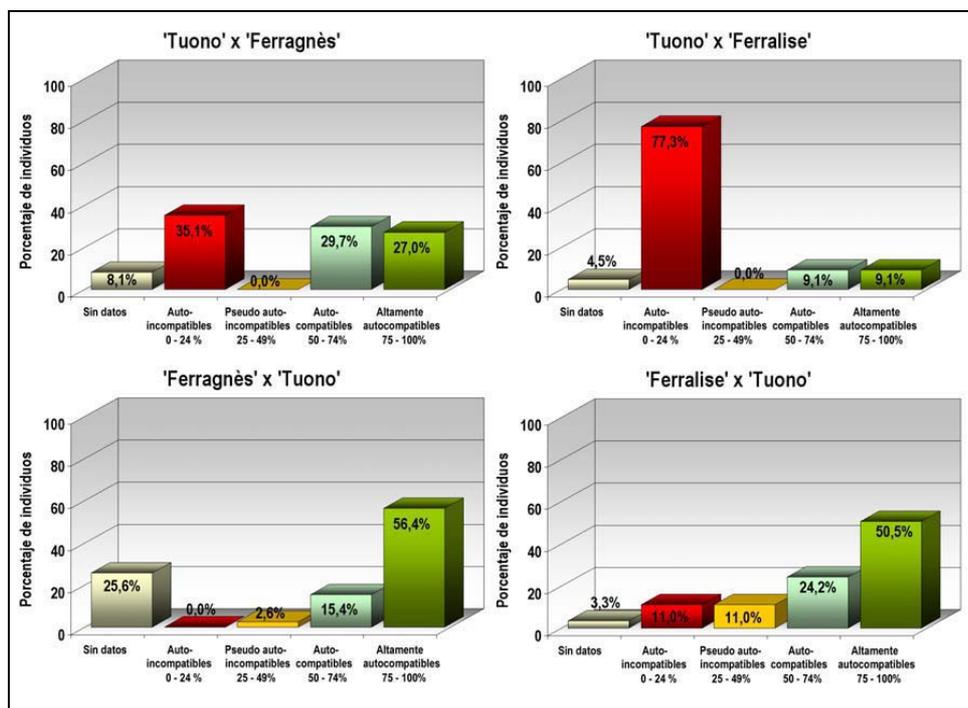


Fig. 3.7 Distribución de los individuos en función de la porción de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base de los estilos.

En las familias en las que 'Tuono' es el parental masculino no se esperaba encontrar individuos autoincompatibles, tal como ocurrió en los descendientes de 'Ferragnès' x 'Tuono' evaluados, pero el 11,5% de los descendientes de 'Ferralise' x 'Tuono' mostró una clara autoincompatibilidad (Fig. 3.6).

Al computar la totalidad de pistilos observados en cada planta, se observó que en las plantas que se habían considerado como autoincompatibles, se había producido la llegada de los tubos polínicos a la base en menos del 25% de los pistilos. Las plantas que se habían calificado como dudosas, mostraban entre el 25 y 50% de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base. Lógicamente, debido al criterio de evaluación, las plantas consideradas autocompatibles mostraron más del 50% de sus pistilos con llegada de tubos polínicos a la base. Así pues, la porción de pistilos con llegada de tubos polínicos puede utilizarse como un indicador de la calidad de la autoincompatibilidad y la autocompatibilidad (Fig. 3.7). Dentro de las plantas con fenotipo autocompatible, se pueden denominar como altamente autocompatibles aquellos individuos en los que se observa la llegada de tubos polínicos a la base del estilo en más del 75% de los estilos, considerando que tienen un valor agronómico mayor ya que se les supone una posibilidad de cuajado más alto.

Se observó como en las familias en las que se utilizó 'Tuono' como parental femenino, la proporción de individuos altamente autocompatibles es similar a la individuos autocompatibles, mientras que en las familias en las que 'Tuono' fue el parental masculino, la proporción de individuos altamente autocompatibles fue netamente superior a la de autocompatibles (Fig. 3.7).

Las observaciones realizadas tienen su reflejo en el análisis de frecuencias mostrado en el Cuadro 3.6. Se observó que la frecuencia de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo varió en función del fenotipo y dirección del cruzamiento, como es lógico, ya que el fenotipo se determinó a partir de las proporciones de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base observadas en cada genotipo durante varios años y la dirección del cruzamiento determina las proporciones de individuos autoincompatibles en las familias. Dentro de la misma dirección de cruzamiento, en el conjunto de todos los pistilos observados en los descendientes de 'Ferragnès' se observó una mayor frecuencia de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo respecto a la de los pistilos de los descendientes de 'Ferralise'. También el factor año tiene influencia en la frecuencia de pistilos observados con llegada de tubos polínicos a la base de los estilos. Sin embargo, estos datos son orientativos, ya que no todos los genotipos se testaron todos los años, así como en este análisis los individuos autoincompatibles y dudosos se testaron en más ocasiones para confirmar su fenotipo.

Cuadro 3.6 Frecuencias de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base de los estilos.

FENOTIPO	Autocompatible	Autoincompatible	Dudoso	Total		
Con llegada	1387 pistilos (75,18 %)	53 pistilos (8,39 %)	60 pistilos (35,29 %)	1500 pistilos (56,67 %)		
Sin llegada	458 pistilos (24,82 %)	579 pistilos (91,61%)	110 pistilos (64,71%)	1147 pistilos (43,33%)		
Total	1845 pistilos (69,70 %)	632 pistilos (23,88 %)	170 pistilos (6,42 %)	2647 pistilos (100 %)		
$\chi^2 = 888,992 > \chi^2_{0,05 2gl} = 5,991$ Prob.: <0,0001						
DIRECCIÓN DEL CRUZAMIENTO	'Tuono' ♀	'Tuono' ♂	Total			
Con llegada	315 pistilos (37,95 %)	1185 pistilos (65,22 %)	1500 pistilos (56,67 %)			
Sin llegada	515 pistilos (62,05 %)	632 pistilos (34,78 %)	1147 pistilos (43,33%)			
Total	830 pistilos (31,36 %)	1817 pistilos (68,64 %)	2647 pistilos (100 %)			
$\chi^2 = 172,489 > \chi^2_{0,05 1gl} = 3,841$ Prob.: <0,0001						
DESCENDIENTES DE	'Ferragnès'	'Ferralise'	Total			
Con llegada	596 pistilos (62,80 %)	904 pistilos (53,24 %)	1500 pistilos (56,67 %)			
Sin llegada	353 pistilos (37,20 %)	794 pistilos (46,76 %)	1147 pistilos (43,33%)			
Total	949 pistilos (35,85 %)	1698 pistilos (64,15 %)	2647 pistilos (100 %)			
$\chi^2 = 22,676 > \chi^2_{0,05 1gl} = 3,841$ Prob.: <0,0001						
'Tuono' ♀	'Tuono' x 'Ferragnès'	'Tuono' x 'Ferralise'	Total			
Con llegada	255 pistilos (49,04 %)	60 pistilos (19,35 %)	315 pistilos (37,95 %)			
Sin llegada	265 pistilos (50,96 %)	250 pistilos (80,65%)	515 pistilos (62,05 %)			
Total	520 pistilos (62,65 %)	310 pistilos (37,35 %)	830 pistilos (100 %)			
$\chi^2 = 72,6707 > \chi^2_{0,05 1gl} = 3,841$ Prob.: <0,0001						
'Tuono' ♂	'Ferragnès' x 'Tuono'	'Ferralise' x 'Tuono'	Total			
Con llegada	341 pistilos (79,49 %)	844 pistilos (60,81 %)	1185 pistilos (65,22 %)			
Sin llegada	88 pistilos (20,51 %)	544 pistilos (39,19 %)	632 pistilos (34,78 %)			
Total	429 pistilos (23,61 %)	1388 pistilos (76,39 %)	1817 pistilos (100 %)			
$\chi^2 = 50,4118 > \chi^2_{0,05 1gl} = 3,841$ Prob.: <0,0001						
AÑO	1999	2000	2001	2002	2003	Total
Con llegada	263 (38,9%)	410 (63,5%)	590 (63,0%)	150 (58,1%)	87 (66,9%)	1147 pistilos (43,3 %)
Sin llegada	414 (61,1%)	236 (36,5%)	346 (37,0%)	108 (41,9%)	43 (33,1%)	1500 pistilos (56,7%)
Total	667 (25,5%)	646 (24,4%)	936 (35,3%)	258 (9,7%)	130 (4,9%)	2647 pistilos (100 %)
$\chi^2 = 90,347 > \chi^2_{0,05 2gl} = 5,991$ Prob.: <0,0001						

3.3.2 FENOTIPO EN FUNCIÓN DE LA CANTIDAD DE TUBOS POLÍNICOS QUE LLEGAN A LA BASE DEL ESTILO

En los Cuadros 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 figuran los resultados de la cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en las distintas familias para los años de estudio.

Cuadro 3.7 Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès'.

Nº Planta	1999		2000		2001		2002		2003		PROMEDIO		FENOTIPO
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	
M-1-78	0,0	0,0			3,0	2,6	4,2	3,9			3,6	2,6	Autocompatible
M-1-79			1,0	0,1			7,0	4,6	2,0	0,6	5,5	3,0	Autocompatible
M-1-80	0,0	0,0			0,0	0,0	0,0	0,0			0,0	0,0	Autoincompatible
M-1-81			4,5	4,5	6,0	5,5					5,2	4,4	Autocompatible
M-1-82			0,0	0,0							0,0	0,0	Autoincompatible
M-1-83	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-1-84			0,0	0,0	1,0	0,1					1,0	0,0	Autoincompatible
M-1-85			0,0	0,0					6,6	6,6	6,6	4,8	Dudoso
M-1-86	0,0	0,0	3,6	3,6	5,3	5,3	2,3	2,3	5,5	5,5	4,2	3,7	Autocompatible
M-1-87	3,3	1,6	7,5	7,5	3,8	3,8					5,6	5,0	Autocompatible
M-1-88									1,0	0,2	0,1	0,2	Falta de datos
M-1-89					2,0	0,2	0,0	0,0			2	0,1	Autoincompatible
M-1-90	4,0	2,0	4,1	4,1	4,1	4,1					4,1	3,8	Autocompatible
M-1-91	0,0	0,0			4,5	4,5	3,1	3,1			3,9	3,0	Autocompatible
M-1-92	2,0	0,3							4,8	4,0	4,3	2,2	Autocompatible
M-1-93	3,0	0,5	1,5	1,0	4,6	3,0					3,0	1,7	Autocompatible
M-1-94	3,6	1,8			5	5			3,5	3,5	4,0	3,4	Autocompatible
M-1-95			5	4,2	4,2	2,4					4,7	3,3	Autocompatible
M-1-96	1,0	0,2	6,8	6,8	9	7,6					7,8	5,8	Autocompatible
M-1-97			3,6	2,7	5,5	3,6					4,4	3,3	Autocompatible
M-1-98	4,6	4,6	3,5	3,5	8,0	8,0					5,5	5,5	Autocompatible
M-1-99													Sin datos
M-2-01	0,0	0,0	1,0	0,4			4,3	4,3			3,3	1,9	Autocompatible
M-2-02	4,4	3,7			7,0	7,0					5,8	5,3	Autocompatible
M-2-03	0,0	0,0	1,0	0,1	0,0	0,0					1	0,0	Autoincompatible
M-2-04					0,0	0,0	0,0	0,0			0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-05			0,0	0,0	2,0	0,5					2,0	0,2	Autoincompatible
M-2-06			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-07	0,0	0,0	1,0	0,2	0,0	0,0					1	0,1	Autoincompatible
M-2-08			0,0	0,0	1,5	0,2					1,5	0,1	Autoincompatible
M-2-09			5,0	4,2	5,2	4,8					5,1	4,5	Autocompatible
M-2-10					3,1	3,1	5,0	5,0			4,1	4,1	Autocompatible
M-2-11	3,0	1,0	3,6	2,1	1,5	1,1					2,5	1,5	Autocompatible
M-2-12	1,5	1,0	4,6	4,6	2,4	2,0					3,3	2,8	Autocompatible
M-2-13									5,0	0,8	5,0	0,8	Falta de datos
M-2-14	0,0	0,0	1,0	0,2	0,0	0,0					1,0	0,1	Autoincompatible
M-2-15	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,1					1,0	0,0	Autoincompatible

B Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en los pistilos con llegada.
T Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en el conjunto de la muestra.
 Muestra sin llegada de tubos polínicos.
 Llegan 1 o menos tubos polínicos por pistilo.
 Llegan de 1 a 3 tubos polínicos por pistilo.
 Llegan más de 3 tubos polínicos por pistilo.

Cuadro 3.8 Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono'.

Nº Planta	1999		2000		2001		2002		2003		PROMEDIO		FENOTIPO
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	
M-2-16			1,7	1,1	5,0	5,0			5,1	5,1	4,2	3,7	Autocompatible
M-2-17			1,8	1,0	3,3	3,3					3,0	2,2	Autocompatible
M-2-18			3,1	3,1	4,5	4,5					3,9	3,9	Autocompatible
M-2-19	0,0	0,0	2,5	2,5	4,0	4,0					3,2	2,6	Autocompatible
M-2-20	0,0	0,0	3,5	3,5	3,2	2,7					3,4	2,4	Autocompatible
M-2-21	0,0	0,0			3,5	3,5			3,5	2,3	3,5	2,3	Autocompatible
M-2-22					4,0	2,7	4,5	3,0			4,2	2,8	Autocompatible
M-2-23	2,5	0,8	3,0	2,0	2,6	2,4					2,8	1,9	Autocompatible
M-2-24	4,0	2,0	5,3	5,3	7,6	6,2					6,0	5,0	Autocompatible
M-2-25	2,6	2,6	2,0	1,6	6,6	6,6					3,7	3,0	Autocompatible
M-2-26	2,0	1,3	4,8	4,8							4,1	3,6	Autocompatible
M-2-27					4,3	2,2	7,0	5,8			6,0	4,0	Autocompatible
M-2-28					3,0	2,0					3,0	2,0	Falta de datos
M-2-29	3,5	3,5	5,3	5,3	1,6	0,8					3,9	3,1	Autocompatible
M-2-30					4,0	4,0	10,0	10,0			7,0	7,0	Autocompatible
M-2-31			2,8	2,8	6,2	4,1					4,2	3,5	Autocompatible
M-2-32			7,0	7,0	4,0	4,0					5,5	5,5	Autocompatible
M-2-33	0,0	0,0			2,7	1,9	4,5	4,5			3,8	2,6	Autocompatible
M-2-34			5,0	5,0	1,0	0,7					4,0	3,6	Autocompatible
M-2-35													Sin datos
M-2-36	2,8	2,8	7,1	7,1	4,5	4,5					5,1	5,1	Autocompatible
M-2-37									2,3	2,3	2,3	2,3	Falta de datos
M-2-38					4,6	3,8	7,0	7,0			5,9	5,4	Autocompatible
M-2-39					4,1	4,1					4,1	4,1	Falta de datos
M-2-40	5,0	4,2	7,3	7,3	5,0	5,0					6,0	5,8	Autocompatible
M-2-41	3,1	3,1	1,6	1,3	5,0	2,5					2,6	2,1	Autocompatible
M-2-42									3,0	1,0	3,0	1,0	Falta de datos
M-2-43									4,0	4,0	4,0	4,0	Falta de datos
M-2-44	3,0	0,5	7,3	7,3	5,0	4,6					6,1	4,9	Autocompatible
M-2-45	1,0	0,3			1,5	0,5			1,0	0,5	1,1	0,5	Dudoso
M-2-46													Sin datos
M-2-47					4,6	4,6			4,3	4,3	4,5	4,5	Autocompatible
M-2-48	2,6	2,6			4,4	3,7					3,4	3,1	Autocompatible
M-2-49													Sin datos
M-2-50			2,5	2,5	10,0	10,0	5,1	5,1			4,7	4,7	Autocompatible
M-2-51									4,8	4,8	4,8	4,8	Falta de datos
M-2-52					8,6	7,8			5,0	5,0	7,3	6,8	Autocompatible
M-2-53					7,6	7,6					7,6	7,6	Falta de datos
M-2-54					1,0	0,3			3,6	3,6	3,0	1,9	Autocompatible

B Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en los pistilos con llegada.
T Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en el conjunto de la muestra.
 Muestra sin llegada de tubos polínicos.
 Llegan 1 o menos tubos polínicos por pistilo.
 Llegan de 1 a 3 tubos polínicos por pistilo.
 Llegan más de 3 tubos polínicos por pistilo.

Cuadro 3.9 Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'.

N° Planta	1999		2000		2001		2002		2003		PROMEDIO		FENOTIPO
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	
M-2-55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-56	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,1					1,0	0,0	Autoincompatible
M-2-57	1,0	0,2			3,0	0,5	1,0	0,1			2,0	0,3	Autoincompatible
M-2-58	0,0	0,0	1,0	0,2	0,0	0,0					1,0	0,1	Autoincompatible
M-2-59			1,0	0,1	0,0	0,0					1,0	0,1	Autoincompatible
M-2-60	2,0	0,7			0,0	0,0			1,0	0,1	1,7	0,2	Autoincompatible
M-2-61			1,0	0,1	0,0	0,0					1,0	0,1	Autoincompatible
M-2-62													Sin datos
M-2-63	1,3	0,7	2,0	2,0	5,0	5,0					3,1	2,8	Autocompatible
M-2-64			0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-65					5,0	5,0	3,2	2,1			4,1	3,3	Autocompatible
M-2-66			0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-67			0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-68	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-69	0,0	0,0	2,0	0,3	0,0	0,0					2,0	0,1	Autoincompatible
M-2-70	0,0	0,0	1,0	0,3							1,0	0,1	Autoincompatible
M-2-71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-72	0,0	0,0	2,0	0,3	0,0	0,0					2,0	0,1	Autoincompatible
M-2-73	0,0	0,0	2,0	0,6	5,0	5,0					2,0	0,3	Autocompatible
M-2-74			0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible
M-2-75	5,1	5,1			5,0	5,0					5,0	5,0	Autocompatible
M-2-76			0,0	0,0	0,0	0,0					0,0	0,0	Autoincompatible

B	Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en los pistilos con llegada.		Llegan de 1 a 3 tubos polínicos por pistilo.
T	Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en el conjunto de la muestra.		Llegan más de 3 tubos polínicos por pistilo.
	Muestra sin llegada de tubos polínicos.		
	Llegan 1 o menos tubos polínicos por pistilo.		

Cuadro 3.10 Cantidad de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en la familia 'Ferralisse' x 'Tuono'.

N° Planta	1999		2000		2001		2002		2003		PROMEDIO		FENOTIPO
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	
L-2-72			5,0	5,0	5,1	5,1					5,0	5,0	Autocompatible
L-2-73	3,3	1,5	2,2	1,5	3,8	2,9					3,0	2,0	Autocompatible
L-2-74	5,3	2,6	6,6	6,6	3,3	3,3					6,6	1,9	Autocompatible
L-2-75			2,6	1,7					1,0	0,1	2,4	1,0	Dudoso
L-2-76	8,0	4,0			5,5	5,5					6,0	5,0	Autocompatible
L-2-77	2,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,3	3,0	1,0	2,6	0,4	Autoincompatible
L-2-78					2,7	1,8	1,4	1,1			2,1	1,4	Autocompatible
L-2-79	0,0	0,0	1,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0			1,0	0,0	Autoincompatible
L-2-80					5,0	0,8			3,7	1,9	4,0	1,5	Dudoso
L-2-81	4,2	2,8	8,1	8,1	3,6	1,8					5,6	3,8	Autocompatible
L-2-82	3,0	1,0							3,5	3,5	3,4	2,4	Autocompatible
L-2-83	7,5	5,0	7,0	7,0	2,7	1,8					5,7	4,5	Autocompatible
L-2-84	2,6	2,2	2,5	1,6	2,4	2					2,5	1,9	Autocompatible
L-2-85									3,6	3,6	3,6	3,6	Falta de datos
L-2-86									4,8	4,8	4,8	4,8	Falta de datos
L-2-87	7,0	4,6	5,0	5,0	5,0	5,0					5,3	4,9	Autocompatible
L-2-88	0,0	0,0					0,0	0,0			0,0	0,0	Dudoso
L-2-89	0,0	0,0	3,0	2,0	5,0	0,8	3,3	3,3			3,3	1,8	Dudoso
L-2-90	1,0	0,3	2,0	1,3	2,0	1,1					1,9	1,1	Autocompatible
L-2-91			7,1	7,1	4,0	2,0					6,1	4,6	Autocompatible
L-2-92	7,5	7,5	6,6	6,1	4,5	4,5					6,0	5,8	Autocompatible
L-2-93	4,1	4,1			4,1	4,1					4,1	4,1	Autocompatible
L-2-94			3,3	3,0	1,6	1,6					2,4	2,3	Autocompatible
L-2-95	4,5	3,0			2,0	1,6					2,8	2,3	Autocompatible
L-2-96	5,2	3,5			3,0	3,0					3,9	3,2	Autocompatible
L-2-97	3,0	0,5			2,3	1,2	3,0	0,8			2,7	0,8	Dudoso
L-2-98	3,0	1,0	2,6	1,1	3,3	3,3					3,1	2,0	Autocompatible
L-2-99	4,2	3,5	2,0	1,6	2,0	1,8					2,5	2,1	Autocompatible
L-3-01	3,3	1,7	9,0	9,0	3,8	3,5					6,1	5,3	Autocompatible
L-3-02	1,0	0,3	5,1	3,8	4,3	4,3					4,3	3,3	Autocompatible
L-3-03					2,3	1,7	4,5	4,1			4,0	3,5	Autocompatible
L-3-04	1,6	0,5			2,8	2,6					2,6	1,9	Autocompatible
L-3-05	4,6	3,8	1,5	1,0	4,2	3,8					3,3	2,6	Autocompatible
L-3-06	3,0	2,0			3,0	2,2					3,0	2,1	Autocompatible
L-3-07	0,0	0,0	1,3	0,9			3,0	1,5			2,0	0,9	Autocompatible
L-3-08					2,7	2,4	3,2	3,2			3,0	2,9	Autocompatible
L-3-09	4,0	2,6			4,6	4,6					4,4	3,9	Autocompatible
L-3-10	5,0	0,8	2,7	1,6	2,2	1,4					2,6	1,4	Autocompatible
L-3-11	2,3	1,2			3,6	3,6					3,3	2,8	Autocompatible
L-3-12	0,0	0,0			2,0	1,0	4,0	2,0			3,0	1,2	Dudoso
L-3-13			2,0	0,5	0,0	0,0	1,0	0,3			1,5	0,3	Autoincompatible
L-3-14	0,0	0,0			1,5	0,8	1,5	0,4	3,0	2,3	1,8	0,8	Dudoso
L-3-15	0,0	0,0			1,8	1,5	2,6	0,5			2,0	1,0	Dudoso
L-3-16			2,2	1,8	2,5	2,3					2,4	2,1	Autocompatible
L-3-17			3,0	3,0	1,5	0,9					2,4	1,7	Autocompatible
L-3-18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	1,2			3,5	0,4	Autoincompatible
L-3-19	4,0	4,0			3,0	3,0					3,2	3,2	Autocompatible
L-3-20	3,8	3,2	4,8	3,2	4,0	4,0					4,2	3,5	Autocompatible
L-3-21	2,0	0,3	4,6	4,6							4,4	3,2	Autocompatible
L-3-22					2,5	2,5	5,0	5,0			3,7	3,7	Autocompatible

(Continúa en página siguiente)

Cuadro 3.10 (Continuación).

Nº Planta	1999		2000		2001		2002		2003		PROMEDIO		FENOTIPO
	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	
L-3-23			3,8	3,5	2,4	2,4					3,1	3,0	Autocompatible
L-3-24			3,6	2,0	3,1	3,1					3,2	2,6	Autocompatible
L-3-25	1,2	0,8	2,0	1,2	2,0	1,2					1,8	1,1	Autocompatible
L-3-26	0,0	0,0	1,6	0,6	1,3	0,3			3,0	0,2	1,7	0,4	Autoincompatible
L-3-27	5,5	5,5			2,5	1,5					4,0	3,0	Autocompatible
L-3-28	5,0	1,7			4,0	4,0					4,1	3,2	Autocompatible
L-3-29	3,0	2,0	3,6	2,1							3,4	2,1	Autocompatible
L-3-30	3,3	1,7			3,3	3,3					3,3	2,8	Autocompatible
L-3-31													Sin datos
L-3-32	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			1,0	0,1	1,0	0,0	Autoincompatible
L-3-33	0,0	0,0			1,4	1,1	4,2	4,2			2,9	2,1	Autocompatible
L-3-34					4,3	4,3	5,5	5,5			4,9	4,9	Autocompatible
L-3-35	0,0	0,0	3,6	1,2	3,3	1,3	3,0	1,0	1,8	1,8	2,5	1,2	Autocompatible
L-3-36					2,5	2,2			5,8	5,8	4,5	4,3	Autocompatible
L-3-37	4,6	4,6	6,5	6,5	5,0	5,0					5,2	5,2	Autocompatible
L-3-38	3,0	3,0	5,5	5,5	4,1	4,1					4,8	4,8	Autocompatible
L-3-39	3,2	2,7	3,1	2,8	1,4	0,9					2,7	2,2	Autocompatible
L-3-40	0,0	0,0			0,0	0,0	2,0	0,5			2,0	0,3	Autoincompatible
L-3-41	3,6	3,6			3,0	2,8					3,2	3,0	Autocompatible
L-3-42	4,0	3,3			2,5	2,5					2,9	2,8	Autocompatible
L-3-43	3,0	0,5	3,5	3,5	1,6	0,9					2,4	1,3	Autocompatible
L-3-44	3,0	1,5	4,2	3,2	4,3	3,8					3,2	3,0	Autocompatible
L-3-45					1,5	0,4			1,0	0,2	1,4	0,3	Dudoso
L-3-46	3,2	2,3			2,2	1,7					2,5	1,9	Autocompatible
L-3-47					3,0	0,6	0,0	0,0			3,0	0,3	Autoincompatible
L-3-48	3,0	0,5	3,5	3,2	2,0	0,3	2,0	1,1			3,0	1,6	Autocompatible
L-3-49	2,5	1,7			4,2	3,9					3,7	3,1	Autocompatible
L-3-50	2,6	1,3	4,8	4,8	3,7	3,3					3,9	3,2	Autocompatible
L-3-51	3,1	3,1	9,1	9,1							6,9	6,9	Autocompatible
L-3-52	3,0	1,5	4,8	3,6	4,6	4,6					4,5	3,6	Autocompatible
L-3-53	2,0	0,8	4,8	4,8	2,3	1,8					3,3	2,4	Autocompatible
L-3-54	2,0	0,4			3,0	1,9	5,0	5,0			4,1	2,8	Autocompatible
L-3-55					3,0	3,0	3,6	3,6			3,3	3,3	Autocompatible
L-3-56	3,0	0,5			1,0	0,1	2,3	0,6	0,0	0,0	2,2	0,3	Autoincompatible
L-3-57	2,0	1,0			5,0	5,0	5,0	4,5			4,6	4,0	Autocompatible
L-3-58	0,0	0,0			2,8	2,8			3,6	3,6	3,2	2,4	Autocompatible
L-3-59	0,0	0,0	2,0	1,0	1,5	0,6					1,8	0,6	Dudoso
L-3-60	0,0	0,0	10,0	10,0	2,8	2,8					4,9	3,6	Autocompatible
L-3-61	2,0	0,3	4,0	4,0	2,6	2,6					3,2	2,7	Autocompatible
L-3-62	1,3	0,6			2,8	2,6					2,5	1,9	Autocompatible
L-3-63	0,0	0,0	10,0	10,0	4,8	4,8					7,4	6,6	Autocompatible

B Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en los pistilos con llegada.
T Medias de tubos polínicos que llegan a la base del estilo en el conjunto de la muestra.
 Muestra sin llegada de tubos polínicos.
 Llegan 1 o menos tubos polínicos por pistilo.
 Llegan de 1 a 3 tubos polínicos por pistilo.
 Llegan más de 3 tubos polínicos por pistilo.

En la Fig. 3.8 se presenta la distribución de los individuos según la cantidad de tubos polínicos que presentan en la base del estilo. Al igual que ocurre con las proporciones fenotípicas (Figs. 3.6 y 3.7), en las familias en las que 'Tuono' fue parental femenino se observó una distribución diferente de la cantidad de tubos observados en la base del estilo. En familia 'Tuono' x 'Ferragnès', el 38,2% de los individuos mostraron menos de un tubo polínico por estilo en la base, mientras que en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' la proporción fue del 85,8% de los individuos, debido al predominio de los individuos autoincompatibles en esta familia.

En las familias en las que 'Tuono' fue el parental masculino se observó una diferencia cualitativa según la variedad autoincompatible utilizada. Así, el 62,1% de los descendientes autocompatibles de 'Ferragnès' x 'Tuono' presentaron pistilos con más de 3 tubos polínicos en la base del estilo, mientras que en los descendiente de 'Ferralise' x 'Tuono' esta proporción sólo fue del 34,1%. Hay que destacar que la familia 'Ferralise' x 'Tuono' es la única en la que la proporción de individuos con 1 a 3 tubos polínicos en la base supera a la proporción de individuos con más de 3 tubos polínicos (Fig. 3.8).

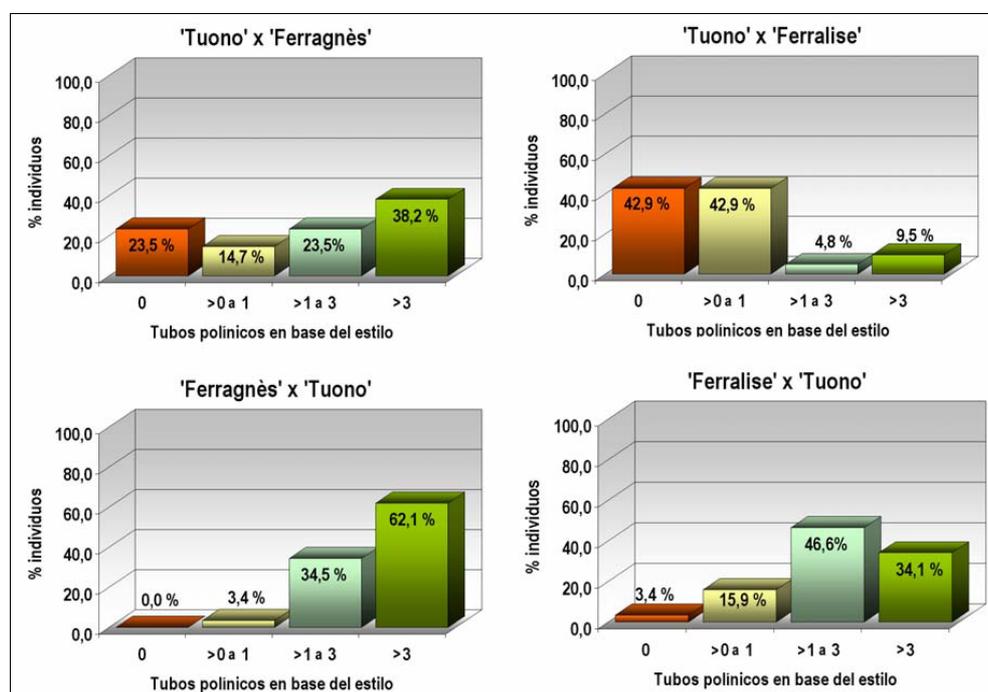


Fig. 3.8 Distribución de los individuos en función de la cantidad media de tubos polínicos con llegada a base de los estilos.

La mayor cantidad de tubos polínicos en la base del estilo parece estar influida por el parental autoincompatible del que procede el pistilo. En general, los pistilos pertenecientes a individuos autocompatibles de descendientes de 'Ferragnès' presentaron una mayor cantidad de tubos polínicos en la base del estilo que los pistilos de los descendientes de 'Ferralise' (Cuadro 3.11), y lo mismo se observó con los pistilos pertenecientes a los individuos autocompatibles de la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' respecto a los de 'Tuono' x 'Ferralise'. Este comportamiento, puede tener una base genética relacionada con estos parentales ya que este mismo comportamiento se ha observado en polinizaciones realizadas en estos parentales (SOCIAS I COMPANY Y ALONSO, 2004).

Cuadro 3.11 Estadística descriptiva sobre la cantidad media de tubos polínicos en la base de los estilos de los individuos autocompatibles y autoincompatibles.

DESCENDIENTES DE	INDIVIDUOS AUTOCOMPATIBLES			INDIVIDUOS AUTOINCOMPATIBLES		
	Pistilos	Media	Desv. típica	Pistilos	Media	Desv. típica
'Ferragnès'	736	3,47 a	2,84	183	0,07 b	0,35
'Ferralise'	1109	2,86 b	2,56	449	0,18 a	0,66
'Tuono' ♀	Pistilos	Media	Desv. típica	Pistilos	Media	Desv. típica
'Tuono' x 'Ferragnès'	411	3,63 a	2,84	183	0,07	0,35
'Tuono' x 'Ferralise'	1050	2,85 b	2,57	251	0,08	0,37
'Tuono' ♂	Pistilos	Media	Desv. típica	Pistilos	Media	Desv. típica
'Ferragnès' x 'Tuono'	325	3,27	2,83	0	-	-
'Ferralise' x 'Tuono'	59	3,11	2,23	198	0,30	0,89

3.4 DISCUSIÓN

Después de analizar el crecimiento de los tubos polínicos durante varios años, no se ha podido determinar un fenotipo fiable en algunos individuos, de manera que se consideraron dudosos. Este comportamiento aparece en todos los casos en los que se ha estudiado el crecimiento de los tubos polínicos (SOCIAS I COMPANY, 1990), por lo que la expresión fenotípica de cada genotipo está condicionada por diversos factores. En los genotipos dudosos se produjo un comportamiento heterogéneo, contradictorio de unos años a otros, o con pocos pistilos con llegada de un número reducido de tubos polínicos a su base. Es posible que en estos individuos el estrés causado a la flor por la emasculación y manipulación, unido al cambio producido en su entorno (nutrición, humedad, temperatura, etc), podría afectar a su biología reproductiva. En este aspecto se puede indicar que el contacto directo de la flor con el agua la mantiene perfectamente hidratada, mientras que en la espuma de florista, el contacto entre el extremo del pedúnculo con el agua es menos directo, produciéndose en algunos casos un pequeño marchitamiento de las flores.

Por otra parte, se ha observado variabilidad en la tinción de los tubos polínicos entre los individuos, de manera que en algunos resulta difícil la observación, pudiendo no apreciarse con claridad la llegada de los tubos polínicos a la base del estilo.

Pese a estos pequeños inconvenientes que son reflejo de una reacción biológica, por lo general variable, y no física, que por lo contrario sería constante, la determinación de la autocompatibilidad a través de microscopía ultravioleta del crecimiento de los tubos polínicos resulta un método fiable, sencillo y barato, ya que en los casos claros de autocompatibilidad o autoincompatibilidad hay una reacción constante en la respuesta de los tubos polínicos.

3.4.1 PROPORCIONES FENOTÍPICAS

Las proporciones fenotípicas observadas en la descendencia de 'Tuono' x 'Ferragnès' sufren una desviación a favor de los individuos autocompatibles, de acuerdo con lo ya observado por SOCIAS I COMPANY (1988) y DICENTA Y GARCÍA (1993), quienes también realizaron sus determinaciones mediante el estudio microscópico del crecimiento de los tubos polínicos tras la autopolinización de flores en bandeja (Cuadro 3.12). A pesar de que la proporción esperada sería de 1:1, en el conjunto de las tres poblaciones 'Tuono' x 'Ferragnès' estudiadas, el riesgo de rechazar esta hipótesis sólo representa un error del 4% ($\alpha=0,004$) y con este origen las proporciones fenotípicas obtenidas se aproximan más a la proporción 2:1.

Cuadro 3.12 Proporciones fenotípicas observadas en las descendencias y cómputo de las mismas.

'Tuono' x 'Ferragnès'	Individuos			%		χ^2	α
	AC	AI	Total	AC	AI		
SOCIAS I COMPANY, 1988 *	11	7	18	61,1	38,8	0,50	0,479
DICENTA Y GARCÍA, 1993 *	36	17	53	67,9	32,0	6,11	0,013
Población estudiada *	20	13	33	60,6	39,4	1,09	0,296
Cómputo total	67	37	104	64,4	35,6	8,08	0,004
'Ferragnès' x 'Tuono'	Individuos			%		χ^2	α
	AC	AI	Total	AC	AI		
GRASSELLY, 1985 *	142	12	154	92,2	7,8	-	-
DICENTA Y GARCÍA, 1993 *	50	0	50	100,0	0,0	-	-
PALASCIANO ET AL., 1998 *	29	20	49	59,2	40,8	-	-
BALLESTER ET AL., 1998 *	58	0	58	100,0	0,0	-	-
Población estudiada *	28	0	28	100,0	0,0	-	-
Cómputo total	307	32	339	90,2	9,8	-	-
'Tuono' x 'Ferralise'	Individuos			%		χ^2	α
	AC	AI	Total	AC	AI		
Población estudiada *	4	17	21	19,1	80,9	6,85	0,009
'Ferralise' x 'Tuono'	Individuos			%		χ^2	α
	AC	AI	Total	AC	AI		
GRASSELLY, 1985 *	21	15	36	68,3	41,7	-	-
Población estudiada *	69	9	78	88,5	11,5	-	-
Cómputo total	90	24	114	78,9	21,1	-	-

AC: autocompatibles; AI: autoincompatibles; * procedentes de embolsado; + procedentes de microscopía.

La autocompatibilidad de 'Tuono' se transmitió a todos los descendientes de la familia 'Ferragnès' x 'Tuono', tal como sugirieron DICENTA Y GARCÍA (1993) para los cruzamientos en los que la variedad autocompatible utilizada como parental masculino comparte un alelo de incompatibilidad con el parental femenino. Los resultados obtenidos en esta población coinciden con las determinaciones fenotípicas realizadas en otras poblaciones 'Ferragnès' x 'Tuono' mediante la observación microscópica de la llegada de tubos polínicos a la base del estilo, mientras que en las determinaciones fenotípicas a partir de los cuajados de frutos producidos en ramas embolsadas, aparecen individuos calificados como autoincompatibles. En la progenie descrita por GRASSELLY Y OLMIER (1984) y GRASSELLY (1985) se muestra el comportamiento de 12 individuos considerados dudosos por no superar un cuajado del 5%, aunque no se concretó el número de observaciones realizadas, ni si se señalaron variaciones en el caso de ser más de una. Es muy improbable que el bajo cuajado producido en estos individuos se haya debido a la presencia de autoincompatibilidad, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las observaciones microscópicas, sino al efecto negativo del embolsado de las ramas en el cuajado, o a la morfología inadecuada de la flor, que pudiera impedir la autogamia de la planta.

Los resultados de PALASCIANO *ET AL.* (1998) para su familia de 'Ferragnès' x 'Tuono' (Cuadro 3.12), obtenidos también tras la evaluación de cuajados producidos en ramas embolsadas, resultan sorprendentes, ya que muestran un buen ajuste a la proporción 1:1, que sería la esperada en un cruzamiento en el que los parentales no compartiesen ningún alelo de autoincompatibilidad o en el cruzamiento recíproco. Sin embargo, el estudio del cuajado se realizó en una fracción de la población inicial, en la que se supone que no hay problemas de consanguinidad, porque una selección previa eliminó los individuos que mostraron retraso o parada en su crecimiento o un retraso en la entrada en producción, lo que indica un largo período juvenil, probablemente correlacionado con la presencia de endogamia, además de eliminar los individuos con un elevado porcentaje en semillas dobles. Debido al desconocimiento de la metodología y, sobre todo, del número de años en los que se realizó el embolsado para llegar a estas conclusiones, no se pueden analizar con criterio estos datos, si bien el resultado obtenido no sería extraño si la determinación fuera de un sólo año, ya que como indican SOCIAS I COMPANY *ET AL.* (2002), el cuajado producido en ramas embolsadas de almendros autocompatibles, está muy influido por las condiciones ambientales, produciéndose cuajados erráticos con frecuencia, de manera que las determinaciones de un solo año no pueden ser concluyentes.

No se tienen referencias de la transmisión fenotípica de la autocompatibilidad en poblaciones de 'Tuono' x 'Ferralise'. En la población estudiada, las proporciones fenotípicas

observadas se desvían de las esperadas (1:1), en este caso a favor de los individuos autoincompatibles, opuestamente a lo observado en las poblaciones de 'Tuono' x 'Ferragnès', donde se producía el predominio de los individuos autocompatibles. Con los resultados obtenidos, rechazar la hipótesis de igualdad de las proporciones fenotípicas supondría un riesgo de error de sólo el 9% ($\alpha=0,009$).

Teóricamente, la descendencia del cruzamiento 'Ferralise' x 'Tuono' debería ser totalmente autocompatible, pero el estudio del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos de esta familia indicó la presencia de 9 individuos autoincompatibles y otros 10 individuos con comportamiento dudoso. En la familia 'Ferralise' x 'Tuono' estudiada por GRASSELLY (1985), también se detectó la presencia de individuos autoincompatibles, en una proporción aún mayor, si bien como se ha indicado anteriormente, estos resultados fueron obtenidos por análisis de cuajados en ramas embolsadas. Estos resultados contrastan con las determinaciones fenotípicas realizadas mediante la observación microscópica de los tubos polínicos en las descendencias de 'Ferragnès' x 'Tuono' (Cuadro 3.12), en las que no se observó ningún individuo autoincompatible y la estudiada por GRASSELLY (1985), que mostró una proporción de individuos autoincompatibles mucho mayor mediante cuajados en las familias de 'Ferragnès' x 'Tuono'.

Por consiguiente, existe un comportamiento diferencial de la transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' a las descendencias según que el parental autoincompatible sea 'Ferragnès' o 'Ferralise'. Las familias procedentes de 'Ferralise' muestran una proporción de individuos autoincompatibles mayor que las procedentes de 'Ferragnès', a pesar de tener el mismo genotipo de autoincompatibilidad.

SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1988) indicaron que la mayor proporción de individuos autocompatibles en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' podía ser debida a la fijación de genes letales o deletéreos ligados en repulsión con la autocompatibilidad. Esta hipótesis se basa en el posible parentesco de 'Cristomorto', parental femenino de 'Ferragnès', con 'Tuono', al proceder ambas de la región italiana de la Apulia y poseer las dos el alelo S_7 de autoincompatibilidad.

Sin embargo, la única variedad de almendro de la que existen referencias sobre la presencia de endogamia es 'Ferralise', ya que procede del cruzamiento de dos variedades hermanas completas (Fig. 2.1), 'Ferraduel' y 'Ferragnès', lo que implica que posee un coeficiente de endogamia (F) igual a 0,250 (LANSARI ET AL., 1994). Por lo tanto, si la hipótesis de SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1988) se cumpliera en la descendencia de 'Tuono' x 'Ferralise', debería también haber una mayor proporción de individuos autocompatibles. Sin embargo ocurre precisamente lo opuesto, con un 80% de individuos autoincompatibles.

Por otra parte, en las familias en las que 'Tuono' es el parental masculino, se observaron individuos autoincompatibles en la familia 'Ferralise' x 'Tuono', mientras que ello no ocurre en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono'. Es posible que en las descendencias de 'Ferralise', debido a una mayor presencia de endogamia, una parte de los individuos calificados como autoincompatibles en realidad no lo sean genéticamente, y la incapacidad de los tubos polínicos propios en llegar a la base del estilo se deba a factores fisiológicos relacionados con la consanguinidad y que afectan a la biología reproductiva.

En la relación polen-estilo, la presencia de consanguinidad podría afectar a la capacidad germinativa del polen. Sin embargo, los pistilos con una pequeña cantidad de polen germinado y con pocos tubos polínicos penetrando en el tejido transmisor fueron eliminados del análisis. La consanguinidad también podría afectar a la expresión de los genes que regulan las rutas metabólicas implicadas en la elongación y el crecimiento de los tubos polínicos, provocando una tasa de crecimiento baja o incluso su parada. Esta parada también podría deberse a una insuficiente acumulación de reservas en el tejido transmisor, de manera que los tubos polínicos se detendrían una vez que las hubieran consumido, como la reducción o parada de tubos polínicos por la competencia en espacio y reservas en el tejido transmisor (HERRERO Y HORMAZA, 1996). Otra posible causa de la parada de los tubos polínicos en el estilo podría deberse a deficiencias en la captación y aprovechamiento de las reservas estilares por los tubos polínicos, como consecuencia de la endogamia.

3.4.2 INFORMACIÓN AGRONÓMICA DE LA OBSERVACIÓN DE LOS TUBOS POLÍNICOS

La proporción de pistilos con tubos polínicos propios en la base del estilo aporta una información agronómica sobre la autocompatibilidad o autoincompatibilidad que muestra la planta. Es de suponer que cuanto mayor sea la proporción de pistilos con llegada de tubos polínicos, se producirá un mayor cuajado inicial de frutos, lo que se traducirá en una mayor cosecha. Así, las plantas autocompatibles que muestran una proporción superior al 75% de pistilos con tubos en su base resultan a priori de mayor interés agronómico que las que presentan una proporción del 50 al 75%. Se ha observado (Fig. 3.7) que las familias en las que 'Tuono' es el parental femenino, los individuos autocompatibles se distribuyen similarmente en los dos rangos de compatibilidad. Sin embargo, cuando 'Tuono' es el parental masculino, se observó un predominio de individuos con llegada de tubos polínicos en la base en más del 75% de los pistilos observados.

Aunque teóricamente la fecundación del óvulo se puede producir con la presencia de un solo tubo polínico en la base del estilo (PIMIENTA Y POLITO, 1983), en algunos casos el crecimiento del tubo polínico puede resultar caótico antes o después del obturador, fracasando en la fecundación del óvulo primario (COUSIN Y EL MAATAOUI, 1998). La probabilidad de éxito en la fecundación aumenta, por lo tanto, con el número de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo. Por consiguiente, la cantidad media de tubos polínicos en la base del estilo puede ser utilizada como criterio de selección del nuevo material autocompatible generado en los programas de mejora.

En las familias estudiadas se observa que en general los descendientes de 'Ferragnès' muestran más tubos polínicos en la base del estilo que los descendientes de 'Ferralise', debido principalmente a la mayor proporción de individuos autocompatibles que superan los 3 tubos polínicos en la base por pistilo en las familias de 'Ferragnès' en relación a las familias de 'Ferralise', en las que la fracción de individuos que presentan de 1 a 3 tubos polínicos en la base del estilo es superior a la de los que superan los 3 tubos polínicos. Esta diferencia entre las poblaciones puede ser una consecuencia de la consanguinidad presente en 'Ferralise'.

De esta manera, la observación del crecimiento de los tubos polínicos muestra una información agronómica importante sobre el comportamiento de la autocompatibilidad o autoincompatibilidad de los individuos, en cuanto a su capacidad de cuajado en condiciones de campo. Permite, además de determinar que el individuo es autocompatible, determinar la cantidad de pistilos que presentan tubos polínicos en la base del estilo y en qué cantidad lo hacen, pudiendo utilizarse esta información como criterio de selección hacia la búsqueda de mayores producciones en el material vegetal autocompatible.

3.5. CONCLUSIONES

Las proporciones fenotípicas observadas indican que la transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' a las diferentes descendencias con 'Ferragnès' y 'Ferralise', depende del parental autoincompatible.

En la descendencia de 'Tuono' x 'Ferragnès' se ha constatado el predominio de los individuos autocompatibles sobre los autoincompatibles, mientras que en la descendencia de 'Tuono' x 'Ferralise' se ha observado el predominio de los individuos autoincompatibles sobre los autocompatibles.

Se ha confirmado que la autocompatibilidad de 'Tuono' se transmite a todos los descendientes de 'Ferragnès' x 'Tuono', mientras que en la descendencia de 'Ferralise' x 'Tuono' se ha observado la presencia de varios individuos autoincompatibles.

La presencia de individuos autoincompatibles en la familia 'Ferralise' x 'Tuono', indica que éstos pueden presentar una autocompatibilidad genética, pero no fisiológica, debido a la consanguinidad de 'Ferralise', pudiendo existir también plantas autoincompatibles fisiológicas en la familia 'Tuono' x 'Ferralise', lo que explicaría la gran proporción observada de fenotipos autoincompatibles.

En las familias estudiadas, la consanguinidad de 'Ferralise' afecta no sólo al número de pistilos con tubos polínicos en su base, sino también a la cantidad de tubos en la base, respecto a los resultados obtenidos con 'Ferragnès'.

La proporción de pistilos que presentan tubos polínicos en su base, así como el número de tubos, pueden utilizarse como criterio de selección para la autocompatibilidad, hacia la búsqueda de un mayor cuajado de frutos.

4. DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DEL LOCUS S MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS S-RNASAS ESTILARES

4. DETERMINACIÓN GENOTÍPICA DEL LOCUS S MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS S-RNASAS ESTILARES

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 DESCUBRIMIENTO DE LAS S-RNASAS

El locus S se ha descrito clásicamente como un locus complejo que contiene al menos dos genes estrechamente ligados y que codifican para la expresión de los componentes de la reacción de autoincompatibilidad en el polen y en el pistilo. Debido a la presencia de al menos dos genes multi-alélicos, el término "haplotipo" se ha usado para describir a las variantes del locus S, mientras que el término "alelo" se ha reservado para las variantes de un gen polimórfico dado en este locus S (McCUBBIN Y KAO, 2000).

En la solanácea *Nicotiana glauca* se descubrió que cada locus S codifica en el estilo una glicoproteína básica específica, con actividad ribonucleasa, llamada S-RNasa (McCLURE ET AL., 1989), comprobándose más tarde que estas glicoproteínas eran las responsables del rechazo del polen por el estilo en las polinizaciones incompatibles (HUANG ET AL., 1994; MURFETT ET AL., 1994; LEE ET AL., 1994).

Estudios posteriores mostraron también la presencia de S-RNasas asociadas a las reacciones de incompatibilidad en la familias *Scrophulariaceae* (XUE ET AL., 1996) y *Rosaceae*, en particular en los géneros *Malus* (BROOThAERTS ET AL., 1995; SASSA ET AL., 1996) y *Pyrus* (SASSA ET AL. 1992, 1993; NORIOKA ET AL., 1996; ISHIMIZU ET AL., 1998; ZUCCHERELLI ET AL., 2002). Recientemente se ha profundizado en el estudio de las ribonucleasas estilares del género *Prunus*, en concreto en el almendro (BOŠKOVIĆ ET AL., 1997, 2003, TAO ET AL., 1997; USHIJIMA ET AL., 1998, CERTAL ET AL., 2002), el albaricoquero europeo (*P. armeniaca*) (BURGOS ET AL., 1998), el albaricoquero japonés (*Prunus mume*) (YAEGAKI ET AL., 2001, TAO ET AL., 2002), el guindo (*P. cerasus*) (YAMANE ET AL., 2001) y el cerezo (*P. avium*) (BOŠKOVIĆ Y TOBUTT, 1996; TAO ET AL., 1999a, 1999b, 1999c, HAUCK ET AL., 2001; SONNEVEID ET AL., 2001; WIERSMA ET AL., 2001).

Las S-RNasas son unas glicoproteínas de tamaño comprendido entre 30 y 40 KDa (AI ET AL., 1990, TAO ET AL., 1997; CERTAL ET AL., 2002), que se encuentran en una distribución homogénea a lo largo de todo el estilo (CERTAL ET AL., 1999, 2002), representando del 1 al 10% de la composición del mismo (McCUBBIN Y DICKINSON, 1997) y entre el 40 y el 80% de la actividad RNasa total de los extractos estilares (HARING ET AL., 1990).

4.1.2 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LAS S-RNAS

La secuenciación del cDNA que codifica para algunas S-RNAs en *Nicotiana glauca* (ANDERSON ET AL., 1986,1989), permitió el clonado de los alelos S en varias especies pertenecientes a las solanáceas *Nicotiana glauca* (KHEYR-POUR ET AL., 1990), *Petunia híbrida* (CLARK ET AL., 1990), *P. inflata* (AI ET AL., 1990), *Solanum Chacoense* (XU ET AL., 1990a,1990b), *S. tuberosum* (KAUFMANN ET AL., 1991) y *Lycopersicum peruvianum* (TSAI ET AL., 1992; RIVERS ET AL., 1993; ROYO ET AL., 1994) durante los primeros años 90.

Mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de parte de estas S-RNAs de las solanáceas, se delimitaron cinco regiones conservadas, denominadas de C1 a C5, y dos regiones hipervariables, denominadas HVa y HVb (IOERGER ET AL.,1991). Las regiones C2 y C3 presentan cada una histidina, esenciales para la actividad RNasa, como ocurre con las ribonucleasas de los hongos de tipo *T₂* y *Rh*, con las que muestran un alto grado de similitud, así como con un gran número de otras ribonucleasas presentes en otros organismos (MCCLURE ET AL., 1989; SINGH Y KAO, 1992; GREEN 1994). Las regiones C1, C4 y C5 contienen mayoritariamente aminoácidos hidrófobos, lo que sugiere que estas regiones pueden formar el corazón estructural de la S-RNAs. El carácter hidrófilo de las regiones con gran variabilidad de aminoácidos, HVa y HVb, sugiere la configuración superficial de estas regiones en las S-RNAs. Se cree que las regiones HVa y HVb están implicadas en la especificidad de la reacción de autoincompatibilidad, siendo responsables del reconocimiento del polen (MATTON ET AL., 1997).

Tras la alineación de los aminoácidos de las S-RNAs presentes en las rosáceas, se observó bastante homología respecto a las presentes en las solanáceas. La posición correspondiente a la región C4 de las solanáceas está bastante conservada dentro de las rosáceas, pero no mantiene la homología con la región C4 de las solanáceas, denominándose en las rosáceas RC4 (Rosaceae C4) (SASSA ET AL., 1996). Además, en las rosáceas sólo se encontró una región con gran variabilidad de aminoácidos, denominada RHV, correspondiente a la situación de HVa de las solanáceas. Los aminoácidos situados en la posición de la HVb de las solanáceas, no mostraron tanta variabilidad en las rosáceas, siendo una región bastante conservada en el género *Prunus* (USHIJIMA ET AL., 1998).

El análisis evolutivo molecular reveló que las S-RNAs de las solanáceas y escrofulariáceas comparten un antecesor común; sin embargo, las S-RNAs de las rosáceas tienen una relación distante con ellas (RICHMAN ET AL., 1997; USHIJIMA ET AL., 1998). En el árbol filogenético de cada uno de los tres tipos de RNAs (RNAs tipoT2/S), las S-RNAs de las rosáceas se colocan dentro de dos grupos específicos: Amygdaloideae (almendro y cerezo) y Maloideae

(manzano y peral) (MA Y OLIVEIRA, 2001). Además, dentro de las rosáceas, las estructuras de los genes de las S-RNasas también difieren, de manera que los *Prunus* de los que hay referencia presentan dos intrones, mientras que en los *Malus* sólo hay un intrón (IGIC Y KOHN, 2001), observándose que las S-RNasas de *Prunus* presentan sólo un 30% de similitud con respecto a las de *Malus*.

Hasta el momento se ha obtenido la estructura cristalina de algunas S-RNasas de *Pyrus pyrifolia* y *Nicotiana glauca* (MATSUURA ET AL., 2001; IDA ET AL., 2001). Las S-RNasas tienen una estructura del tipo $\alpha+\beta$, consistente en seis hélices α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\alpha 8$), dos hélices β ($\beta 3$ y $\beta 5$) y siete cadenas β (de $\beta 1$ a $\beta 7$), mostrando un tipo de plegado típico de las RNasas de la familia T₂. La zona correspondiente a la región RHV en *Pyrus pyrifolia* comprende un gran bucle y una hélice α corta con carga positiva en la superficie de la molécula y junto con otras cuatro regiones seleccionadas, llamadas PS (positively selected), son los sitios candidatos para localizar la interacción con el/los producto/os de expresión del locus S del polen. A medida de que avance el conocimiento de la estructura tridimensional de las S-RNasas, progresará la comprensión del funcionamiento de las S-RNasas durante la reacción de auto-incompatibilidad.

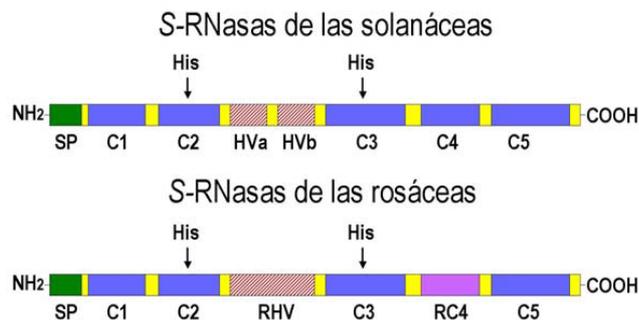


Fig. 4.1 Representación esquemática de las regiones conservadas en las S-RNasas estilares.

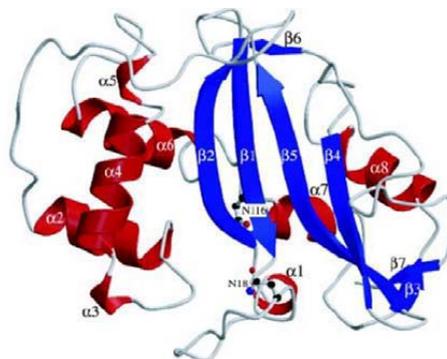


Fig. 4.2 Representación de la estructura cristalina de la S₃ RNasa de *Pyrus pyrifolia* (MATSUURA ET AL., 2001).

4.1.3 CORRELACIÓN DE LAS S-RNASAS CON LOS GENOTIPOS DE INCOMPATIBILIDAD

En una primera aproximación, YAMASHITA *ET AL.* (1987) caracterizaron la fracción proteica de los extractos estilares y del polen en almendro, mediante IEF (Isoelectric Focusing) y SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis), y encontraron similitudes entre los patrones de bandas proteicas de *P. webbii* y la variedad autocompatible 'Tuono', lo que podría indicar la transferencia del alelo S_f de *P. webbii* a 'Tuono'. También encontraron bandas de proteínas que podrían estar relacionadas con los alelos S_2 , S_3 y S_4 .

El enfoque isoelectrico (IEF) es un tipo de electroforesis que se basa en el desplazamiento de las proteínas en un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoelectrico. Los aminoácidos son moléculas anfotéricas que se cargan eléctricamente dependiendo del pH en el que se encuentren, de manera que el conjunto de la proteína varía su carga eléctrica en función del pH del medio. En el IEF, las proteínas migran hacia la región del gel cuyo pH hace que su carga eléctrica neta sea nula, es decir, hasta su punto isoelectrico. En el gel de electroforesis se debe crear un gradiente de pH, de tal manera que las proteínas a separar tengan sus puntos isoelectricos dentro del rango establecido. Las S-RNAsas que se encuentren inicialmente cargadas positivamente por estar situadas en un pH inferior a su punto isoelectrico (ánodo en solución ácida), migrarán en dirección del cátodo (solución alcalina), hasta encontrar la zona del gel con un pH igual a su pl. De esta forma las proteínas se sitúan en estrechas bandas donde su pl coincide con el pH.

La SDS-PAGE es una electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS, un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas. Esta unión bloquea la carga propia de la proteína y confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, migrando hacia el ánodo en la electroforesis. La separación es proporcional sólo a la masa de la proteína siendo posible determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

La aplicación de la tinción de geles de electroforesis para la actividad ribonucleasa desarrollada por WILLSON (1971) permitió la diferenciación de las S-RNAsas del resto del extracto proteico estilar. Así, SASSA *ET AL.* (1992) e HIRATSUKA *ET AL.* (1995), tras el enfoque isoelectrico (IEF) de extractos estilares purificados, detectaron bandas con actividad RNasa asociadas con los alelos de incompatibilidad en peral japonés (*Pyrus serotina*). Inspirándose en estos trabajos, BOŠKOVIĆ Y TOBUTT (1996), correlacionaron las bandas obtenidas con los genotipos de incompatibilidad en cerezo (*Prunus avium*), indicando la idoneidad de la técnica para detectar nuevos alelos de autoincompatibilidad y completar los grupos de interincompatibilidad en el cerezo. Sin embargo, se observó que muchas S-RNAsas muestran un pl y una masa molecular parecidos, por lo que resulta

difícil diferenciarlas mediante la técnica de IEF. Por ello fue necesario emplear otras técnicas electroforéticas en la separación de las mismas, como la compleja electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida (2D-PAGE), seguida por la separación de las S-RNasas con técnicas inmunológicas, aplicada por SASSA *ET AL.* (1994) en manzano (*Malus x domestica*).

La electroforesis bidimensional (2D-PAGE) se basa en la separación de las proteínas según sus dos propiedades moleculares, de manera que en una primera dimensión se realiza la separación mediante isoelectroenfoque y en una segunda dimensión ortogonal a la primera, tiene lugar la separación según el peso molecular mediante la electroforesis en poliacrilamida-SDS.

En 1997, TAO *ET AL.*, utilizaron las dos técnicas, IEF y 2D-PAGE, en la identificación de las S-RNasas asociadas a los alelos de auto-incompatibilidad presentes en las variedades californianas de almendro, obteniendo buenas separaciones entre las S^a , S^b , S^c y S^d –RNasas.

En el mismo año, BOŠKOVIĆ *ET AL.* (1997) correlacionaron las S-RNasas presentes en 29 variedades de almendro con los genotipos S de las mismas, indicando la correspondencia entre las denominaciones alélicas americana y europea (S^b/S_1 , S^a/S_5 , S^c/S_7 y S^d/S_8), detectando la presencia de dos nuevos alelos y la ausencia de una banda con actividad RNasa correlacionada con el alelo de autocompatibilidad (S_i). Para ello aplicaron la técnica NEpHGE (Non-equilibrium pH gradient electrofocusing), una modificación de la IEF desarrollada por O'FARRELL *ET AL.* (1977). La NEpHGE se caracteriza por la disminución del tiempo de electroforesis con respecto a la IEF y por un progresivo aumento del potencial eléctrico al que se somete el gel. Estas variaciones permiten el agrupamiento de las S-RNasas anterior a su llegada al pl, y la separación de las S-RNasas con pl similares mediante variaciones en las condiciones de migración.

Esta técnica ha sido utilizada recientemente en la determinación de los genotipos y la identificación de los individuos autocompatibles en progenies de mejora de almendro (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998, DUVAL *ET AL.*, 1998, BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1999) y albaricoquero (BURGOS *ET AL.*, 1998), así como para localizar el gen de la autoincompatibilidad en el mapa de ligamiento del almendro (BALLESTER *ET AL.*, 1998).

Recientemente, BOŠKOVIĆ *ET AL.* (2003), han indicado la posibilidad de predicción de los genotipos de incompatibilidad a partir de la identificación de las S-RNasas estilares. En su trabajo realizado con 35 variedades de almendro, detectaron 13 nuevas S-RNasas y predijeron el genotipo S en 19 variedades, datos validados posteriormente mediante cruzamientos en campo.

El conocimiento de los genotipos S mediante la identificación de las S-RNasas permite completar los grupos de interincompatibilidad del almendro, información que ayuda a diseñar los

cruzamientos en los programas de mejora y la elección de variedades polinizadoras en las nuevas plantaciones (BATLLE *ET AL.*, 1999).

Además, la utilización de la técnica electroforética NEpHGE para la identificación de los genotipos S en progenies segregantes para la autocompatibilidad, permite la selección de los individuos auto-compatibles una vez que éstos produzcan las primeras flores.

El objetivo de este apartado es el conocimiento de los genotipos S en los individuos de las familias estudiadas mediante la identificación de las S-RNasas estilares con la técnica NEpHGE. Para ello se va a comparar el patrón de bandas propias de los parentales, correspondientes a S_1 -RNasa y S_3 -RNasa presentes en 'Ferragnès' y 'Ferralise', y la S_1 -RNasa presente en 'Tuono' con los patrones de bandas correspondientes a los tres genotipos posibles según los diseños de los cruzamientos, S_1S_3 y S_1S_f en las familias en las que 'Tuono' es el parental femenino y S_1S_f y S_3S_f en las familias en las que 'Tuono' es el parental masculino.

4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1 PROPORCIONES GENOTÍPICAS ESPERADAS EN EL MATERIAL VEGETAL

En la Fig. 4.3 se muestran las proporciones de genotipos S esperadas según la dirección de los cruzamientos estudiados. Así, en las descendencias en las que 'Tuono' es el parental femenino, las proporciones esperadas son 1 S_1S_3 : 1 S_fS_3 . Debido a que los cruzamientos son semicompatibles, teóricamente sólo los tubos polínicos con el genotipo haploide S_3 de 'Ferragnès' y 'Ferralise' podrían atravesar el tejido estilar S_1S_f de 'Tuono' y producir la fecundación de sus óvulos, mientras que los tubos polínicos con genotipo S_1 , deberían haber detenido su crecimiento al recibir la actuación de la S_1 -RNasa presente en los estilos de 'Tuono', sin la posibilidad de producir la fecundación de sus óvulos.

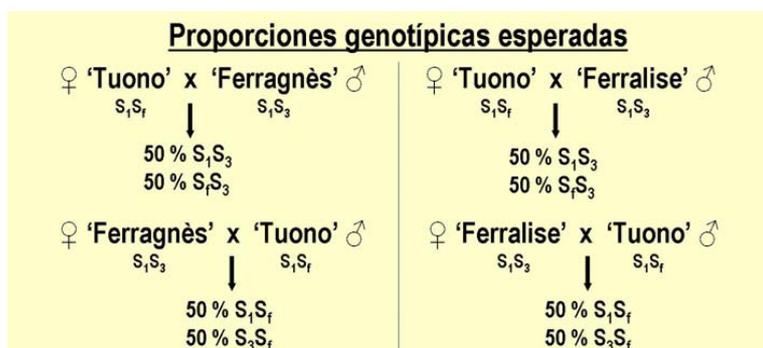


Fig. 4.3 Proporciones genotípicas esperadas en las descendencias.

En el caso de las descendencias procedentes de los cruzamientos en los que 'Tuono' se utilizó como parental masculino, las proporciones serían 1 S_7S_f : 1 S_3S_f . Al igual que en el caso anterior, los cruzamientos son semicompatibles, de manera que sólo los tubos polínicos de 'Tuono' con el genotipo haploide S_f podrían atravesar los estilos S_7S_3 de 'Ferragnès' y 'Ferralise', mientras que los tubos S_7 deberían sufrir la actuación de las S_7 -RNAs y detener su crecimiento.

4.2.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS S-RNAS MEDIANTE LA NEPHGE

La determinación genotípica de los alelos de autoincompatibilidad en los individuos de distintas descendencias, se ha realizado mediante la separación de las S-RNAs estilares con la técnica electroforética NEpHGE. Esta técnica se puede dividir en tres fases, que a continuación se explican.

4.2.2.1 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTILARES

Durante las floraciones de 2000 y 2001, se recogieron 30 yemas florales de cada individuo en estado D (FELIPE, 1977). Una vez en el laboratorio se separaron los estilos y se colocaron 15 pistilos por tubo eppendorff de 1,5 ml, de manera se guardaron dos muestras por planta en un ultracongelador (-80°C) hasta la extracción de las proteínas estilares.

Para la extracción de las proteínas estilares las muestras se ultracongelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron utilizando como mortero el tubo eppendorff de 1,5 ml con la muestra y como maza una barrita de plástico acoplada a un taladro. Una vez pulverizada la muestra se añadieron 500 μl de tampón de extracción (Anejo I). La muestra se homogeneizó agitando el tubo hasta que la muestra se descongela y adquiere un aspecto uniforme. Seguidamente las muestras se centrifugaron a 14.500 rpm a una temperatura de -4°C durante 1 hora. Después de la centrifugación se vertió el sobrenadante en tubos eppendorff estériles de 1,5 ml, y los extractos proteicos se guardaron en el congelador (-80°C) hasta su utilización en la siguiente fase.

4.2.2.2 SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LAS PROTEÍNAS ESTILARES

La separación electroforética de las proteínas estilares se puede dividir en tres procesos: la preparación de los geles de poliacrilamida, la preparación de las soluciones tampón de los electrodos y la electroforesis.

Preparación del gel. El volumen de gel a preparar depende del tipo de cubeta que se dispone. En nuestro caso, se utilizó la cubeta vertical PROTEAN® II xi Cell de la firma BIO-RAD, con capacidad para dos geles de dimensiones de 160 x 160 x 1 mm y 15 muestras por gel (Anejo I).

Se montan las piezas que forman el molde de los geles de acrilamida, con una separación de 1 mm. Se preparan 50 ml de solución de geles de poliacrilamida y de forma inmediata se vierte la solución entre los cristales, con máximo cuidado para que no se formen burbujas. Una vez llenos, se introducen los peines que definen los espacios de colocación de las muestras. Se deja solidificar la solución aproximadamente una hora en el frigorífico.

Preparación de las soluciones tampón de los electrodos. Mientras se solidificaban los geles, se prepararon las soluciones tampón de los electrodos (Anejo I) y se conservaron en frío hasta su utilización.

Una vez solidificado el gel, se retiraron con cuidado los peines, y se marcaron el fondo de los pocillos en los cristales y se numeraron con un rotulador indeleble, para facilitar la visión de los pocillos durante la carga de las muestras en el gel.

Se montaron los geles en el cuerpo central de la cubeta y se añadieron las soluciones tampón de los electrodos, la solución del ánodo se colocó en el depósito superior, y la del cátodo en el depósito inferior.

La electroforesis. Esta etapa se puede dividir también en tres fases, que se pueden definir como un pre-enfocado, la carga de las muestras y la migración.

Después de llenar los depósitos con los tampones de los electrodos, se coloca la cubeta en la nevera a una temperatura de 4°C. Es necesario que la electroforesis se realice a una temperatura no superior a los 10°C para que la circulación eléctrica por el gel sea homogénea.

El pre-enfocado se realiza con el fin de crear el gradiente de pH estable en el gel. Para ello, se conecta la cubeta con polaridad invertida manteniendo una diferencia de potencial constante de 100 V durante 30 minutos. Durante el pre-enfocado, las partículas anfólicas que componen parte del gel, van migrando y se ordenan, creando un gradiente de pH en el gel. Este gradiente va de un pH bajo en la parte superior a un pH alto en la parte inferior. Cinco minutos antes de finalizar el pre-enfocado, se sacan las muestras del congelador. En cada electroforesis se pueden analizar 30 muestras, 15 por gel, de las cuales 2 corresponderán a los parentales y 13 a individuos de la población.

Cuando acaba el pre-enfocado, se procede a la carga de las muestras en los geles. En cada pocillo se introducen 50 µl de extracto proteico estilar, con ayuda de una micropipeta de volumen variable de hasta 100 µl con puntas especiales para cargado de geles verticales, ya que conviene que la muestras se depositen directamente en el fondo de los pocillos, para un buena migración y resolución.

Seguidamente, se conecta el programa de migración deseado. Dadas las características de los equipos utilizados (dimensiones de los geles) y de los puntos isoeléctricos de las S-RNAsas que se analizaban, se utilizó el programa de migración NEpHGE II (Anejo I) (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1997) obteniendo una buena separación de las S-RNAsas correspondientes a los alelos S_1 y S_3 .

4.2.2.3 REVELADO ESPECÍFICO DE LAS RNASAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Una vez finalizada la migración, se realizó el revelado específico para detectar la actividad RNasa entre las proteínas separadas por la electroforesis detallado en el Anejo I. Para ello, se retira el gel de la cubeta marcando una esquina, para conocer el orden de las muestras. Los geles se colocan en una incubadora a temperatura de 37°C, en agitación, con diferentes soluciones. En primer lugar 20 minutos con 400 ml de tampón de pH 5,8 para renaturalizar las RNAsas y recuperar su actividad. Después, 30 minutos con 200 ml de solución de RNA para impregnar todo el gel de RNA. De nuevo 20 minutos en 400 ml de tampón de pH 5,8 para la degradación del RNA añadido en los puntos del gel a los que han migrado las RNAsas estilares. Después de la actuación de las RNAsas en sobre el RNA, se retiran los geles de la incubadora, se escurren y se añade a cada gel 100 ml de ácido acético al 7% durante 3 minutos, para fijar el RNA al gel. Transcurrido el tiempo de fijación, se tiñen con 200 ml de solución de azul de toluidina durante 90 segundos. Se vierte la tinción y se llenan las bandejas con agua para desteñir toda la noche. El azul de toluidina se adhiere al RNA, de manera que en los puntos donde el RNA está degradado (lugar donde migraron las RNAsas), se produce el lavado del tinte, tomando una pigmentación blanca, mientras que el resto del gel queda teñido de color azul.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 PUESTA A PUNTO DE LA NEPHGE

La técnica NEpHGE es complicada de poner a punto debido a que existen muchos factores que intervienen en la obtención de buenos resultados. La actividad enzimática del extracto estilar es un punto primordial. Los extractos estilares procedentes de yemas de flor en estado fenológico E (FELIPE, 1977), muestran una mayor actividad RNasa que los procedentes del estado D, aunque con estos últimos también se obtiene una buena expresión de las S-RNAsas. BOŠKOVIĆ *ET AL.* (1998), aconsejan recoger las yemas florales en estado D, colocarlas en bandeja con agua hasta la antesis, que es el momento óptimo para retirar los estilos y realizar la extracción proteica. Para mantener la actividad enzimática, los extractos estilares deben mantenerse en hielo, evitando las congelaciones y descongelaciones innecesarias, ya que éstas afectan a la actividad enzimática de las RNAsas.

Otro factor es el rango de los puntos isoeléctricos (pI) de las S-RNAs que se quieran diferenciar. Si éstos están muy próximos, se deben variar los regímenes de potencial eléctrico suministrados durante la electroforesis y la proporción de la mezcla de los anfólitos en el gel para obtener un gradiente de pH más específico, tal como observaron BOŠKOVIĆ *ET AL.* (1997 y 2003). En las condiciones de este trabajo, para la separación correcta de la S₁-RNAsa y la S₃-RNAsa, que muestran unos puntos isoeléctricos de 8,9 y 9,2 (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 2003), la mejor separación se obtuvo con el régimen de potencial eléctrico de la NEpHGE II (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1997) y con geles compuestos con el 5,6% de anfólitos pH 3-10 y el 1,7% de anfólitos pH 6,7-7,7.

También se ha comprobado que la nitidez de las bandas depende de la longitud y el espesor del gel. El diseño de la cubeta influye en la homogeneidad de la circulación eléctrica a través del gel. También influye la marca comercial de los reactivos utilizados, sobre todo de los anfólitos y del RNA. En el Anejo I se incluye la lista de reactivos que mejores resultados han dado.

Otro problema apareció en la fase de tinción para la actividad RNAsa. Se observó que con un aumento de los tiempos de incubación en el tampón de pH 5,8 y con la solución de RNA con respecto a los indicados por BOŠKOVIĆ *ET AL.* (1996), se obtuvo una mayor revelación de expresión de RNAsa. Durante este proceso, conviene arrugar lo menos posible los geles al verter las soluciones, obteniéndose una mejor visión de las bandas con actividad RNAsa si los geles permanecen totalmente sumergidos, así como con agitación durante la noche de lavado.

Por consiguiente, se trata de una técnica difícil de poner a punto, que necesita modificaciones en el protocolo dependiendo del material vegetal a evaluar, con muchos puntos críticos a tener en cuenta, con los inconvenientes de trabajar con reactivos peligrosos, pero que una vez ajustada es de aplicación muy mecánica y de fácil reproducción.

4.3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS ZIMOGRAMAS

En la figura 4.4 se puede observar la interpretación de los zimogramas obtenidos tras realizar la electroforesis NEpHGE II de los extractos estilares de algunos individuos de las familias 'Tuono' x 'Ferragnès' y 'Ferralise' x 'Tuono'. Como se puede observar, 'Tuono' (S₁S₁) sólo mostró una banda con actividad RNAsa, correspondiente a la S₁-RNAsa, mientras que 'Ferragnès' y 'Ferralise' mostraron dos bandas con actividad RNAsa, correspondientes a las S₁-RNAsa y la S₃-RNAsa.

Todos los individuos de las familias en las que 'Tuono' era el parental femenino mostraron la S₃-RNAsa heredada del parental masculino. Los individuos en los que sólo se detectó esta banda, teóricamente poseen el alelo S_i, con lo que se les supone un fenotipo autocompatible y un genotipo

S_7S_3 . Los individuos que además expresaron la S_7 -RNasa heredada de 'Tuono' presentan el genotipo S_7S_3 , suponiéndoseles un fenotipo autoincompatible.

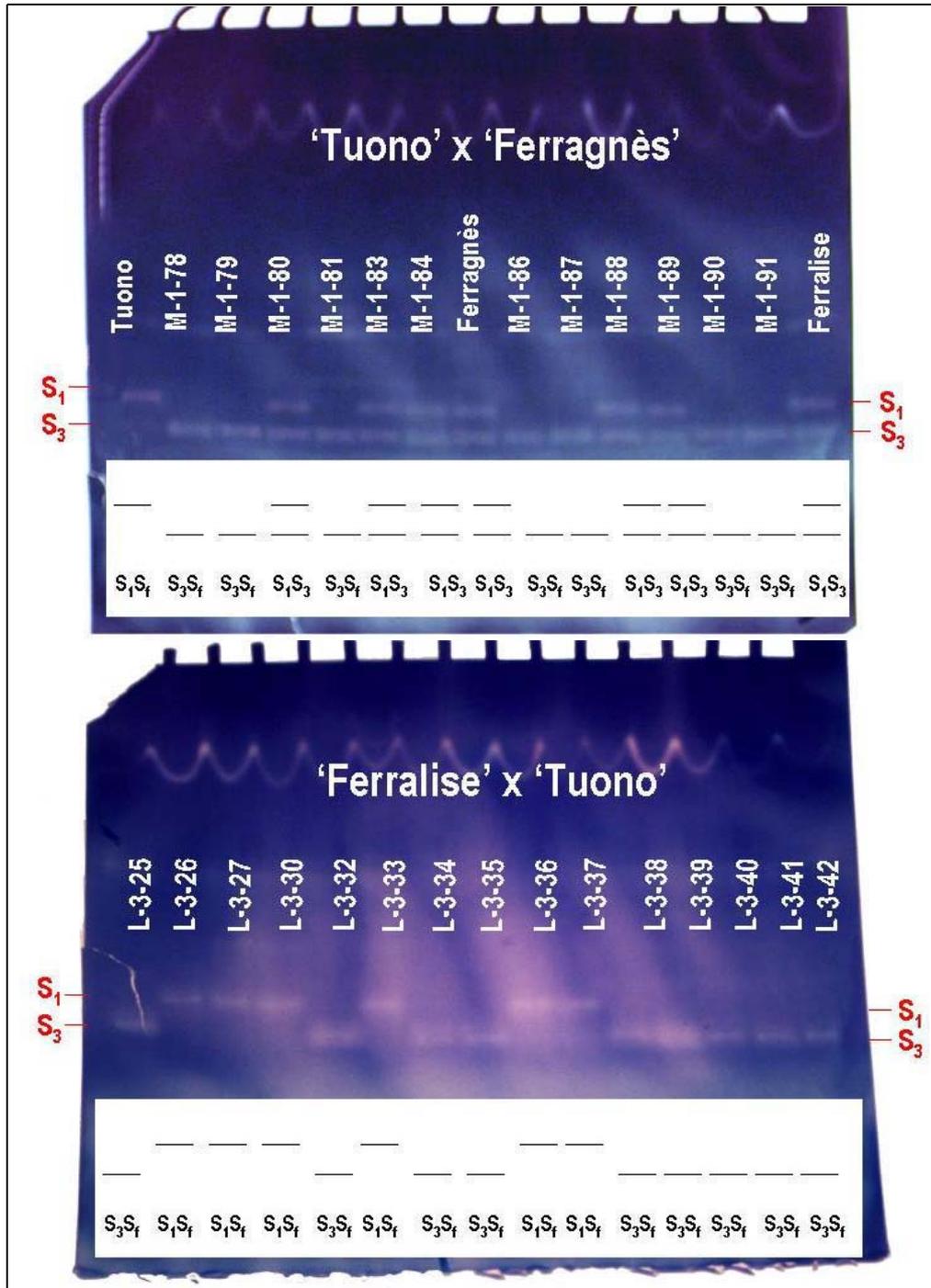


Fig.4.4 Ejemplo de la interpretación de los zimogramas.

Todos los individuos de las familias en las que 'Tuono' era el parental masculino mostraron una sola banda de S-RNasa, correspondiente o bien a la S_1 -RNasa o a la S_3 -RNasa heredadas del parental femenino, debido a que los únicos genotipos posibles son S_1S_1 y S_3S_1 . En el individuo 'L-3-13', incluido en la familia 'Ferralise' x 'Tuono', se observó la presencia de dos bandas con actividad S-RNasa, una correspondiente a la S_3 -RNasa de 'Ferralise' y la otra, distinta de la S_1 -RNasa de 'Tuono', deduciéndose que este individuo no pertenecía a esta familia, y se debió incluir por error, en algún momento anterior a su plantación en parcela. El genotipo S_3S_2 atribuido en este individuo explicaría su calificación como autoincompatible en el capítulo anterior.

Así se han obtenido los genotipos S mediante la relación de las S-RNAs expresadas en los estilos de los diferentes individuos que componen las distintas familias estudiadas, mostrados en los Cuadros 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4.

Cuadro 4.1 Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Tuono' (S_1S_1) x 'Ferragnès' (S_1S_3)

Individuo	M-1-78	M-1-79	M-1-80	M-1-81	M-1-82	M-1-83	M-1-84	M-1-85	M-1-86	M-1-87
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	Sin datos	S_1S_3	S_1S_3	Sin datos	S_1S_3	S_1S_3
Individuo	M-1-88	M-1-89	M-1-90	M-1-91	M-1-92	M-1-93	M-1-94	M-1-95	M-1-96	M-1-97
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	Sin datos	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3
Individuo	M-1-98	M-1-99	M-2-1	M-2-2	M-2-3	M-2-4	M-2-5	M-2-6	M-2-7	M-2-8
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_3	Sin datos	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3
Individuo	M-2-9	M-2-10	M-2-11	M-2-12	M-2-13	M-2-14	M-2-15			
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____			
Genotipo	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	Sin datos	S_1S_3	S_1S_3			

Cuadro 4.2 Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Ferragnès' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_1)

Individuo	M-2-16	M-2-17	M-2-18	M-2-19	M-2-20	M-2-21	M-2-22	M-2-23	M-2-24	M-2-25
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1
Individuo	M-2-26	M-2-27	M-2-28	M-2-29	M-2-30	M-2-31	M-2-32	M-2-33	M-2-34	M-2-35
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1	Sin datos	S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	Sin datos
Individuo	M-2-36	M-2-37	M-2-38	M-2-39	M-2-40	M-2-41	M-2-42	M-2-43	M-2-44	M-2-45
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	Sin datos	S_3S_1	Sin datos	S_3S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1
Individuo	M-2-46	M-2-47	M-2-48	M-2-49	M-2-50	M-2-51	M-2-52	M-2-53	M-2-54	
S_1 S_3	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	
Genotipo	Sin datos	S_1S_1	S_1S_1	Sin datos	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	Sin datos	S_1S_1	

Cuadro 4.3 Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Tuono' (S₁S₁) x 'Ferralise' (S₁S₃)

Individuo	M-2-55	M-2-56	M-2-57	M-2-58	M-2-59	M-2-60	M-2-61	M-2-62	M-2-63	M-2-64
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₃	Sin datos	S ₁ S ₃	S ₁ S ₃						
Individuo	M-2-65	M-2-66	M-2-67	M-2-68	M-2-69	M-2-70	M-2-71	M-2-72	M-2-73	M-2-74
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₃									
Individuo	M-2-75	M-2-76								
S ₁ S ₃	_____	_____								
Genotipo	S ₁ S ₃	S ₁ S ₃								

Cuadro 4.4 Interpretación de los zimogramas para la progenie de 'Ferralise' (S₁S₃) x 'Tuono' (S₁S₁)

Individuo	L-2-72	L-2-73	L-2-74	L-2-75	L-2-76	L-2-77	L-2-78	L-2-79	L-2-80	L-2-81
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	Sin datos	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁
Individuo	L-2-82	L-2-83	L-2-84	L-2-85	L-2-86	L-2-87	L-2-88	L-2-89	L-2-90	L-2-91
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	Sin datos	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁
Individuo	L-2-92	L-2-93	L-2-94	L-2-95	L-2-96	L-2-97	L-2-98	L-2-99	L-3-1	L-3-2
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁			
Individuo	L-3-3	L-3-4	L-3-5	L-3-6	L-3-7	L-3-8	L-3-9	L-3-10	L-3-11	L-3-12
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁
Individuo	L-3-13	L-3-14	L-3-15	L-3-16	L-3-17	L-3-18	L-3-19	L-3-20	L-3-21	L-3-22
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	Sin datos	S ₁ S ₁
Individuo	L-3-23	L-3-24	L-3-25	L-3-26	L-3-27	L-3-28	L-3-29	L-3-30	L-3-31	L-3-32
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁
Individuo	L-3-33	L-3-34	L-3-35	L-3-36	L-3-37	L-3-38	L-3-39	L-3-40	L-3-41	L-3-42
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁				
Individuo	L-3-43	L-3-44	L-3-45	L-3-46	L-3-47	L-3-48	L-3-49	L-3-50	L-3-51	L-3-52
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁				
Individuo	L-3-53	L-3-54	L-3-55	L-3-56	L-3-57	L-3-58	L-3-59	L-3-60	L-3-61	L-3-62
S ₁ S ₃	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Genotipo	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁	S ₃ S ₁	S ₁ S ₁	S ₃ S ₁			
Individuo	L-3-63									
S ₁ S ₃	_____									
Genotipo	S ₃ S ₁									

4.4 DISCUSIÓN

La correlación de los alelos de incompatibilidad conocidos en el almendro con sus bandas de ribonucleasas estilares, ha permitido predecir genotipos del locus S en variedades en las que se desconocía, así como descubrir nuevos alelos de autoincompatibilidad (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1997) y progresar en la formación de los grupos de interincompatibilidad polinizadora en el almendro (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998).

Debido a que el producto de expresión del alelo de auto-compatibilidad (S_f) en almendro no muestra actividad RNasa (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998), las variedades autocompatibles heterocigóticas en el locus S sólo presentan una banda con actividad RNasa, expresada por el alelo de incompatibilidad que poseen. Esta característica resulta a priori ventajosa para una rápida detección de los individuos autocompatibles en progenies de mejora segregantes para la autocompatibilidad (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998). Sin embargo, la no detección del alelo S_f mediante la técnica NEpHGE y su tinción para la actividad RNasa, también acarrea un inconveniente. En las familias de este estudio se supone la presencia del alelo S_f , ya que se conocen los parentales, su patrón de bandas con actividad RNasa y la dirección de los cruzamientos. En ellas se ha observado variabilidad en expresión de la actividad S-RNasa, dependiendo de las muestras y los individuos, reflejándose en la nitidez de la banda, hasta el punto que en algunos individuos no fue posible detectar actividad RNasa en sus extractos estilares, pese a repetir varias veces su extracción y electroforesis. La infinidad de factores que pueden hacer disminuir o en casos extremos anular la expresión y focalización de las S-RNasas mediante la técnica NEpHGE, impide determinar si estas variaciones de expresión o no expresión pueden deberse a causas genéticas.

Recientemente, ORTEGA Y DICENTA (2003) indicaron la distribución genotípica en descendencias procedentes de cruzamientos de selecciones autocompatibles heterocigóticas, asignando el genotipo $S_f S_f$ a individuos cuyos extractos estilares no mostraron actividad RNasa. En este trabajo, la asignación del genotipo $S_f S_f$ a los individuos en los que no se ha obtenido expresión RNasa en sus extractos, es imposible en las familias en las que 'Ferragnès' y 'Ferralise' son los parentales femeninos, y muy arriesgado en las que 'Tuono' es el parental femenino, ya que se asumiría que estos individuos serían fruto de su autopolinización casual, con lo que también podrían aparecer genotipos $S_f S_f$, caso no producido.

La tarea de caracterización del genotipo S mediante esta técnica en material vegetal cuya procedencia genealógica sea totalmente desconocida puede resultar muy complicada. BOŠKOVIĆ *ET AL.* (2003) indicaron como las S-RNasas correspondientes a 23 alelos diferentes de autoincompatibilidad en el almendro tienen unos puntos isoeléctricos (pI) de 8,30 a 9,30, y ORTEGA

(2002) indicó la localización de 33 RNAsas distintas con puntos isoeléctricos de 8,05 a 9,80, de manera que bastantes alelos S codifican RNAsas de igual o parecido punto isoeléctrico, siendo difícilmente distinguibles mediante su electroforesis en una dimensión, por lo que requieren una comprobación de la predicción del genotipo de autoincompatibilidad mediante la realización de cruzamientos testigo.

Indiscutiblemente esta técnica ha resultado de una gran utilidad en el avance del conocimiento de los genotipos S en el germoplasma de almendro y cerezo, pero no cabe duda que conforme avanza el número de alelos S identificados va a resultar más difícil su aplicación en la identificación de nuevos genotipos debido al estrecho rango de pH en que muchas S-RNAsas muestran su punto isoeléctrico.

Una gran ventaja de la identificación de las S-RNAsas estilares frente a la observación microscópica de los tubos polínicos es la posibilidad de determinar el genotipo S de la planta en su primera floración. De esta manera, en las progenies segregantes para la autocompatibilidad, se podrían eliminar precozmente los individuos autoincompatibles, aquellos que mostrasen dos bandas con actividad S-RNasa, ahorrándonos las evaluaciones agronómicas que se realizarían con este material, que sería descartado posteriormente, cuando las determinaciones del crecimiento de los tubos polínicos indicasen su autoincompatibilidad. Además, el aclareo que se produciría en la parcela de mejora permitiría un mejor desarrollo de los árboles restantes facilitando su posterior caracterización y evaluación agronómica.

En el apartado siguiente se va a determinar el genotipo S mediante marcadores moleculares basados en la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), con el fin de confirmar los genotipos predichos mediante la expresión de las S-RNAsas estilares y la presencia del alelo S_i en los individuos que sólo han mostrado una banda con actividad S-RNasa. Será en el siguiente apartado donde se realizará el análisis de las proporciones genotípicas obtenidas en las familias estudiadas.

4.5 CONCLUSIONES

La técnica de identificación de alelos S mediante la separación de las S-RNAsas estilares (NEpHGE) es apropiada para identificar los individuos autoincompatibles en poblaciones segregantes de los programas de mejora. De esta manera se podrían eliminar precozmente los individuos autoincompatibles, dejando para un estudio más detallado los individuos considerados como autocompatibles, mediante la evaluación microscópica del crecimiento de los tubos polínicos,

lo que suministra una información más agronómica de la autocompatibilidad y de la capacidad de autofecundación de los individuos seleccionados.

La determinación de las S-RNasas mediante la técnica NEpHGE permite identificar individuos introducidos en progenies de mejora por error, así como descartar individuos calificados como autocompatibles mediante el crecimiento de los tubos polínicos.

5. IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO S MEDIANTE MARCADORES DE PCR

5. IDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO S MEDIANTE MARCADORES DE PCR

5.1 INTRODUCCIÓN

A mediados de los años 70 se produjeron varios descubrimientos esenciales para el desarrollo de la biología molecular, como las enzimas de restricción, el desarrollo de vectores de clonación y la introducción de la técnica "Southern blot". Un segundo salto tecnológico ocurrió a partir de 1985, con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (SAIKI *ET AL.*, 1985; MULLIS Y FALCONA, 1987), más conocida por sus siglas en inglés, PCR ("Polymerase Chain Reaction"), inventada y desarrollada por el químico Kary B. Mullis, ganador del Premio Nóbel de Química de 1993 por sus trabajos.

Las bases teóricas de la reacción de PCR son simples. En la reacción intervienen tres segmentos de DNA: el segmento de doble cadena que se quiere amplificar que se encuentra en el DNA genómico, y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos o cebadores, que tienen la misma secuencia que los extremos que flanquean el DNA molde. Además, participan en la reacción la enzima *Thermus aquaticus* polimerasa (*Taq*), desoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs), sales y un tampón.

Los cebadores se añaden a la reacción en exceso con respecto al DNA que desea amplificar, por lo que hibridarán con las regiones complementarias del DNA, quedando orientados con sus extremos 3' enfrentados, de modo que la síntesis mediante la DNA polimerasa (que cataliza el crecimiento de nuevas cadenas 5' → 3') se extiende a lo largo del segmento de DNA que queda entre ellas.

El primer ciclo de síntesis producirá nuevas cadenas, de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridarse con los cebadores. Durante el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas servirán a su vez como moldes, generándose en este caso fragmentos cuyo tamaño será el del fragmento que engloba los extremos de ambos cebadores. Estas nuevas cadenas hijas servirán de molde a su vez para sucesivos ciclos de síntesis. La cantidad de estos productos se duplica con cada ciclo, por lo que se van acumulando de forma exponencial. Al cabo de 30 ciclos, habrán aparecido 270 millones de estas moléculas, por cada una de DNA original que hubiese.

El primer paso necesario en este proceso de síntesis es la desnaturalización del DNA. Puesto que el molde es una molécula de DNA de doble cadena, será necesaria su separación para que los cebadores puedan acceder a sus secuencias complementarias y unirse a ellas en el siguiente paso, llamado de templado ("annealing"). Una vez que los cebadores se han unido a las cadenas, alimentan la acción de la DNA polimerasa, la cual comienza a crear a partir de ellos

nuevas cadenas de DNA complementarias, en el proceso de elongación (Fig. 5.1). Estos tres pasos consecutivos (desnaturalización, alineamiento y elongación) constituyen un ciclo de síntesis.

La PCR es una técnica que permite, a partir de una pequeña cantidad de DNA, la obtención de millones de copias de uno o varios fragmentos de DNA presentes en las diferentes muestras biológicas, permitiendo que el número de aplicaciones de esta técnica en la mejora de los árboles frutales sean infinitas (ARÚS *ET AL.*, 1993; HORMAZA, 1996).

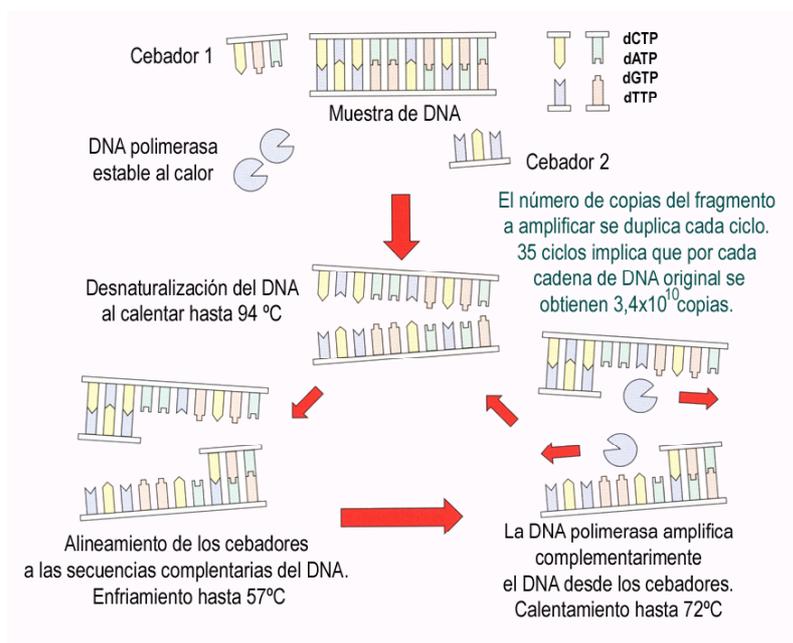


Fig. 5.1 Diagrama esquemático de la reacción PCR.

En base en las estructuras conservadas en las S-RNAsas de distintas especies, se diseñaron cebadores de PCR degenerados para poder clonar los genes S. Una vez secuenciados estos genes S, se diseñaron cebadores más específicos a partir de las regiones conservadas en las S-RNAsas en cada especie para poder aplicarse en la identificación de los genotipos S. Debido a que los fragmentos de DNA procedentes de la amplificación de los alelos S presentaban tamaños parecidos en muchos casos, los productos de la PCR se sometieron a la digestión por enzimas de restricción con el fin de obtener polimorfismo entre los distintos genes S. Esta técnica se utilizó para la identificación de los genotipos S en manzano (JANSSENS *ET AL.*, 1995; MATSUMOTO *ET AL.*, 1999; MATSUMOTO Y KITAHARA, 2000), en peral japonés (ISHIMIZU *ET AL.*, 1999), en cerezo (TAO *ET AL.*, 1999) y en *Brassica oleracea* (BRACE *ET AL.*, 1993; 1994), pero esta estrategia no funcionó adecuadamente

en el almendro (BALLESTER, 1998).

En el almendro, la clonación y el secuenciado de los alelos de incompatibilidad más comunes en las variedades californianas representó un gran progreso para la aplicación de la PCR en la identificación de los genotipos S. Así, se clonaron los alelos S^b/S_1 , S^c/S_7 y S^d/S_8 (USHIJIMA ET AL., 1998) y el alelo S^a/S_5 (TAMURA ET AL., 2000). Con el alineamiento de sus secuencias, se observó que las secuencias codificadoras para las regiones C1 y C5 estaban altamente conservadas, lo que permitió el diseño de cebadores PCR para su aplicación en la identificación de los genotipos S de las variedades californianas, observándose que los productos de la amplificación se podían diferenciar fácilmente por su tamaño. Al comparar las secuencias de los cDNA y del DNA genómico, se realizó una aproximación a la estructura de estos genes, descubriendo que los alelos S^a/S_5 y S^b/S_1 presentaban un intrón de diferente tamaño, mientras que en los genes correspondientes a los alelos S^c/S_7 y S^d/S_8 , no se pudo caracterizar la estructura debido a que el cebador generado a partir de la región C1 no funcionó con estos alelos, por lo que se utilizaron cebadores diseñados a partir de regiones más cercanas a la región C5.

Los cebadores AS111 y AmyC5R, desarrollados por TAMURA ET AL. (2000), se utilizaron más adelante en la determinación de los genotipos S en otras variedades de almendro, observándose que también se amplificaban los alelos S_6 , S_9 , S_{10} y S_{18} , así como varios alelos S de algunas especies silvestres relacionadas con el almendro (MARTÍNEZ-GÓMEZ ET AL., 2002). ORTEGA Y DICENTA (2003) indicaron también la idoneidad de estos cebadores para amplificar los alelos S_{11} y S_{12} procedentes de 'Marcona'.

CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001) diseñaron otros cebadores a partir de las regiones conservadas de los alelos S^b/S_1 , S^c/S_7 y S^d/S_8 (USHIJIMA ET AL., 1998) y S_i . En su aplicación, definieron las características estructurales de los genes de estas S-RNasas, indicando la presencia de un intrón de diferente tamaño en todos ellos.

Paralelamente, MA Y OLIVEIRA (2001) clonaron los alelos S_1 y S_3 procedentes de 'Ferragnès' y diseñaron varios cebadores, para su amplificación mediante la PCR. Observaron que la región codificante de la RNasa en el gen S_1 es la misma que en el gen S^b clonado de las variedades americanas. Sin embargo, su intrón difería ligeramente en su secuencia. Por otra parte la clonación total del gen S_3 permitió descubrir la presencia de dos regiones no codificantes o intrones en este alelo, a diferencia de los clonados anteriormente.

Debido a que en algunos genotipos que poseen los alelos S_1 o S_7 (CHANNUNTAIPAT ET AL., 2001) no se producía la amplificación en la PCR de los otros alelos S presentes con cebadores

obtenidos a partir de regiones conservadas, CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2003) propusieron el uso de cebadores específicos para cada alelo, diseñados a partir de las secuencias presentes en los intrones de los alelos S_1 , S_2 , S_5 , S_7 , S_8 , S_9 , S_{10} , S_{23} y S_f . Según estos autores, la utilización de cebadores procedentes de regiones conservadas resulta inapropiada para el almendro, y propusieron el uso de cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias de los intrones en otras especies, con el objetivo de evitar la utilización de enzimas de restricción tras la PCR.

Como se ha indicado en el capítulo anterior, en el análisis de las S-RNasas estilares en los individuos de las familias estudiadas, no es posible detectar el producto de expresión del alelo de autocompatibilidad (S_f), por no presentar actividad ribonucleasa. El objetivo de este apartado es confirmar los genotipos S deducidos de la expresión de las RNasas estilares mediante marcadores de PCR y la identificación del alelo de autocompatibilidad (S_f). De esta forma se evaluará la incipiente aplicación de la técnica PCR a la identificación de los alelos S, y su viabilidad en un programa de mejora, para realizar una selección precoz en la detección de la presencia del alelo S_f como causante de la autocompatibilidad.

5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1 MATERIAL VEGETAL Y EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

El material vegetal analizado incluye los individuos de las familias estudiadas (Fig. 2.1) y sus parentales. De cada genotipo vegetando en la parcela se obtuvieron tres discos de hoja jóvenes sin nervaduras (aproximadamente 40 mg), cortados al cerrar los tubos de 1,5 ml con la hoja tapando la boca del tubo. Los tubos con los discos de hojas se mantuvieron a una temperatura de -20°C hasta la realización de la extracción del DNA genómico.

Esta extracción se realizó usando el protocolo descrito en el Anejo II, basado en el procedimiento utilizado por GEPTS Y CLEGG (1989). La muestra fue ultra congelada con nitrógeno líquido dentro del tubo de 1,5 ml y pulverizada con la ayuda de un taladro con una broca de plástico. Antes de la descongelación se añadieron 0,4 ml de tampón de extracción (50mM Tris-HCl, 0,7 M NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5% PVPP, 2% β -mercaptoetanol) a temperatura de 65°C . Las muestras se incubaron a 65°C durante 20 minutos, tras los cuales, se añadieron 0,4 ml de 24:1 cloroformo-isoamil alcohol. Tras un mezclado perfecto por sucesivas inversiones de los tubos, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 20 minutos. La fase superior se transfirió a tubos estériles, volviéndose a añadir 0,4 ml de cloroformo-isoamil alcohol y la centrifugación. Una vez separada de nuevo la fase superior, se precipitó el DNA mediante la adición de 0,4 ml de isopropanol a -20°C . El

precipitado se lavó con 0,4 ml de solución con 10 mM NH₄Ac en etanol al 76%, se secó tras dos horas y se resuspendió en 0,2 ml de TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8.0).

5.2.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Mediante este proceso se cuantificó la concentración de DNA obtenido y su calidad. La cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro de rango ultravioleta Gene Quant II de Pharmacia Biotech (Anejo II). Las muestras que a 260 nm mostraron absorbancias menores de 0,1 y mayores de 2,5 se rechazaron, al igual que las que no presentaron un rango entre 1,6 y 2 en la relación de absorbancias 260/280 nm, procediéndose en éstas a repetir su extracción en tubos de 45 ml, que permiten una mayor cantidad y calidad de la extracción, aunque resulta más costosa en tiempo y reactivos (Detallada en el Anejo II).

5.2.3 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA PCR

La identificación de los genotipos S en los individuos que componen las familias estudiadas se llevó a cabo utilizando diversos cebadores, tanto desarrollados a partir de las regiones conservadas de las S-RNAsas del almendro (TAMURA *ET AL.*, 2000; MA Y OLIVEIRA, 2001 y CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001) (Cuadro 5.1), así como cebadores específicos desarrollados a partir de las regiones intrón del gen *S_f* (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2003) y del gen *S₃*, diseñado específicamente para la aplicación en estas familias.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl (Anejo II), conteniendo la mezcla 10 mM de Tris-Cl (pH 8,2), 50 mM de KCl, 100 µM de cada uno de los dNTPs, 1,9 nM de MgCl₂, 0,125 µM de cada cebador, una unidad de Taq DNA polimerasa y 50 ng de la muestra de DNA genómico. Los parámetros de las temperaturas durante la reacción fueron: una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificación constantes de un minuto a 94°C, un minuto a 57°C y dos minutos a 72°C. Después de ello se produce la renaturalización final de los fragmentos de DNA amplificados durante diez minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación se separaron en electroforesis a 150 V durante 2 horas en geles con un 2% de agarosa en tampón con 40 mM de Tris Base, 40 mM de ácido acético, 1mM de Na₂EDTA. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de 1µgr bromuro de etidio/ml. Las bandas obtenidas correspondientes a los fragmentos de DNA amplificados se digitalizaron mediante el transiluminador ultravioleta Gel Doc 2000 de Bio-Rad, para

su posterior análisis. Los resultados se tomaron como válidos cuando tras una nueva reacción PCR de comprobación se obtuvo el mismo patrón de bandas.

Cuadro 5.1 Listado de los cebadores obtenidos de las regiones conservadas de las S-RNasas del almendro.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Combinación de cebadores	Tamaño producto (kbp)	Gen objetivo	Autores
AS1II A1Sc1 A1Sd2 AmyC5R	TATTTCAATTTGTGCAACAATGG CAGACACTTAATCAATTCCAG CCACATGGCGTGGGATACCTCG CAAAATACCACTTCATGTAACAAC	AS1II AmyC5R A1Sc1 AmyC5R A1Sd2 AmyC5R	0,6 1,1 0,2 0,3	S ⁹ /S ₅ S ⁹ /S ₁ S ⁹ /S ₇ S ⁹ /S ₈	TAMURA ET AL., 2000
Cebador 1 Cebador 2 Cebador 3 Cebador 4 Cebador 5 Cebador 6 Cebador 7 Cebador 8	CARTTYGTBCARCARTGGCC TACCACTTCATGTAACAACCTG GACATCCAAGCAATATAGAGAC TCTAAGTATGGSKATKTTGAA AATTTTAYKGAACRAGATG ACCAACTGCAGAGTTCAACG TACCACTTCATGTAACAACCTGAG ACCACCTGCAGATTTAGCGGC	1 y 2 1 y 3 4 y 5 6 y 7 8 y 2	1,1 0,7 1,6 1,2 1,2	S ₁ S ₃ S _i	MA Y OLIVEIRA, 2001
ConF ConR SdF SdF1 SdR1	GTGCAACAATGGCCACCGAC TACCACTTCATGTAACAACCTGAG AGCAGCAAACCTTCCAACC ATTATGAGCACTGGATCTTACGTG AAACAAGATGTCAATATGATTTTCG	ConF ConR SdF1 SdR1 SdF ConR	1,1 2,0 2,7 1,2 2,8	S ⁹ /S ₁ S ⁹ /S ₇ S ⁹ /S ₈ S _i S ⁹ /S ₈ S ⁹ /S ₈	CHANNUNTAIPAT ET AL., 2001

5.3 RESULTADOS

5.3.1 ESTRATEGIA SEGUIDA PARA EL CONOCIMIENTO DE LOS CEBADORES A UTILIZAR

El avance en la creación de los marcadores de PCR para la identificación de los genotipos S en el almendro (TAMURA ET AL., 2000; CHANNUNTAIPAT ET AL., 2001; MA Y OLIVEIRA, 2001; CHANNUNTAIPAT ET AL., 2003) ha sido paralelo a su aplicación en los individuos de las descendencias estudiadas en este trabajo.

Teóricamente, los cebadores propuestos por MA Y OLIVEIRA (2001) amplifican los alelos de autoincompatibilidad S₁ y S₃, así como el alelo de autocompatibilidad S_i, involucrados en estas familias estudiadas, mediante tres combinaciones de cebadores (Cuadro 5.1), lo que disminuye la rentabilidad de su aplicación, ya que se necesitan tres reacciones PCR para cada genotipo a determinar. Sin embargo, en pruebas realizadas con los parentales y diversos descendientes de estas familias, se observó que sólo los cebadores que amplificaban el alelo S₁ funcionaban correctamente en las condiciones del laboratorio de este trabajo.

Debido a ello, se decidió probar los cebadores ConF y ConR de CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2001), mediante los cuales, según los autores, es posible amplificar con una sola reacción los alelos S_1 y S_f , aunque no indican si es posible también la amplificación del alelo S_3 . Por ello se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida tras la clonación del alelo S_3 (Accesión NCBI AF157008 de MA Y OLIVEIRA, 1999) y los cebadores ConF y ConR en formato BLAST (ALTSCHUL *ET AL.*, 1997), con el programa informático Clustal X 1.8.1 (THOMPSON *ET AL.*, 1997), con el fin de determinar, a priori, si estos cebadores eran capaces de amplificar también el alelo S_3 . Según el alineamiento, ConF y ConR no eran capaces de amplificar este alelo (Fig. 5.2), pero, teóricamente, cambiando una sola base del cebador ConF (Cebador ConFS₃) y añadiendo a la reacción de PCR los tres cebadores ConF, ConFS₃ y ConR en las proporciones 1:1:2, sería posible amplificar los tres alelos en cada reacción, de forma similar a la que TAMURA *ET AL.* (2000) propusieron con la combinación de los cebadores A1Sc1, A1Sd2 y AmyC5R para la identificación conjunta de los alelos S^c/S_7 y S^d/S_8 .

En las pruebas previas realizadas con estos cebadores se observó que los productos de amplificación producidos por las combinaciones de los cebadores ConF-ConR y ConFS₃-ConR eran iguales (Fig.5.3), lo que implicaba que la modificación realizada al cebador ConF para la amplificación del alelo S_3 (cebador ConFS₃) no aportaba la especificidad esperada, comportándose de forma similar al cebador original. Además, se observó que ambas combinaciones amplificaban también el alelo S_3 de 'Ferragnès' y 'Ferralise', fenómeno no mencionado anteriormente, a pesar de que CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2001) utilizaron 'Ferragnès' en su trabajo ya que centraron sus estudios solamente en el estudio del alelo S^a/S_1 . Efectivamente, nuevos alineamientos posteriores de los cebadores ConF y ConR con otras secuencias más recientes del gen S_3 de 'Ferragnès' y 'Ai' (accesiones NCBI AF510417 y AF490505 de CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2002), mostraron también un perfecto acoplamiento del cebador ConF con estas secuencias, indicando la presencia de pequeñas diferencias con la primera secuencia del alelo S_3 realizada (accesión NCBI AF157008 de MA Y OLIVEIRA, 1999). Por lo tanto, ConF-ConR también amplifican el alelo S_3 , aunque con un gran inconveniente, ya que el producto amplificado de S_3 se diferencia sólo en 9 pares de bases del producto amplificado de S_f , lo que complica la diferenciación de los mismos. Al no existir polimorfismo en el patrón de bandas de los genotipos S_7S_f y S_7S_3 (Fig. 5.3), no se puede realizar la aplicación única de estos cebadores en la identificación de los genotipos S en los individuos de las familias estudiadas.

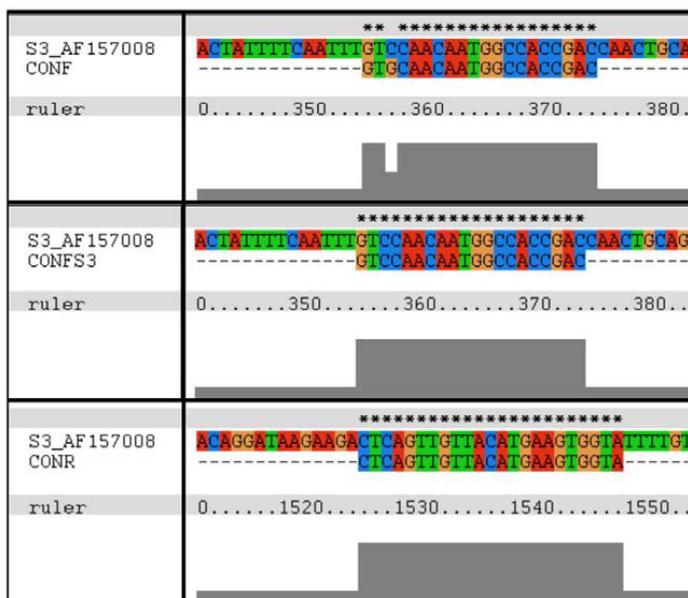


Fig. 5.2 Fracción del alineamiento de la secuencia S₃ (AF157008) con los cebadores ConF, ConFS₃ y ConR.

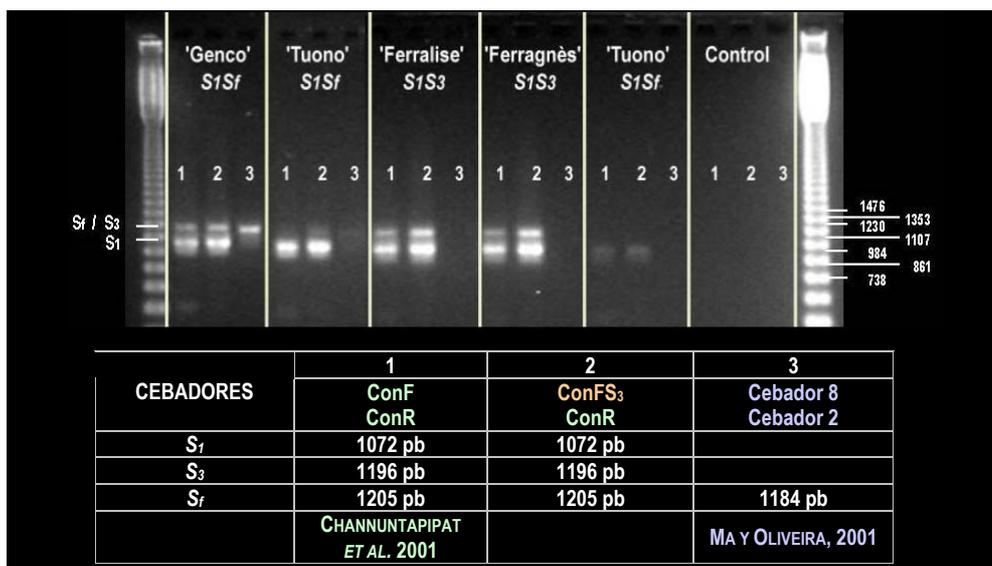


Fig. 5.3 Pruebas con cebadores ConF/ConR, ConFS₃/ConR y 8/2 para la amplificación de los alelos presentes en los individuos de las poblaciones.

En la Fig. 5.3 también se puede observar que, aunque los cebadores ConF y ConR producen una buena amplificación del alelo S₇ en 'Tuono', provocan el silenciamiento del alelo S₇ o una débil amplificación del mismo. CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001) indicaron el enmascaramiento del segundo alelo en la amplificación PCR en los genotipos con alelos S₇ o S₇. Sin embargo, en la variedad 'Genco', de igual genotipo S que 'Tuono', los dos alelos se amplificaron adecuadamente

para su identificación. Tampoco en 'Ferragnès' y 'Ferralise', poseedoras del alelo S_1 , se produce el silenciamiento del alelo S_3 .

El producto de amplificación del alelo S_f en 'Genco' mediante los cebadores ConF y ConR es de tamaño parecido al producido por los cebadores 8 y 2 (MA y OLIVEIRA, 2001), sin embargo, estos últimos cebadores no mostraron una buena amplificación en 'Tuono' ni en diversos descendientes autocompatibles ensayados, lo que desaconsejó su uso para la identificación de los genotipos S las poblaciones del presente trabajo.

Debido a los inconvenientes comentados, se decidió la búsqueda de cebadores específicos para la identificación del alelo S_3 a partir de la secuencia AF157008 (accesión NCBI obtenida de la S_3 -RNasa por MA Y OLIVEIRA, 1999), mostrándose en el Cuadro 5.2 los cebadores diseñados, así como las combinaciones probadas y los tamaños de los fragmentos teóricos a obtener para la correspondiente identificación del alelo S_3 .

Cuadro 5.2 Combinaciones de los cebadores para la identificación específica de los alelos S_3 y S_f

Autores	Cebador	Secuencia 5' → 3'	Combinación de cebadores	Tamaño producto (pb)	Gen objetivo
ESTE TRABAJO	S3F	CTTCTGCGCTTACGAGAGGTT AAAACGTAAGGGATAGTTTCT TGTGATTTCCACATGTCT	S3F / S3R1	611	S_3
	S3R1		S3F / S3R2	790	
	S3R2				
CHANNUNTAIPAT <i>ET AL.</i> , 2001	ConF	GTGCAACAATGGCCACCGAC TACCACTTCATGTAACAAGTACGAG	ConF / S3R1	832	S_3
	ConR		ConF / S3R2	1036	
			S3F / ConR	950	
CHANNUNTAIPAT <i>ET AL.</i> , 2003	SfF	GTGCCCTATCTAATTTGTGAC	SfF / SfR	449	S_f
	SfR	GACATTTTTTTAGAAAGAGTG			

En la Fig. 5.4 se muestra una de las pruebas realizadas a los cebadores diseñados y las combinaciones posibles realizadas con éstos y con ConF y ConR. Se observó que algunas combinaciones de cebadores, como S_3F/S_3R2 y $S_3F/ConR$, amplificaban correctamente el alelo S_3 , siendo el tamaño de los fragmentos adecuado para una rápida identificación. Los cebadores diseñados para la identificación específica del alelo S_3 (Cuadro 5.2), probablemente completan el trabajo de CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2003), que omite el estudio de este alelo fundamental en muchos programas de mejora europeos, en los que se han empleado a menudo como parentales algunos descendientes de la variedad 'Ai', como 'Ferragnès' y 'Ferralise', así como descendientes de éstas.

De igual manera, el funcionamiento de los cebadores 4 y 5 de MA Y OLIVEIRA (2001) no fue adecuado para la identificación del alelo S_3 , tal como había ocurrido con los cebadores 8 y 2 para la amplificación del alelo S_f . Por otro lado, no hubo ningún problema con los cebadores 1 y 3 para la amplificación del alelo S_f (Cuadro 5.1).

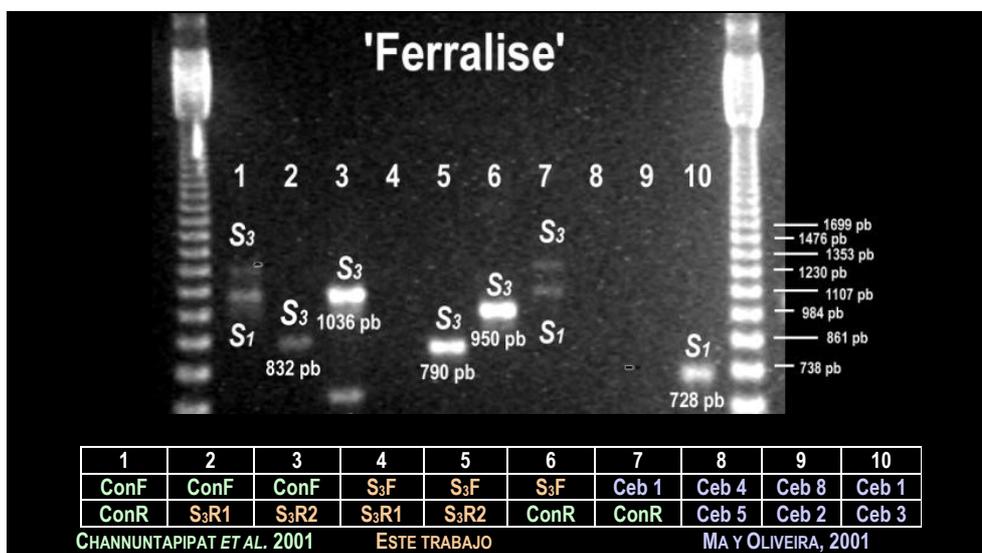


Fig.5.4 Prueba del funcionamiento de los cebadores con la variedad 'Ferralisse'.

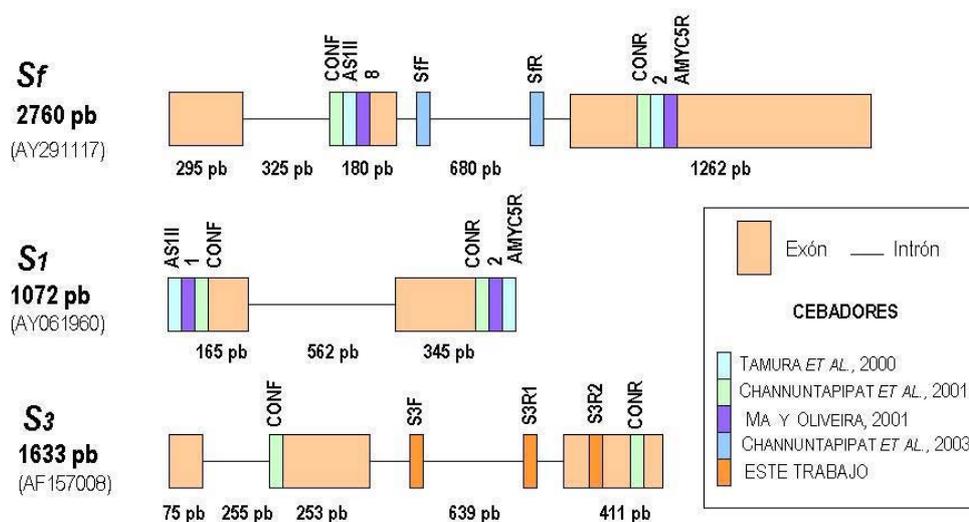


Fig.5.5 Esquema de las estructuras de los alelos S_f, S₁ y S₃.

Posteriormente, CHANNUNTAIPAT ET AL. (2003) publicaron la secuencia de los cebadores específicos S_fF y S_fR para el alelo S_f. Tras comprobar su buen funcionamiento, se utilizaron para identificar el alelo S_f en los individuos de las familias estudiadas, así como para ensayar estos cebadores para su utilización como marcador precoz de la autocompatibilidad en descendencias autocompatibles.

Por consiguiente, la estrategia seguida para identificar los genotipos S en los individuos de estas familias se inició con el conocimiento previo de la estructura de los alelos de autoincompatibilidad involucrados en estas poblaciones así como del alelo de autocompatibilidad, siguió con el conocimiento de los fragmentos teóricos amplificados en la reacción PCR con los cebadores existentes (Fig. 5.5) y finalizó con su ensayo en el material vegetal y las condiciones de trabajo propias. Si no se obtuvieran resultados satisfactorios, se diseñarían nuevos cebadores a partir de las secuencias publicadas (Cuadro 5.3) o se clonarían los alelos y se secuenciarían si no lo estaban.

Cuadro 5.3 Acciones de las secuencias en base de datos GenBank de NCBI de los alelos S del almendro.

Alelo	Material vegetal de procedencia	Accesión NCBI	Fuente en NCBI:	
S₁	'Mission'	AB011469	USHIJIMA Y SASSA (1998)	
		AF148466	TAMURA ET AL. (1999)	
	'Ferragnès'	AF149039	MA Y OLIVEIRA (1999)	
		AY061960	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001)	
'Ne Plus Ultra'	AF510421			
S₂	'Cristomorto'	AF510416	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001 y 2002)	
	'Anxaneta'	AF454000		
S₃	'Ferragnès'	AF510417	MA Y OLIVEIRA (1999)	
		AF177923		
		AF157008		
	'Ai'	AF490505	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2002)	
'Ferraduel'	AF510418			
S₅	'Mission'	AB026836	USHIJIMA Y SASSA (1999)	
		AF148465	TAMURA ET AL. (1999)	
S₆	'Ramillete'	AF510419	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2002)	
	'Bertina'	AF487914		
S₇	'Ne Plus Ultra'	AF510420	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001)	
		AB011470	USHIJIMA Y SASSA (1998)	
	'Nonpareil'	AF148467	TAMURA ET AL. (1999)	
		AY291118	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001)	
S₈		AB011471	USHIJIMA Y SASSA (1998)	
		AF148468	TAMURA ET AL. (1999)	
		AF444788	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001)	
S₉	'¿Ferraduel?'	AF250864	MA Y OLIVEIRA (1999)	
	'Primorsky'	AF454001	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001 y 2002)	
S₁₀	'Gabaix'	AF454003		
S₁₁	'Rumbeta'	AF510415		
	'Bertina'	AF487915		
S₁₃	'Verdeal'	AF267513	MA Y OLIVEIRA (1999 y 2000)	
S₂₁	'Boa Casta'	AF177924		
		AF157010		
S₂₃	'Ramillete'	AF454002	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2002)	
		'Tuono'	AF157009	MA Y OLIVEIRA (1999)
		'Lauranne'	AF510414	CHANNUNTAIPAT ET AL. (2001 y 2002)
'IRTA 12-2'	AY291117			
S_i	'Pestaneta'	AF267512	MA Y OLIVEIRA (2000)	
S_k		AF267511		
S_n		'Maurisca'		AF267510

5.3.2 OBTENCIÓN DE LOS GENOTIPOS S MEDIANTE LA APLICACIÓN DE LA PCR EN LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Como se ha indicado anteriormente, para obtener los genotipos S en los individuos de las familias estudiadas se han realizado tres reacciones para cada individuo, una para identificar los alelos S_1 y S_3 (ConF/ConR), y dos reacciones alelo-específicas para confirmar la presencia del alelo S_3 (S_3F /ConR) y la presencia del alelo de autocompatibilidad S_f (S_fF / S_fR).

Se observó que en las reacciones PCR realizadas con el cebador ConF/ConR en las plantas con genotipo S_1S_3 , los dos productos PCR correspondientes a cada alelo S_1 y S_3 se amplificaron adecuadamente. Sin embargo, en la mayoría de los genotipos S_1S_f , al igual que ocurría en 'Tuono', la amplificación del producto PCR correspondiente al alelo S_1 provocaba el silenciamiento de la amplificación PCR del alelo S_f . Los individuos que presentan cierta amplificación del fragmento correspondiente al alelo S_f se podrían confundir con los de genotipo S_1S_3 , ya que ambos genotipos en teoría no presentan polimorfismo con la utilización de esta pareja de cebadores. Debido a ello, se realizaron las PCR S_3 y S_f alelo-específicas, con el fin de confirmar los dos genotipos posibles. En los individuos con genotipo S_3S_f , el producto de amplificación PCR correspondiente al alelo S_3 enmascara al producto de amplificación PCR del alelo S_f , observándose en algunos casos dos bandas pegadas, debido a su parecido tamaño molecular (Fig.5.6 y 5.7).

En las reacciones S_3 alelo-específicas, realizadas con los cebadores S_3F /ConR, se observó una adecuada amplificación del producto PCR del alelo S_3 , con un tamaño de 950 pb, tal como se puede observar en la Fig. 5.8, de manera que se puede confirmar la posesión de este alelo en los individuos con la presencia o ausencia de esta banda.

De igual forma, en las reacciones S_f alelo-específicas realizadas con los cebadores S_fF / S_fR de CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2003), se observó una correcta amplificación del producto PCR del alelo de autocompatibilidad S_f , con un tamaño de 450 pb. (Fig. 5.9). Tras comprobar esta eficacia, se deduce que la presencia o ausencia de esta banda puede ser utilizada como criterio de una primera selección precoz a favor de la autocompatibilidad del material vegetal en estado de plántula, antes de ser plantado en parcela, permitiendo un ahorro de recursos, tanto financieros como humanos, necesarios para la evaluación del nuevo material vegetal.

En los Cuadros 5.4, 5.5, 5.6 y 5.7 se muestran los resultados obtenidos en la identificación de los genotipos S tras la aplicación de los cebadores ConF/ConR, S_3F /ConR y S_fF / S_fR en los individuos que componen las distintas familias estudiadas, mostrándose resumidos en el Cuadro 5.8.



Fig.5.6 Identificación de los alelos S mediante los cebadores ConF-ConR en individuos 'Ferralise' x 'Tuono'.

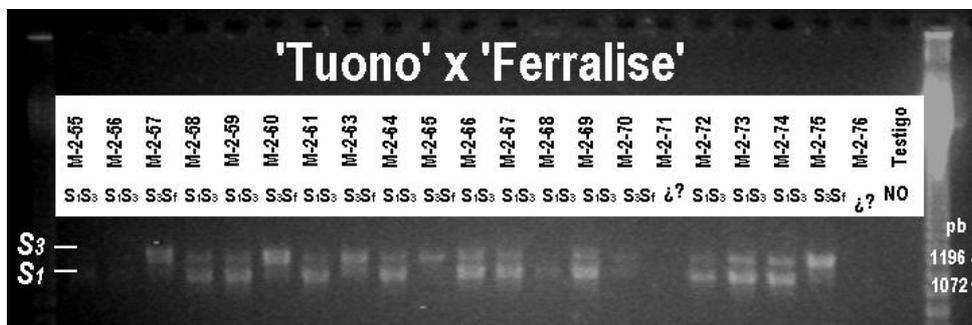


Fig. 5.7 Identificación de los alelos S mediante los cebadores ConF-ConR en individuos 'Tuono' x 'Ferralise'.

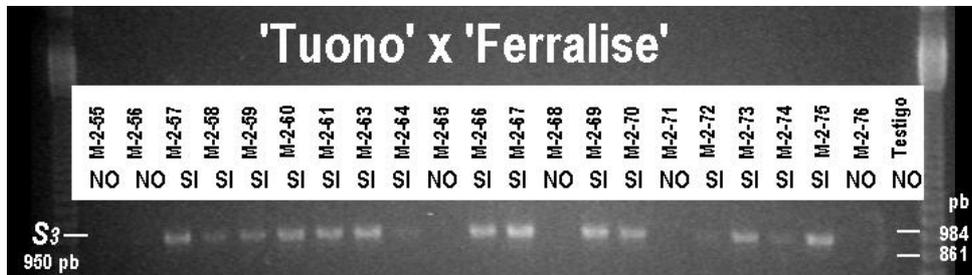


Fig.5.8 Identificación de la presencia del alelo S₃ mediante los cebadores S3F-ConR.

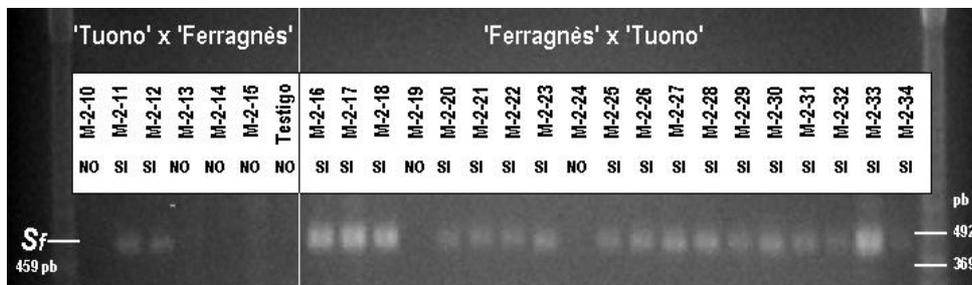


Fig.5.9 Identificación de la presencia del alelo S₁ mediante los cebadores S1F-S1R.

Cuadro 5.4 Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Tuono' (S₁S₁) x 'Ferragnès' (S₁S₃).

Individuo	M-1-78	M-1-79	M-1-80	M-1-81	M-1-82	M-1-83	M-1-84	M-1-85	M-1-86	M-1-87
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S _f S ₃									
Individuo	M-1-88	M-1-89	M-1-90	M-1-91	M-1-92	M-1-93	M-1-94	M-1-95	M-1-96	M-1-97
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S _f S ₃									
Individuo	M-1-98	M-1-99	M-2-1	M-2-2	M-2-3	M-2-4	M-2-5	M-2-6	M-2-7	M-2-8
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S _f S ₃									
Individuo	M-2-9	M-2-10	M-2-11	M-2-12	M-2-13	M-2-14	M-2-15			
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f		S _f S ₃	S _f S ₃						

Cuadro 5.5 Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Ferragnès' (S₁S₃) x 'Tuono' (S₁S₁).

Individuo	M-2-16	M-2-17	M-2-18	M-2-19	M-2-20	M-2-21	M-2-22	M-2-23	M-2-24	M-2-25
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f
Individuo	M-2-26	M-2-27	M-2-28	M-2-29	M-2-30	M-2-31	M-2-32	M-2-33	M-2-34	M-2-35
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f
Individuo	M-2-36	M-2-37	M-2-38	M-2-39	M-2-40	M-2-41	M-2-42	M-2-43	M-2-44	M-2-45
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f						
Individuo	M-2-46	M-2-47	M-2-48	M-2-49	M-2-50	M-2-51	M-2-52	M-2-53	M-2-54	
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f					

Cuadro 5.6 Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Tuono' (S₁S_f) x 'Ferralise' (S₁S₃).

Individuo	M-2-55	M-2-56	M-2-57	M-2-58	M-2-59	M-2-60	M-2-61	M-2-62	M-2-63	M-2-64
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S ₃	S ₁ S ₃	S ₃ S _f	S ₁ S ₃	S ₁ S ₃	S ₃ S _f	S ₁ S ₃		S ₃ S _f	S ₁ S ₃
Individuo	M-2-65	M-2-66	M-2-67	M-2-68	M-2-69	M-2-70	M-2-71	M-2-72	M-2-73	M-2-74
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f	S ₁ S ₃	S ₃ S _f		S ₁ S ₃	S ₁ S ₃	S ₁ S ₃			
Individuo	M-2-75	M-2-76								
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f									

Cuadro 5.7 Resultados obtenidos de las PCR realizadas en la progenie de 'Ferralise' (S₁S₃) x 'Tuono' (S₁S_f).

Individuo	L-2-72	L-2-73	L-2-74	L-2-75	L-2-76	L-2-77	L-2-78	L-2-79	L-2-80	L-2-81
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S		S ₃ S _f		S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f
Individuo	L-2-82	L-2-83	L-2-84	L-2-85	L-2-86	L-2-87	L-2-88	L-2-89	L-2-90	L-2-91
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f		S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f
Individuo	L-2-92	L-2-93	L-2-94	L-2-95	L-2-96	L-2-97	L-2-98	L-2-99	L-3-1	L-3-2
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f			
Individuo	L-3-3	L-3-4	L-3-5	L-3-6	L-3-7	L-3-8	L-3-9	L-3-10	L-3-11	L-3-12
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f
Individuo	L-3-13	L-3-14	L-3-15	L-3-16	L-3-17	L-3-18	L-3-19	L-3-20	L-3-21	L-3-22
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S ₁									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f		S ₁ S _f

Cuadro 5.7 (Continuación)

Individuo	L-3-23	L-3-24	L-3-25	L-3-26	L-3-27	L-3-28	L-3-29	L-3-30	L-3-31	L-3-32
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S _f									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f
Individuo	L-3-33	L-3-34	L-3-35	L-3-36	L-3-37	L-3-38	L-3-39	L-3-40	L-3-41	L-3-42
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S _f									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f				
Individuo	L-3-43	L-3-44	L-3-45	L-3-46	L-3-47	L-3-48	L-3-49	L-3-50	L-3-51	L-3-52
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S _f									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f				
Individuo	L-3-53	L-3-54	L-3-55	L-3-56	L-3-57	L-3-58	L-3-59	L-3-60	L-3-61	L-3-62
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S _f									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f	S ₃ S _f	S ₁ S _f	S ₃ S _f			
Individuo	L-3-63									
ConF/ConR	S ₃									
	S _f									
	S _f									
S3F/ConR	S ₃									
SfF/SfR	S _f									
Genotipo S	S ₃ S _f									

La determinación de los genotipos S mediante la amplificación parcial de los genes S en la PCR, ha sido similar a la que obtenida mediante el análisis de las S-RNasas (Apartado 4). Mediante esta técnica se ha podido confirmar la presencia del alelo S_f en los individuos en los que se había supuesto su presencia, por mostrar sólo una banda con actividad S-RNasa tras la electroforesis NEpHGE. La aplicación de la PCR ha permitido también determinar el genotipo S en 11 individuos en los que no fue posible mediante la técnica NEpHGE, por no presentar una buena actividad RNasa sus extractos estilares.

5.3.3 PROPORCIONES GENOTÍPICAS EN LAS DIFERENTES FAMILIAS

En la Fig. 5.10 se puede observar la distribución de los genotipos S obtenidos mediante la detección de las S-RNasas estilares y la utilización de los marcadores de PCR.

Se observó una distribución dispar de los genotipos S en las familias segregantes para la autocompatibilidad cuyo parental femenino fue 'Tuono'. Mientras que en la familia 'Tuono' x

'Ferragnès' la proporción de individuos con genotipo autoincompatible fue cercana a la mitad, con un 42% de fenotipos S_1S_3 , en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' la proporción de individuos autoincompatibles con genotipo S_1S_3 fue del 71% (Fig. 5.10). Estas son las únicas familias 'Tuono' x 'Ferragnès' y 'Tuono' x 'Ferralise' en las que se ha determinado el genotipo S de sus individuos, ya que en las otras familias con estos parentales el sentido del cruzamiento era el opuesto. Los ajustes χ^2 (YATES, 1934) a la proporción esperada $1 S_1S_3 : 1 S_1S_3$ (Cuadro 5.8) fueron significativos, en ambas familias, aunque la probabilidad en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' es cinco veces mayor que en la familia 'Tuono' x 'Ferralise'. A pesar de ello, en el análisis conjunto de las dos familias en las que 'Tuono' fue el parental femenino, se observó una probabilidad de casi el 80%.

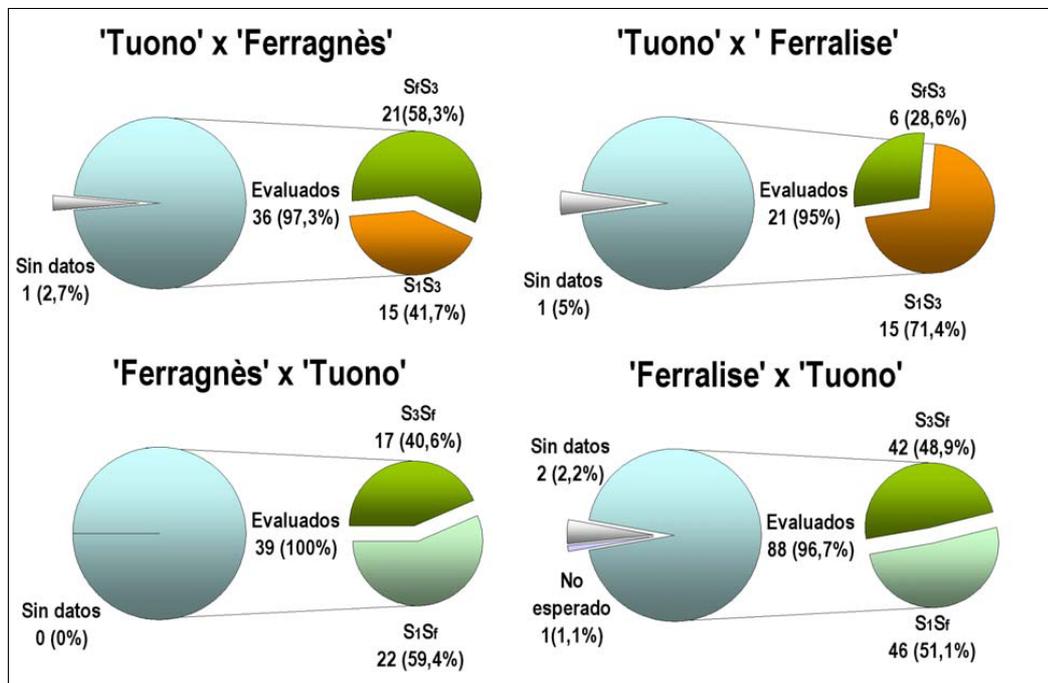


Fig. 5.10 Distribución de los genotipos S en las familias.

En las dos familias en las que 'Tuono' se utilizó como parental masculino y que teóricamente no son segregantes para la autocompatibilidad, se observó un ligero predominio de los genotipos S_1S_r sobre genotipos S_3S_r , aunque no significativo (Fig. 5.9). En la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' se obtiene una probabilidad para la proporción $1 S_1S_r : 1 S_3S_r$ de 52% y en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' del 75% (Cuadro 5.8). Al realizar el cómputo de estos resultados con los obtenidos en otras familias de 'Tuono' x 'Ferragnès' (BALLESTER ET AL., 1998) y de 'Tuono' x 'Ferralise' (DUVAL ET AL., 2001) mediante la identificación de las S-RNAsas, se observó que los genotipos se distribuyen en torno al 50%, los cómputos por familias y el cómputo general de las

familias con 'Tuono' como parental masculino, son significativos. La proporción 1 S_1S_f : 1 S_3S_f mostró una probabilidad del 84% para las familias 'Tuono' x 'Ferragnès', mientras que sólo fue del 31% para la familia 'Tuono' x 'Ferralise'. La probabilidad de la proporción 1:1, tras el análisis conjunto de las poblaciones en las que 'Tuono' fue utilizada como parental masculino fue del 59%.

Cuadro 5.8 Resumen de la determinación del genotipo S en las distintas familias.

Familias	S_1S_3	S_1S_f	Total	χ^2	α
'Tuono' x 'Ferragnès'	21 (58,3%)	15 (41,7%)	36	0,69	0,40
'Tuono' x 'Ferralise'	6 (28,6%)	15 (71,4%)	21	3,04	0,08
Suma 'Tuono' x S_1S_3	27 (47,4%)	30 (52,6%)	57	0,07	0,79
Familias	S_1S_f	S_3S_f	Total	χ^2	α
'Ferragnès' x 'Tuono'	22 (56,4%)	17 (43,6%)	39	0,41	0,52
'Ferragnès' x 'Tuono' BALLESTER ET AL., 1998	28 (48,2%)	30 (51,7%)	58	0,01	0,89
Suma 'Ferragnès' x 'Tuono'	50 (51,5%)	47 (48,5%)	97	0,04	0,84
'Ferralise' x 'Tuono'	46 (52,3%)	42 (47,7%)	88	0,10	0,75
'Ferralise' x 'Tuono' DUVAL ET AL., 2001	19 (63,3%)	11 (36,7%)	30	1,63	0,20
Suma 'Ferralise' x 'Tuono'	65 (55,1%)	53 (44,9%)	118	1,02	0,31
S_1S_3 x 'Tuono' (Nuestras familias)	68 (53,5%)	59 (46,5%)	127	0,50	0,48
Suma S_1S_3 x 'Tuono'	115 (52,0%)	106 (48,0%)	221	0,28	0,59

5.3.4 PRESENCIA DE INDIVIDUOS AUTOINCOMPATIBLES EN LOS QUE SE HA DETECTADO EL ALELO S_f

En el Anejo III se muestra el resumen de los resultados de la determinación del genotipo S en los individuos de las distintas familias mediante las dos técnicas utilizadas, la expresión de las S-RNAs estilares y la amplificación parcial de fragmentos de DNA que codifican para las S-RNAs estilares mediante la técnica PCR, así como el fenotipo determinado tras el análisis del crecimiento de los tubos polínicos propios en los distintos individuos.

Como se ha indicado anteriormente, se observó una total concordancia entre los genotipos S deducidos de la expresión de las S-RNAs y los genotipos S obtenidos mediante el uso de cebadores diseñados para la amplificación parcial del gen codificante para las S-RNAs en la PCR. Sin embargo, algunos individuos que poseen el alelo S_f y, por lo tanto, de supuesta autocompatibilidad, mostraron la incapacidad de sus tubos polínicos de llegar a la base del estilo y penetrar en el ovario. Estos individuos autoincompatibles fisiológicos y autocompatibles genéticos son todos descendientes de 'Ferralise', mientras que en los descendientes de 'Ferragnès' el fenotipo

observado concuerda con su genotipo, de manera que los individuos que poseen el alelo S_f muestran un fenotipo autocompatible.

Los individuos que mostraron un comportamiento no acorde a su genotipo S fueron:

- En la familia 'Tuono' x 'Ferralise', a pesar de tener el genotipo S_fS_3 , 'M-2-57', 'M-2-60' y 'M-2-70' mostraron un fenotipo autoincompatible.
- En la familia 'Ferralise' x Tuono', los individuos 'L-2-77', 'L-3-26' y 'L-3-47' con genotipo S_fS_f y los individuos 'L-2-79', 'L-3-18', 'L-3-32', 'L-3-40', 'L-3-56' con genotipo S_fS_3 , mostraron una clara autoincompatibilidad.
- Además, en la familia 'Ferralise' x Tuono', los individuos 'L-2-75', 'L-2-80', 'L-3-14', 'L-3-15' y 'L-3-45', con genotipo S_fS_f , y los individuos 'L-2-88', 'L-2-89', 'L-2-97', 'L-3-12' y 'L-3-59' con genotipo S_fS_3 , mostraron un fenotipo dudoso, en los cuales, entre el 25 y el 50% de sus pistilos mostraron la llegada de al menos un tubo polínico a su base.

5.4. DISCUSIÓN

5.4.1 VARIACIÓN DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEPENDIENDO DEL PARENTAL MASCULINO AUTOINCOMPATIBLE

Las familias estudiadas proceden de cruzamientos semicompatibles, lo que implica que las proporciones genotípicas dependerán de la distribución de los genotipos haploides de los óvulos en el parental femenino y de la supervivencia de los individuos generados en los cruzamientos hasta su evaluación. En las familias en las que 'Tuono' fue el parental femenino, sus óvulos con genotipo S_f o S_f , sólo pudieron ser fecundados con tubos polínicos de genotipo S_3 de 'Ferragnès' y de 'Ferralise'. Los genotipos S en los individuos de estas familias se han determinado por la identificación de la expresión de la S_f -RNasa y S_3 -RNasa en el estilo, y la amplificación de fragmentos de DNA que codifican para estas RNasas y del producto del alelo S_f en el estilo por la PCR.

La distribución de los genotipos S en las progenies de 'Tuono' como parental femenino parece estar influida por el parental masculino. Así, en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' ha predominado ligeramente el genotipo S_fS_3 sobre el genotipo S_fS_3 , siendo fácilmente asumible la proporción esperada 1:1. Sin embargo, en la familia 'Tuono' x 'Ferralise', la porción de individuos S_fS_3 , es mayor del 70%. No existen referencias bibliográficas de la identificación genotípica del

locus S en otras familias 'Tuono' x 'Ferragnès' y 'Tuono' x 'Ferralise', pero sí determinaciones fenotípicas en otras familias de 'Tuono' x 'Ferragnès', en las que también se observó un predominio de los fenotipos autocompatibles, que necesariamente deberían ser S_fS_3 , sobre los autoincompatibles, que deberían ser S_1S_3 (Tabla 3.11), lo que avalaría la mayor proporción de genotipos S_fS_3 sobre los genotipos S_1S_3 en el conjunto de las familias 'Tuono' x 'Ferragnès'. Es posible que la consanguinidad presente en 'Ferralise' favorezca la supervivencia de embriones y plantas con genotipo S_1S_3 , y por tanto hacia la autoincompatibilidad, como un mecanismo evolutivo que fuerce mayoritariamente al cruzamiento en su descendencia, y así recuperar la heterosis híbrida perdida por la consanguinidad presente en 'Ferralise'.

En las familias en las que 'Tuono' fue utilizada como parental masculino, los óvulos de 'Ferragnès' y 'Ferralise' con genotipos S_1 o S_3 sólo pudieron fecundarse con los tubos polínicos de genotipo S_f de 'Tuono'. Por lo tanto, en la separación proteica de las RNAsas estilares de los individuos de estas familias, se identificaron la S_1 -RNasa y S_3 -RNasa heredadas de 'Ferragnès' y de 'Ferralise'. En estas dos familias se ha observado una ligera mayor cantidad de individuos con genotipo S_1S_f que de individuos S_3S_f . Para estas familias existen otras referencias sobre la distribución de genotipos en las descendencias, determinados también mediante la identificación de las RNAsas, corroborando el ajuste a las proporciones genotípicas esperadas $1S_1S_f : 1S_3S_f$. Así BALLESTER *ET AL.* (1998), en una población 'Ferragnès' x 'Tuono' obtuvieron 28 genotipos S_1S_f frente a 30 genotipos S_3S_f y DUVAL *ET AL.* (2001) encontraron en una población 'Ferralise' x 'Tuono' 19 genotipos S_1S_f frente a 11 genotipos S_3S_f . Tomando en conjunto estos resultados con los de este trabajo, se obtiene un ajuste aceptable a la proporción $1S_1S_f : 1S_3S_f$ en la descendencia, de acuerdo con la hipótesis propuesta por CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY (1985).

5.4.2 LA PRESENCIA DEL ALELO S_f NO SIEMPRE IMPLICA UN FENOTIPO AUTOCOMPATIBLE

Como se ha indicado anteriormente, en la deducción del genotipo S mediante la identificación de las RNAsas estilares, la presencia de las dos bandas, correspondientes a la S_1 -RNasa y a la S_3 -RNasa, implica un genotipo autoincompatible, mientras que la ausencia de una de las dos indica la posesión del alelo S_f , y por lo tanto un fenotipo autocompatible. La buena correlación entre los individuos que mostraron la expresión de una sola de estas S-RNAsas y los individuos que amplificaron el fragmento de DNA del gen S_f mediante los cebadores SfF/SfR de CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2003), confirma la validez de estas técnicas para determinar la presencia del alelo de la autocompatibilidad.

Sin embargo, en las familias en las que 'Ferralise' fue el parental autoincompatible, se ha observado que la posesión del alelo S_f no siempre se traduce en un comportamiento autocompatible del individuo (Anexo III).

No existen referencias anteriores sobre la presencia de individuos autocompatibles con autoincompatibilidad fisiológica entre los descendientes de 'Ferragnès' y 'Ferralise' en los dos sentidos de su cruzamiento con 'Tuono'. BALLESTER *ET AL.* (1998) observaron concordancia entre los genotipos obtenidos por la expresión de las S-RNAs estilares y el comportamiento autocompatible de todos los individuos estudiados en su población de 'Ferragnès' x 'Tuono', mientras que DUVAL *ET AL.* (2001), en su población de 'Ferralise' x 'Tuono', se limitaron a la obtención de los genotipos S con la misma técnica sin determinar el comportamiento fisiológico de los tubos polínicos tras la autopolinización.

BOŠKOVIĆ *ET AL.* (1998) en un principio pensaron que individuos calificados como autocompatibles en base a las ribonucleasas estilares procedentes de un cruzamiento de 'Lauranne' x 'Marcona' podían ser autoincompatibles al observar que tenían unos cuajados bajos, pero descartaron esta posibilidad, indicando que la prueba del embolsado de ramas en muchos casos no era concluyente, ya que se producen unas grandes variaciones de un año a otro.

En nuestro caso la comprobación agronómica de la autocompatibilidad se ha realizado con el crecimiento de los tubos polínicos tras autopolinización, con varias repeticiones en distintos años, lo que indica una elevada solidez de los resultados obtenidos.

La presencia de individuos autoincompatibles fisiológicos, aunque no genéticos, en los descendientes de 'Ferralise', y no en descendientes de 'Ferragnès', a pesar de compartir el mismo genotipo de autoincompatibilidad, indica que 'Ferralise' transmite a la descendencia caracteres negativos para la biología reproductiva que se manifiestan en la autoincompatibilidad de individuos genéticamente autocompatibles, no relacionados con el genotipo S, sino posiblemente debidos a la consanguinidad presente en esta variedad.

Hay que indicar que también se produce el caso opuesto en el individuo 'M-2-73', perteneciente a la familia 'Tuono' x 'Ferralise', que muestra en los zimogramas la presencia de dos ribonucleasas, por lo que se le atribuyó el genotipo S_1S_3 , y se consideró autoincompatible, aunque se calificó como autocompatible según el crecimiento de sus tubos polínicos (Cuadro 3.3). Este genotipo quizás debió calificarse como fenotipo dudoso ya que durante los tres primeros años de su evaluación llegaron tubos polínicos a la base en menos del 50% de los pistilos, e incluso el segundo año no llegaron en ningún pistilo. Sólo en el cuarto año se produjo una plena llegada de tubos polínicos a la base, por lo que este dato puede resultar sospechoso y proceder de una

contaminación durante la polinización de manera que no se tratase realmente de una autopolinización.

La presencia de individuos autoincompatibles fisiológicos y no genéticos observados en las descendencias de 'Ferralise' es un claro ejemplo de la necesidad de una evaluación agronómica de la autocompatibilidad en los individuos previamente calificados como autocompatibles mediante técnicas moleculares, ya sea por la identificación de las S-RNasas estilares mediante NEpHGE o por la utilización de cebadores específicos en la PCR. La observación del crecimiento de los tubos polínicos, como se ha mostrado en el Apartado 3, es la mejor fuente agronómica para determinar la calidad de la autocompatibilidad genética.

5.4.3 APLICACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS EN LA PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ALELOS DE AUTOINCOMPATIBILIDAD

Para una eficaz aplicación de los cebadores PCR propuestos en la bibliografía en la identificación de los alelos S en poblaciones segregantes, debe seguirse una estrategia que permita obtener los fines buscados con el menor coste económico posible.

Hasta ahora se han obtenido cebadores obtenidos de las regiones conservadas en las S-RNasas clonadas en el almendro (TAMURA *ET AL.*, 2000; MA Y OLIVEIRA, 2001; CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001), así como cebadores alelo-específicos para S_1 , S_2 , S_5 , S_7 , S_8 , S_9 , S_{10} , S_{23} y S_f , obtenidos a partir de la secuencia de sus intrones (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2003). Un problema para su aplicación en los programas de mejora es que los cebadores diseñados han sido ensayados en muy pocas variedades y por lo tanto en pocas combinaciones de genes S.

Los cebadores obtenidos a partir de las regiones conservadas permiten la amplificación de gran cantidad de alelos S pero, como se ha podido comprobar, muestran varios inconvenientes. Uno de ellos es el desconocimiento de la cantidad de alelos S que amplifican así como del tamaño del producto amplificado. Recientemente se ha descubierto que los cebadores As111/AmyC5R (TAMURA *ET AL.*, 2000), además de amplificar los alelos S^a/S_5 , S^b/S_1 , S^c/S_7 y S^d/S_8 para los que fueron diseñados, también amplifican los alelos S_6 , S_9 , S_{10} y S_{18} (MARTÍNEZ-GÓMEZ *ET AL.*, 2002), así como fragmentos de lo que podrían ser alelos de autoincompatibilidad en diversas especies silvestres relacionadas con el almendro. Usando los mismos cebadores, ORTEGA Y DICENTA (2003) han indicado posteriormente su buen funcionamiento en la amplificación de los alelos S_{11} , S_{12} y S_f para determinar los genotipos S en los individuos del cruzamiento entre la selección 'A2 198' ($S_f S_f$) x 'Marcona' ($S_{11} S_{12}$).

Además, la amplificación de un alelo puede verse disminuida o anulada por la amplificación de otro alelo S (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001), siendo necesario el ensayo de los cebadores con el máximo de combinaciones alélicas posibles para determinar los cebadores más indicados para su amplificación en la PCR.

Otro inconveniente observado en la utilización de los cebadores procedentes de las regiones conservadas de las S-RNAs es que los productos de la amplificación en la PCR correspondientes a distintos alelos de incompatibilidad, en muchos casos corresponden a fragmentos de DNA de un tamaño similar, por lo que se necesita una digestión con enzimas específicas de restricción posterior para obtener polimorfismo en los patrones de bandas obtenidos (JANSSENS *ET AL.*, 1995; MATSUMOTO *ET AL.*, 1999; MATSUMOTO Y KITAHARA, 2000; ISHIMIZU *ET AL.*, 1999; TAO *ET AL.*, 1999; BRACE *ET AL.*, 1993; 1994).

Durante la aplicación de los cebadores ConF / ConR (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001) en las familias de este trabajo se han encontrado todos los inconvenientes descritos anteriormente. En primer lugar se descubrió que estos cebadores amplificaban el alelo S₃ de 'Ferragnès' y 'Ferralise' (Figura 5.3), lo que en un primer momento proporcionó esperanzas de que con una sola reacción PCR se pudieran identificar los tres alelos implicados en estas familias, a pesar de que los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados correspondientes a los alelos S₃ y S_f eran muy parecidos. Sin embargo, en los individuos autocompatibles, la amplificación del alelo S_f en la mayoría de los casos se vio silenciada por la amplificación de los alelos S₁ y S₃, lo que obligó al diseño de cebadores específicos para el alelo S₃ a partir de la secuencia del segundo intrón S₃ (S₃F y S₃R1) y del exón final (S₃R2) que permitiesen una buena amplificación y un tamaño diferenciable de los otros fragmentos, así como la utilización de los cebadores S_fF y S_fR (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2003) para la comprobación de la posesión del alelo S_f.

Por consiguiente, a la hora de identificar los genotipos S en familias para las que no existan referencias sobre el uso de los cebadores ya existentes, es recomendable ensayar en primer lugar los cebadores generados a partir de regiones conservadas con el propio material vegetal y en las condiciones de trabajo propias, debido a que estos cebadores amplifican una gran cantidad de alelos S y, si su funcionamiento es adecuado, puede proporcionar un gran ahorro económico. En segundo lugar, habría que utilizar, si existen, los cebadores específicos publicados para el alelo o los alelos que no amplifican los cebadores procedentes de regiones conservadas.

Para finalizar, en el caso de estudiar poblaciones de mejora de los que sólo se quieren conservar los individuos con el alelo S_f, el adecuado funcionamiento de los cebadores S_fF / S_fR en las familias estudiadas en este trabajo recomienda su uso.

5.5 CONCLUSIONES

Las proporciones genotípicas obtenidas en las progenies de 'Tuono' como parental femenino varían según que el parental masculino utilizado sea 'Ferragnès' o 'Ferralise', ajustándose más a la proporción $1 S_7S_f : 1 S_3S_f$ en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono' que en la 'Ferralise' x 'Tuono', en la que el efecto de la consanguinidad presente en 'Ferralise' parece favorecer la supervivencia de los individuos autoincompatibles S_7S_3 sobre los autocompatibles S_7S_3 , quizás como mecanismo de huida de la endogamia, forzando al cruzamiento a la descendencia obtenida.

Las proporciones genotípicas obtenidas en las progenies de 'Ferragnès' y 'Ferralise' como parental femenino con 'Tuono' como parental masculino se ajustan a las esperadas para los cruzamientos semicompatibles, $1 S_7S_f : 1 S_3S_f$.

Se ha observado una concordancia perfecta entre los genotipos asignados mediante la expresión de las S-RNAs estilares y los genotipos obtenidos en el análisis de la PCR alelo-específica.

Las observaciones fenotípicas en los descendientes de 'Ferragnès' concuerdan con los genotipos asignados, pero entre los descendientes de 'Ferralise' existen individuos genéticamente autocompatibles que muestran una autoincompatibilidad fisiológica, por lo que cabría pensar que la consanguinidad presente en 'Ferralise' forzaría a la polinización cruzada a algunos individuos genéticamente autocompatibles.

Resulta imprescindible el conocimiento del comportamiento de los cebadores alelo-específicos existentes para tener éxito en su utilización para la obtención de los genotipos S.

Se han diseñado y probado distintos cebadores específicos para el alelo S_3 , recomendando la combinación S3F/ConR que proporciona un fragmento de DNA amplificado de 950 pb en los genotipos que poseen este alelo. Estos cebadores pueden ser utilizados con éxito en los programas de mejora europeos, en los que el alelo S_3 es importante por la utilización de 'Ferragnès' y 'Ferralise' como genitores de floración tardía, en la búsqueda de nuevas variedades autocompatibles.

Se ha comprobado la especificidad de los cebadores S_fF/S_fR diseñados para la identificación del gen de autocompatibilidad (S_f) en las familias estudiadas, con lo que es teóricamente posible seleccionar los individuos que poseen este gen cuando la plántula comienza a tener hojas, con el consiguiente ahorro de espacio en las parcelas de mejora.

**6. ESTUDIO DE LOS INDIVIDUOS CON FENOTIPO
NO CONCORDANTE A SU GENOTIPO S**

6. ESTUDIO DE LOS INDIVIDUOS CON FENOTIPO NO CONCORDANTE A SU GENOTIPO S

6.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado en el apartado anterior, algunos descendientes de 'Ferralise' con genotipo autocompatible mostraron un comportamiento fenotípico distinto por la incapacidad de los tubos polínicos propios de atravesar la totalidad del estilo y penetrar en el ovario. El comportamiento autoincompatible observado en estos genotipos ha sido consistente a lo largo del período en el que se realizó la observación del crecimiento de los tubos polínicos, clasificándose como autoincompatibles porque mostraron llegada de tubos polínicos a la base de sus estilos en menos del 25% de los pistilos, y con una frecuencia inferior a 0,4 tubos en la base por pistilo.

En la primavera de 2003, se desarrolló un ensayo de polinizaciones controladas para dilucidar la razón de esta incapacidad, estudiando la interacción conjunta de la parte femenina y masculina mediante autopolinizaciones en laboratorio y en campo, así como el comportamiento separado de la parte femenina (los pistilos) y la parte masculina (el polen).

El ensayo consistió en la realización de nuevas autopolinizaciones, tanto en el laboratorio como en la parcela de mejora, de los genotipos en los que no se produce concordancia entre el fenotipo mostrado y el genotipo obtenido mediante los marcadores bioquímicos (S-RNasas) y de DNA (PCR alelo específicas). También se evaluó la capacidad de los estilos para sostener el crecimiento de los tubos polínicos mediante cruzamientos testigo, con las variedades 'Marcona' o 'Titan', y con plantas de igual genotipo de las mismas poblaciones, que habían mostrado un crecimiento vigoroso de sus tubos polínicos y elevado número de tubos polínicos en la base de sus estilos. De esta manera se determinaría si en los pistilos de estos individuos se produce una buena liberación de las reservas del tejido transmisor para ser utilizadas en la nutrición heterótrofa de los tubos polínicos, en condiciones en las que no existen relaciones de parentesco entre la parte femenina y masculina, y al menos en el caso de la polinización con 'Marcona' (genotipo $S_{11}S_{12}$) no se producirían reacciones de incompatibilidad en los pistilos. La última evaluación realizada fue la capacidad del polen de estos genotipos para fecundar flores de la variedad 'Titan', así como flores de plantas de igual genotipo de estas mismas poblaciones. De esta manera se determinaría la capacidad de los tubos polínicos procedentes de estos genotipos anómalos en captar los nutrientes aportados por los estilos de individuos no emparentados ('Titan') y su comportamiento en estilos en los que las relaciones de parentesco son elevadas (cruzamiento con flores de hermanos con idéntico genotipo).

Mediante la comparación de los resultados en las polinizaciones controladas también podremos determinar si las flores de estos individuos muestran una mayor sensibilidad al estrés producido por el cambio de las condiciones ambientales del campo al laboratorio, pudiendo influir en el crecimiento de los tubos polínicos, o si la incapacidad del polen propio de penetrar en el ovario en estos individuos se debe a factores genéticos debidos a los efectos de la consanguinidad.

6.2 MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología utilizada para la realización de estas polinizaciones fue la descrita anteriormente (Apartado 3.2.1), al igual que la preparación del material obtenido mediante su recogida y paso por el autoclave. La única salvedad fue que para las autopolinizaciones realizadas en campo (Fig. 6.1), las emasculaciones se realizaron en ramas etiquetadas y los pistilos se recogieron al día 12º (aprox. 288 horas) desde la autopolinización manual en campo y al 5º día (120 horas) en laboratorio, en lugar del 4º día (96 horas), como se hizo para la determinación del fenotipo con el fin de alargar el tiempo para el posible crecimiento de los tubos polínicos.

La preparación de las muestras y la observación de la llegada de los tubos polínicos a la base del estilo se realizó de acuerdo a la metodología descrita anteriormente (Apartado 3.2.2).

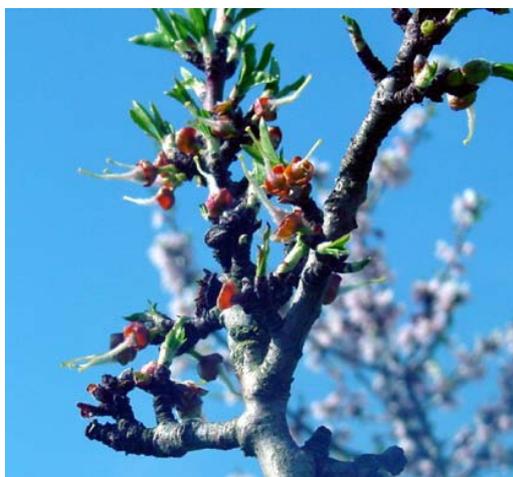


Fig. 6.1 Porción de una rama emasculada para realizar la autopolinización en campo.

6.3 RESULTADOS

En los Cuadros 6.1 y 6.2 se muestran los resultados obtenidos tras la observación microscópica de los pistilos de las distintas polinizaciones dirigidas realizadas, y en la Fig. 6.2 se representa las frecuencias medias de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo por tratamiento, así como la cantidad media de tubos polínicos en la base.

Cuadro 6.1 Autopolinizaciones realizadas a los individuos con genotipo autocompatible y fenotipo autoincompatible.

Individuos pertenecientes a la familia 'Tuono' x 'Ferralise'				
Individuo	⊗ anterior	⊗ laboratorio 2003	⊗ campo 2003	⊗ laboratorio Total
M-2-57 (S ₃ S ₇)	4 de 36 (11%) 0,4 tubos/pistilo	13 de 13 (100%) 1 tubo/pistilo	0 de 14 (0%) 0 tubos/pistilo	17 de 49 (35%) 0,5 tubos/pistilo
M-2-60 (S ₃ S ₇)	3 de 28 (11%) 0,2 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 1,2 tubos/pistilo	1 de 12 (8%) 0,1 tubos/pistilo	15 de 40 (37%) 0,5 tubos/pistilo
M-2-70 (S ₃ S ₇)	2 de 30 (7%) 0,1 tubos/pistilo	8 de 12 (67%) 0,7 tubos/pistilo	0 de 12 (0%) 0 tubos/pistilo	10 de 42 (24%) 0,3 tubos/pistilo
Individuos pertenecientes a la familia 'Ferralise' x 'Tuono'				
Individuo	⊗ anterior	⊗ laboratorio 2003	⊗ campo 2003	⊗ laboratorio Total
L-2-77 (S ₇ S ₇)	7 de 56 (12%) 0,4 tubos/pistilo	9 de 19 (47%) 0,6 tubos/pistilo	0 de 12 (0%) 0 tubos/pistilo	16 de 75 (21%) 0,5 tubos/pistilo
L-2-79 (S ₃ S ₇)	1 de 48 (2%) 0 tubos/pistilo	10 de 20 (50%) 0,5 tubos/pistilo	1 de 20 (5%) 0,1 tubos/pistilo	11 de 68 (16%) 0,2 tubos/pistilo
L-2-88 (S ₃ S ₇)	6 de 23 (26%) 0,2 tubos/pistilo	3 de 12 (25%) 0,3 tubos/pistilo	1 de 14 (7%) 0,1 tubos/pistilo	9 de 35 (26%) 0,3 tubos/pistilo
L-3-18 (S ₃ S ₇)	11 de 51 (20%) 0,4 tubos/pistilo	8 de 12 (67%) 0,8 tubos/pistilo	0 de 10 (0%) 0 tubos/pistilo	19 de 63 (30%) 0,5 tubos/pistilo
L-3-32 (S ₃ S ₇)	2 de 62 (3%) 0 tubos/pistilo	2 de 12 (17%) 0,2 tubos/pistilo	0 de 6 (0%) 0 tubos/pistilo	4 de 74 (5%) 0,05 tubos/pistilo
L-3-40 (S ₃ S ₇)	3 de 24 (12%) 0,3 tubos/pistilo	10 de 19 (53%) 0,5 tubos/pistilo	3 de 6 (50%) 0,5 tubos/pistilo	13 de 43 (30%) 0,4 tubos/pistilo
L-3-47 (S ₇ S ₇)	2 de 22 (9%) 0,3 tubos/pistilo	8 de 12 (67%) 0,8 tubos/pistilo	4 de 10 (40%) 0,4 tubos/pistilo	10 de 34 (29%) 0,5 tubos/pistilo

⊗ = autopolinización; tubos/pistilo = media de tubos en la base del estilo por pistilo observado.

Cuadro 6.2 Comportamiento de la parte femenina y masculina de los individuos con autoincompatibilidad fisiológica.

Individuos pertenecientes a la familia 'Tuono' x 'Ferralise'					
Individuo	Testado de sus pistilos			Testado del polen	
	♂ 'Marcona'	♂ 'Titan'	♂ 'M-2-75' (S ₃ S ₇)	♀ 'Titan'	♀ 'M-2-75' (S ₃ S ₇)
M-2-57 (S ₃ S ₇)	14 de 14 (100%) 5,6 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 9 tubos/pistilo	4 de 15 (26%) 0,5 tubos/pistilo	7 de 15 (47%) 0,7 tubos/pistilo	11 de 12 (92%) 8 tubos/pistilo
M-2-60 (S ₃ S ₇)	11 de 14 (78%) 4 tubos/pistilo	11 de 12 (92%) 7,7 tubos/pistilo	1 de 5 (20%) 0,6 tubos/pistilo	7 de 17 (41%) 1,9 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 8,6 tubos/pistilo
M-2-70 (S ₃ S ₇)	11 de 12 (89%) 6,5 tubos/pistilo	11 de 12 (92%) 7,7 tubos/pistilo	0 de 12 (0%) 0 tubos/pistilo	5 de 10 (50%) 1,3 tubos/pistilo	11 de 11 (100%) 7,6 tubos/pistilo
Individuos pertenecientes a la familia 'Ferralise' x 'Tuono'					
Individuo	Testado de sus pistilos			Testado del polen	
	♂ 'Marcona'	♂ 'Titan'	♂ = Genotipo S	♀ 'Titan'	♀ = Genotipo S
L-2-77 (S ₇ S ₇)	15 de 16 (94%) 4,1 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 8,8 tubos/pistilo	0 de 15 (0%) ⁽¹⁾ 0 tubos/pistilo	8 de 15 (53%) 1 tubo/pistilo	12 de 12 (100%) ⁽¹⁾ 6,6 tubos/pistilo
L-2-79 (S ₃ S ₇)	11 de 12 (92%) 3,3 tubos/pistilo	10 de 10 (100%) +10 tubos/pistilo	6 de 28 (21%) ⁽²⁾ 1,4 tubos/pistilo	16 de 22 (73%) 1,6 tubos/pistilo	9 de 9 (100%) ⁽²⁾ +10 tubos/pistilo
L-2-88 (S ₃ S ₇)	10 de 12 (83%) 2,5 tubos/pistilo	11 de 12 (92%) 7,2 tubos/pistilo	0 de 9 (0%) ⁽²⁾ 0 tubos/pistilo	16 de 20 (80%) 1,8 tubos/pistilo	11 de 12 (92%) ⁽²⁾ 8,5 tubos/pistilo
L-3-18 (S ₃ S ₇)	9 de 10 (90%) 3,5 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 9,8 tubos/pistilo	10 de 12 (100%) ⁽²⁾ 3,7 tubos/pistilo	11 de 15 (80%) 1,6 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) ⁽²⁾ 4,4 tubos/pistilo
L-3-32 (S ₃ S ₇)	15 de 15 (100%) 9,3 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) 7,8 tubos/pistilo	0 de 12 (0%) ⁽²⁾ 0 tubos/pistilo	9 de 11 (82%) 3 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) ⁽²⁾ 9,2 tubos/pistilo
L-3-40 (S ₃ S ₇)	12 de 12 (100%) 7,7 tubos/pistilo	10 de 14 (71%) 2,2 tubos/pistilo	8 de 22 (36%) ⁽²⁾ 0,6 tubos/pistilo	21 de 26 (81%) 5 tubos/pistilo	21 de 21 (100%) ⁽²⁾ +10 tubos/pistilo
L-3-47 (S ₇ S ₇)	6 de 6 (100%) 9 tubos/pistilo	9 de 9 (100%) 8,2 tubos/pistilo	3 de 8 (37%) ⁽¹⁾ 0,7 tubos/pistilo	11 de 14 (79%) 2,5 tubos/pistilo	12 de 12 (100%) ⁽¹⁾ 7 tubos/pistilo

(1) Cruzamientos con L-3-37 (S₇S₇)(2) Cruzamientos con L-3-63 (S₃S₇)

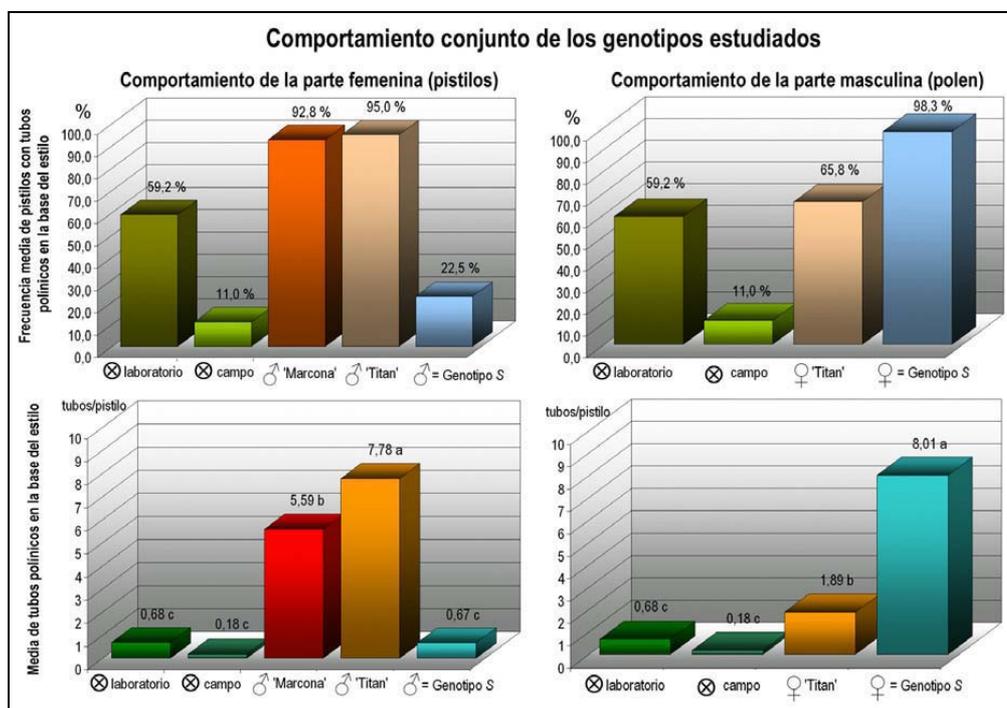


Fig. 6.2 Comportamiento conjunto de los genotipos autoincompatibles fisiológicos.

6.4 DISCUSIÓN

Las polinizaciones dirigidas realizadas en la primavera de 2003 en los individuos en los que se determinó un fenotipo autoincompatible, aunque en la identificación de su genotipo se detectó la presencia del alelo S_i , muestran unos resultados dispares. En algunos individuos, las autopolinizaciones realizadas en laboratorio parecen indicar una tendencia hacia la expresión de la autocompatibilidad ('M-2-57', 'M-2-60', 'M-2-70', 'L-2-79', 'L-3-18', 'L-3-40' y 'L-3-47'), ya que se ha observado la llegada de tubos polínicos a la base del estilo en más del 50% de los pistilos observados (Cuadros 6.1). Ello puede ser debido a que la evaluación de la llegada de tubos polínicos en este ensayo se realizó a las 120 horas desde la autopolinización, en lugar de 96 como en la determinación fenotípica de la autocompatibilidad. A pesar de que se produjo una mayor proporción de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo, la cantidad máxima de tubos polínicos en estos individuos no superó los 1,2 tubos/pistilo (0,66 tubos/pistilo en el conjunto de estos individuos; Fig. 6.2), quedando este valor muy lejano al considerado conveniente como indicador de una elevada autocompatibilidad en el Apartado 3 de este trabajo (>3 tubos/pistilo). Sin embargo, si se añaden estos resultados a los que se utilizaron para la determinación del fenotipo (Apartado 3), el fenotipo de algunos de estos individuos pasaría a considerarse dudoso ('M-2-57',

'M-2-60', 'L-3-18', 'L-3-40' y 'L-3-47') ya que superaría ligeramente el 25% de pistilos con llegada de tubos polínicos a su base (Cuadro 6.1).

Las autopolinizaciones realizadas en campo mostraron proporciones muy bajas de pistilos con llegada de tubos polínicos en su base. Probablemente la helada producida el 18 de marzo de 2003 (- 3 °C durante 5 horas) afectó negativamente al crecimiento de los tubos polínicos, a pesar de que sólo se evaluó el crecimiento en los pistilos en los que no se observó necrosis de sus tejidos al recogerlos en la parcela. Se descartaron muchos pistilos por su total o parcial necrosis causada por la congelación sufrida, aunque las heladas no parecen afectar de la misma manera la parte femenina que la masculina, ya que a pesar de las heladas los tubos polínicos siguen creciendo, aunque a un ritmo menor debido a las bajas temperaturas (SOCIAS I COMPANY, 1982).

El alejamiento de los criterios de autocompatibilidad de estos individuos (proporción de pistilos con llegada de tubos polínicos a la base del estilo y número de tubos polínicos en la base por pistilo observado), parece no deberse a una incapacidad de los pistilos para sustentar y nutrir a los tubos polínicos que atraviesan su tejido transmisor, ya que se observó un buen crecimiento de los tubos polínicos tanto de 'Marcona' como de 'Titan', que llegan a la base del estilo en la mayoría de los pistilos observados y en una cantidad mucho mayor que en las autopolinizaciones (Fig. 6.2).

Tampoco parece deberse a una falta de vigor de los tubos polínicos o de su deficiencia en el mecanismo de captación de nutrientes del tejido transmisor, ya que, de manera general, los tubos polínicos procedentes de estos individuos crecen adecuadamente en los pistilos de la variedad 'Titan' (Fig. 6.2), llegando a la base del estilo en una elevada proporción de los pistilos observados, así como en unos números superiores a los observados en las autopolinizaciones.

Por consiguiente, la causa del fracaso en la capacidad de fecundación presente en estos individuos es la interacción del pistilo con su propio polen. La presencia de consanguinidad en estos individuos puede provocar la expresión de genes en el pistilo negativos para el crecimiento de los tubos polínicos. Ello también explicaría el mal crecimiento general observado en los pistilos de estos individuos de los tubos polínicos procedentes de hermanos completos con idéntico genotipo S, hermanos que sin embargo mostraron un fenotipo altamente autocompatible (Fig. 6.2), pero no en el cruzamiento recíproco ensayado en dos de estos genotipos.

La disminución de la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos propios o emparentados en estos individuos, que necesitan más tiempo para llegar a penetrar el ovario que los tubos polínicos sin parentesco genético, podría ser una expresión de la consanguinidad. Esta hipótesis explicaría que a las 96 horas desde la autopolinización en laboratorio, momento adecuado

para la determinación fenotípica de la autocompatibilidad a esta temperatura (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1976), en estos individuos no se produjo prácticamente la llegada de tubos polínicos a la base del estilo. Los tubos polínicos más avanzados en su recorrido en estos genotipos habían alcanzado aproximadamente las 4 / 5 partes del estilo, mostrando una gran reducción en su número en el tercio medio del estilo como en las otras polinizaciones semicompatibles realizadas. Sin embargo, a diferencia de las polinizaciones semicompatibles, los tubos polínicos eran más delgados y mostraban menos fluorescencia, dando sensación de falta de vigor. En este ensayo, la fijación de los pistilos tras la autopolinización en laboratorio se realizó a las 120 horas. Los datos obtenidos parecen indicar que las 24 horas de diferencia permitieron llegar a la base del estilo uno o dos tubos polínicos en una mayor cantidad de pistilos. Esta menor velocidad del polen propio o emparentado, en estos individuos consanguíneos, sería una autocompatibilidad silenciada o encriptada, que promovería el cruzamiento con genotipos no emparentados, que por su mayor velocidad de crecimiento de los tubos polínicos estarían en una situación de ventaja para llevar a cabo la fecundación, ampliando de esta manera la base genética de su descendencia e incrementando su vigor por el efecto de la heterosis híbrida.

6.5 CONCLUSIONES

En los individuos que poseen el alelo de autocompatibilidad S_f con fenotipo agronómicamente autoincompatible se ha observado que a las 120 horas desde la autopolinización, en algunos pistilos se produce la llegada de uno o dos tubos polínicos a la base del estilo, lo que implica una menor velocidad de crecimiento de sus tubos polínicos en relación a la mostrada por los individuos autocompatibles de las mismas familias.

El buen comportamiento de los tubos polínicos no emparentados en los pistilos de estos genotipos, evidenciado por la elevada proporción de pistilos con un gran número de tubos polínicos en la base de los estilos, en contraste con el comportamiento observado tras las autopolinizaciones o las polinizaciones con hermanos completos con el mismo genotipo S, indican que la causa principal de este comportamiento diferencial es la expresión de la consanguinidad.

La baja velocidad de crecimiento observada en los tubos polínicos propios de estos individuos, puede ser una herramienta para fomentar el cruzamiento, de manera que los tubos polínicos no emparentados llegarían antes y en mayor número a la base del estilo en estos individuos pseudo-autocompatibles consanguíneos.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de evitar la consanguinidad en los programas de mejora genética del almendro, peligro evidente por la utilización de un número reducido de parentales en muchos de estos programas.

**7. EVALUACIÓN DE LOS CUAJADOS DE RAMAS EMBOLSADAS
EN INDIVIDUOS AUTOCOMPATIBLES Y SU RELACIÓN
CON LA MORFOLOGÍA FLORAL**

7. EVALUACION DE LOS CUAJADOS DE RAMAS EMBOLSADAS EN INDIVIDUOS AUTO-COMPATIBLES Y SU RELACION CON LA MORFOLOGÍA FLORAL

7.1 INTRODUCCIÓN

La autogamia es la capacidad que tiene una planta para desarrollar frutos viables procedentes de su autopolinización natural, sin la intervención de ningún vector polinizador, que en el caso del almendro serían las abejas. Para ello es indispensable que la planta sea genéticamente autocompatible y presente una autocompatibilidad de buena calidad, puesta de manifiesto por un elevado número de tubos polínicos propios en la base del estilo tras su autopolinización natural.

La autogamia que pueda presentar una variedad o selección es una característica difícil de evaluar. Tradicionalmente, esta característica se ha medido mediante la cuantificación de los cuajados obtenidos en ramas embolsadas para evitar su polinización por insectos (GRASSELLY *ET AL.*, 1981; STYLIANIDIS *ET AL.*, 1990; ROVIRA *ET AL.*, 1997; VARGAS *ET AL.*, 1997; PALASCIANO *ET AL.*, 1998). La clasificación, generalmente aceptada, de la autocompatibilidad en función de los cuajados obtenidos en estas ramas (GRASSELLY *ET AL.*, 1981), diferencia los siguientes grupos: los cuajados inferiores a 0,5% de las yemas iniciales corresponden a individuos autoincompatibles; los cuajados entre 1 y 5% corresponden a individuos con una débil autocompatibilidad; los individuos con cuajados superiores al 6% serían autocompatibles, y entre ellos, los que tienen cuajados superiores al 10% mostrarían una elevada autocompatibilidad. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente (Apartado 3.1), existen numerosos factores que pueden influir negativamente en los cuajados obtenidos, como es el daño sufrido en las yemas por el embolsado (GRASSELLY Y OLIVIER, 1976), por lo que la evaluación del material vegetal por este método puede no ser acorde con la realidad.

Según algunos autores (VASILAKAKIS Y PORLINGIS, 1984; WEINBAUM, 1985; WEINBAUM *ET AL.*, 1986), la morfología de la flor puede favorecer o impedir una buena autogamia, ya que ésta define la intimidad del contacto entre la superficie estigmática y las anteras. Una posición del estigma demasiado alejada del plano superior de las anteras puede impedir la autopolinización natural en ausencia de insectos polinizadores, como en el caso de las plantas que presentan flores epiestigmáticas de forma acusada. Por el contrario, un contacto íntimo entre la superficie estigmática y las anteras, como en flores con el estigma inmerso en el espacio abarcado por las anteras, favorecería la autopolinización natural y, por lo tanto, unido a la autocompatibilidad, podría resultar en una buena autogamia, como en el caso de flores con morfología mesoestigmática o hipoestigmática. A priori, la morfología de la flor, y en especial la posición relativa del estigma en

relación al plano superior de las anteras, podría jugar un papel importante en la calidad de las flores de las nuevas selecciones autocompatibles de almendro, ya que se convierte en un carácter relacionado con la biología floral de las mismas, tal como ocurre en el peral, en el que se observó una mayor cantidad de frutos cuajados cuando existía un contacto íntimo entre las anteras y la superficie estigmática (WESTWOOD *ET AL.*, 1966).

Sin embargo, GODINI *ET AL.* (1992), observaron en ocho variedades autocompatibles de almendro aisladas de los insectos polinizadores mediante cabinas, la presencia de una amplia variabilidad entre los cuajados obtenidos en ramas con autopolinización natural respecto a los cuajados obtenidos en ramas con autopolinización manual, aunque no pudieron explicar estas diferencias por la morfología floral de cada una de estas variedades.

WEINBAUM *ET AL.* (1986) indicaron la posibilidad de que la falta de contacto en las flores entre la superficie estigmática y las anteras pueda estar relacionada con la autoincompatibilidad. En el almendro, DE PALMA Y GODINI (1994) compararon las características morfológicas de las flores de distintas variedades autocompatibles de la región italiana de la Apulia con distintas variedades autoincompatibles, e indicaron que la mayoría de las variedades autocompatibles de esta región se caracterizan por presentar flores epiestigmáticas con grandes separaciones entre sus estigmas y el plano superior de las anteras, mientras que la mayoría de las variedades autoincompatibles se caracterizaban por presentar flores mesoestigmáticas o hipoestigmáticas. La independencia de la estructura de la flor de su autocompatibilidad o autoincompatibilidad en el almendro se confirmó también con la comparación de genotipos autocompatibles y autoincompatibles autóctonos de la India por KUMAR Y KUMAR (2000).

En este apartado, se va a discutir la idoneidad del embolsado de ramas para la evaluación de la capacidad de autogamia de los individuos autocompatibles en las condiciones ambientales de Zaragoza. También se va a caracterizar la morfología de sus flores y discutir si la posición relativa del estigma en relación con el plano superior de las anteras influye sobre los cuajados observados. En definitiva, se pretende comprobar si la morfología de la flor capacita al individuo a autopolinizarse con mayor facilidad, lo que teóricamente repercutiría en unos cuajados mayores, o si por el contrario la posición relativa de las anteras no influye en la biología reproductiva del almendro y por lo tanto debe considerarse sólo como un carácter interesante en la caracterización morfológica de los distintos genotipos.

7.2 MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1 OBTENCIÓN DE CUAJADOS EN RAMAS EMBOLSADAS

Durante las primaveras de 2002 y 2003 se realizó el embolsado de ramas en algunos individuos con genotipo autocompatible. Para ello en enero se seleccionaron y etiquetaron ramas que presentaban más de 100 yemas de flor.

Cuando las yemas se encontraban en los estados B-C (Fig. 7.1.A) de FELIPE (1977), se contabilizó el número total de yemas con la ayuda de un contador mecánico de presión. Se determinó el número de yemas de cada rama por la media aritmética de dos conteos en los que la diferencia entre las medidas fuera inferior al 10%.

Una vez realizado el conteo se procedió al embolsado de las ramas (Fig. 7.1.B) mediante sacos realizados de malla mosquitera de plástico verde de 120 x 80 cm, lo que permite el paso de la luz y el aire, pero no de las abejas (Fig. 7.1.C).

Debido a la densidad de plantación elevada de esta parcela de mejora (un árbol cada 10 cm), las plantas se ven obligadas a adoptar un porte con muy poca ramificación tendiendo a crecer en altura (Fig. 7.2.D). Este porte es muy inadecuado para realizar el embolsado, ya que obliga en muchos casos a embolsar gran parte de su copa en la zona superior del árbol, con lo que los días de fuerte cierzo se produce un balanceo que mueve violentamente las ramas, golpeándose unas contra otras, hasta tal punto que en algún caso se produjo la rotura de mallas e incluso de las propias ramas. Con el fin de disminuir estos efectos negativos provocados por los fuertes vientos, se ataron las ramas con cintas elásticas a los troncos de los árboles contiguos (Fig. 7.2.E).

Después de la caída de los pétalos se retiraron las bolsas de los árboles. Las operaciones de colocación de las bolsas y de su retirada deben realizarse con el máximo cuidado, ya que se puede provocar la caída de yemas, con lo que se desvirtúa el cuajado final. La cantidad de frutos cuajados se obtuvo a principios de mayo, después de la caída fisiológica de los frutos (KESTER Y GRIGGS, 1959). El cuajado se calculó como:

$$\text{Cuajado} = \frac{\text{Frutos cuajados en la rama}}{\text{Yemas en estado C de la rama}} \times 100$$

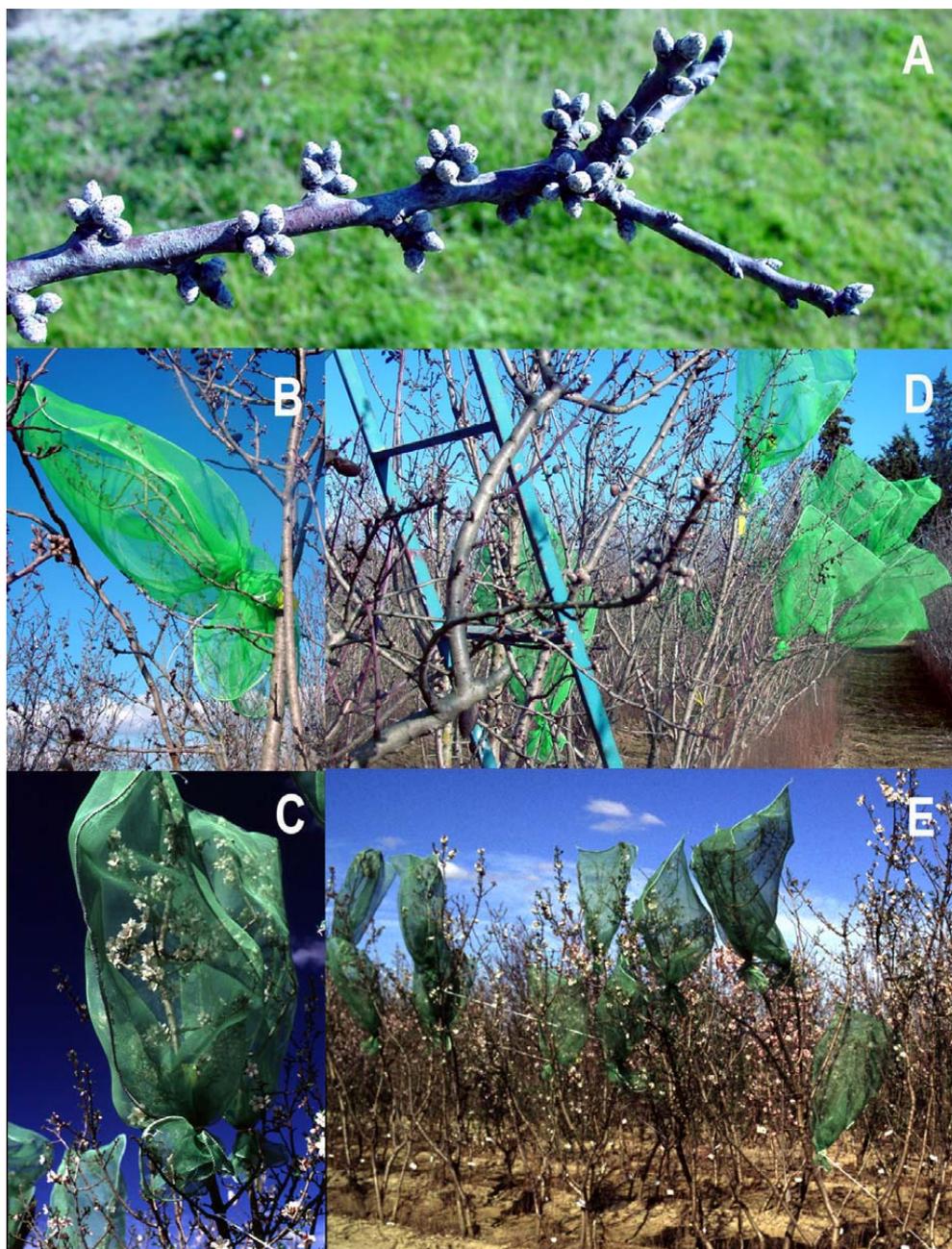


Fig. 7.1 Embolsado de ramas en individuos con fenotipo autocompatible.

A) Yemas de flor en los estados B-C de FELIPE (1977).

B) Rama recién embolsada.

C) Rama embolsada en el momento de la floración.

D) Perspectiva de algunos individuos embolsados.

E) Tiradores elásticos para disminuir el movimiento de las ramas en los días con mucho viento.

7.2.2 MORFOLOGÍA DE LA FLOR.

Se cuantificó la posición relativa del estigma con relación a las anteras en 73 plantas autocompatibles de las distintas familias estudiadas. Para ello se tomaron al azar por individuo 10 flores en antesis (estado E de FELIPE, 1977), registrando en cada flor las medidas que se reflejan en la Fig. 7.2.A, con la ayuda de un pie de rey:

P = Longitud total del pistilo (mm).

E = Altura relativa del estigma en relación a la base del ovario (mm).

Ai = Altura relativa de la antera inferior en relación a la base del ovario (mm).

As = Altura relativa de la antera superior en relación a la base del ovario (mm).

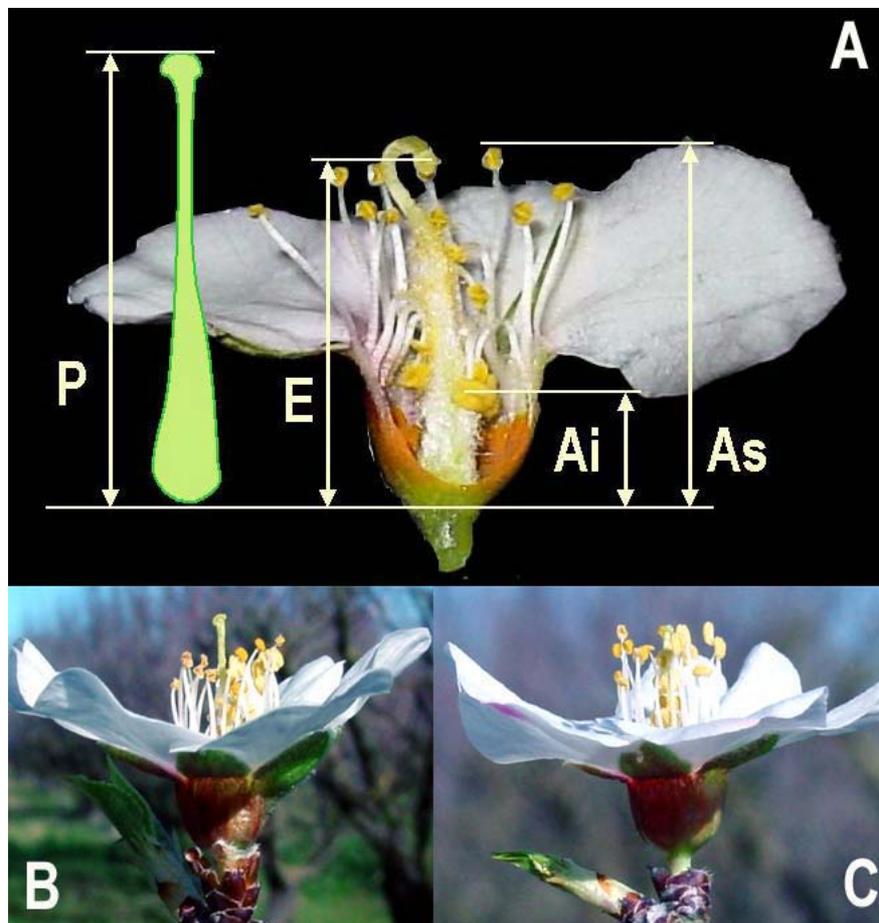


Fig. 7.2 Morfología de la flor
A) Medidas realizadas en las flores.
B) Flor epistigmática respecto a las anteras.
C) Flor mesoestigmática respecto a las anteras.

A partir de estas medidas se calculó:

La curvatura del pistilo (C): $C = 100 - (E / P) \times 100$

Posición de la antera superior respecto al plano del estigma (PR): $PR = A_s - E$ (mm)

Distancia abarcada por las anteras (DA): $DA = A_s - A_i$ (mm)

Según la PR, se determinó la morfología de la flor en cada individuo, asignando una morfología epiestigmática cuando $PR < 0$ (Fig. 7.2.B), morfología mesoestigmática cuando $PR = 0$ (Fig. 7.2.C) y morfología hipoestigmática cuando $PR > 0$.

Estos datos se analizaron estadísticamente por medio de ANOVA y el test de Duncan ($P=0,05$) con el programa estadístico SAS V8 (SAS, 1999), considerando como fuentes de variación el parental autoincompatible de los individuos, la familia a la que pertenecen, su genotipo S y cada individuo.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 CUAJADOS OBSERVADOS EN LAS RAMAS EMBOLSADAS

Los cuajados obtenidos fueron muy bajos (Fig.7.3). El 42% de las ramas embolsadas registraron unos cuajados considerados propios de genotipos autoincompatibles (0 a 0,5%) según el criterio de GRASSELLY *ET AL.* (1981). Otro 36% de ramas registró un cuajado comprendido entre 0,5 y 5%, correspondiente al rango asignado a genotipos con una débil autocompatibilidad. Sólo el resto de las ramas, el 22%, mostraron un cuajado de frutos superior al 5%, límite inferior para los cuajados correspondientes a genotipos realmente autocompatibles, aunque sólo el 6% mostraron cuajados superiores al 10%, valor a partir del cual el genotipo muestra una autocompatibilidad adecuada.

Los cuajados tuvieron una gran variación anual (Fig. 7.3). A modo de ejemplo, en el análisis realizado con 26 individuos, se observó un cuajado medio de 2,8% en el año 2002 y de sólo 0,8% en 2003.

En estos individuos no se ha encontrado una relación entre sus cuajados medios y la cantidad de tubos polínicos en la base del estilo tras su autopolinización en laboratorio, característica que indica la calidad de la autocompatibilidad en el Apartado 3.3.1.

La gran proporción de cuajados erráticos producidos en las ramas embolsadas pertenecientes a individuos que mostraron un fenotipo autocompatible, tras la observación del crecimiento de sus tubos polínicos, justifica la no utilización del embolsado de ramas en nuestras

condiciones para la determinación fenotípica de la autocompatibilidad, tal como se había aconsejado (SOCIAS I COMPANY ET AL., 2002).

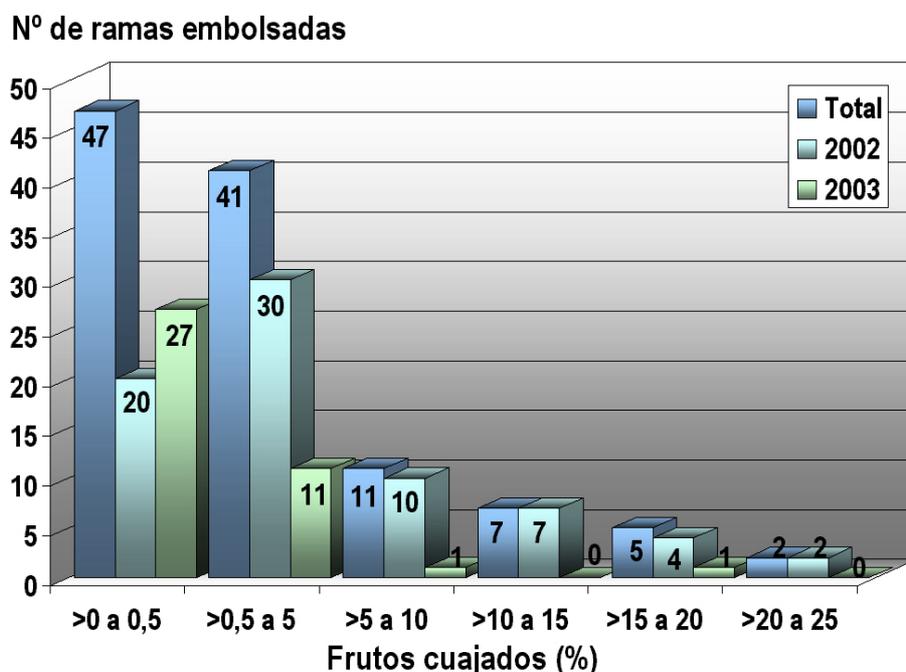


Fig.7.3 Cuajados obtenidos en ramas embolsadas de individuos autocompatibles.

7.3.2 MORFOLOGÍA DE LA FLOR EN INDIVIDUOS AUTOCOMPATIBLES ESTUDIADOS.

Los descendientes autocompatibles de 'Ferragnès' y 'Ferralise' en sus cruzamientos con 'Tuono' tienen una morfología floral media ligeramente epiestigmática. Los descendientes de 'Ferralise' presentan el estigma más cercano al plano superior de las anteras que los descendientes de 'Ferragnès' (Fig. 7.4.A).

Esta característica se debe principalmente a que los descendientes autocompatibles de 'Ferragnès' estudiados presentan una longitud media de los pistilos mayor que los descendientes de 'Ferralise'. La curvatura media (C) de los pistilos, tanto en los descendientes autocompatibles de 'Ferragnès' como en los de 'Ferralise', es pequeña, en torno al 10%, y las distancias entre las anteras superiores e inferiores ($DA \approx 5,7\text{mm}$) también fueron similares.

Las diferencias en la morfología de las flores entre las distintas familias de estos individuos son pequeñas (Fig. 7.4.B). La morfología media en todas las familias es ligeramente epiestigmática, mostrando la mayor distancia del plano superior de las anteras respecto al estigma en la familia

'Ferragnès' x 'Tuono' (PR = -1,55mm) y la menor en la familia 'Ferralise' x 'Tuono' (PR = -0,3mm), pudiéndose considerar esta morfología casi mesoestigmática. La mayor curvatura y la mayor longitud de pistilos se observaron en los descendientes de 'Ferragnès' x 'Tuono' (C = 12,6%; P = 18,9mm). La menor curvatura se observó en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' (C = 4,5%). La amplitud abarcada por las anteras varió muy poco según las familias, con una oscilación entre 5,5 y 5,9 mm.

Al igual que ocurre con las diferencias entre las familias, la morfología media también presenta variaciones pequeñas según el genotipo S de los individuos observados (Fig. 7.4.C). La única diferencia destacable es la superioridad de los individuos S_3S_f sobre los individuos S_fS_f en las longitudes medias de los pistilo (P) y de los estambres inferiores (A_i).

No obstante, aunque existen diferencias entre las medidas registradas en las agrupaciones creadas, parental autoincompatible, familia y genotipo S, dentro de estos grupos existe bastante variabilidad entre los individuos, reflejada en las figuras 7.5.A y B. En la Fig. 7.5.A se refleja la variabilidad en la altura del estigma ($10,1\text{mm} > E < 22,8\text{ mm}$) y la variabilidad en la altura de la antera superior ($11,7\text{mm} > A_s < 20,0\text{ mm}$). En la figura, los puntos por encima de la diagonal muestran los individuos epiestigmáticos (62%), mientras que los puntos por debajo de la diagonal muestran los individuos hipoestigmáticos (38%).

Esta variabilidad individual también se refleja en la Fig. 7.4.B, en la que aparece la distribución de los individuos en función de la distancia de la antera superior al estigma (PR). La mayoría de los individuos (64%) tienen una morfología floral en el intervalo PR [-2,+2], mientras que el 29% muestran una acusada morfología epiestigmática (PR < -2mm) y sólo el 7% una acusada estructura floral hipoestigmática (PR > 2mm).

7.3.3 RELACIÓN ENTRE LOS CUAJADOS OBSERVADOS Y LA POSICIÓN DE LAS ANTERAS SUPERIORES EN RELACIÓN A LA DEL ESTIGMA

En la Fig.7.6 se observa que los cuajados erráticos se producen indistintamente de la morfología floral. También se aprecia un mayor cuajado en las flores que presentan flores epiestigmáticas con un intervalo PR [-3, 0] en relación con las flores hipoestigmáticas con intervalo PR [0, +3]. En las ramas con flores de morfología extrema (PR > 2 o PR < -3) se observaron cuajados muy bajos.

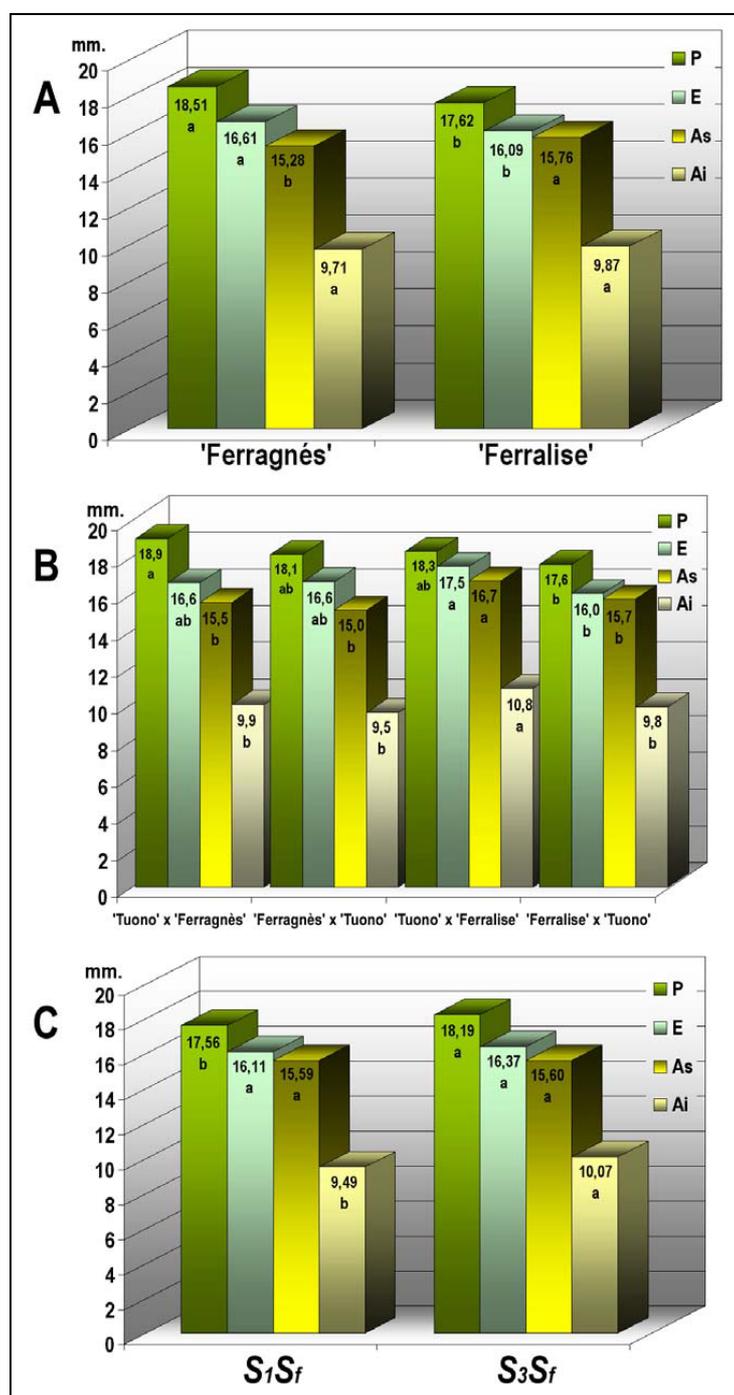


Fig. 7.4 Características generales de los descendientes autocompatibles:
 A) Morfología media de las flores según su parental autoincompatible.
 B) Morfología media de la flor en las distintas familias estudiadas.
 C) Morfología media de la flor en función de su genotipo S.

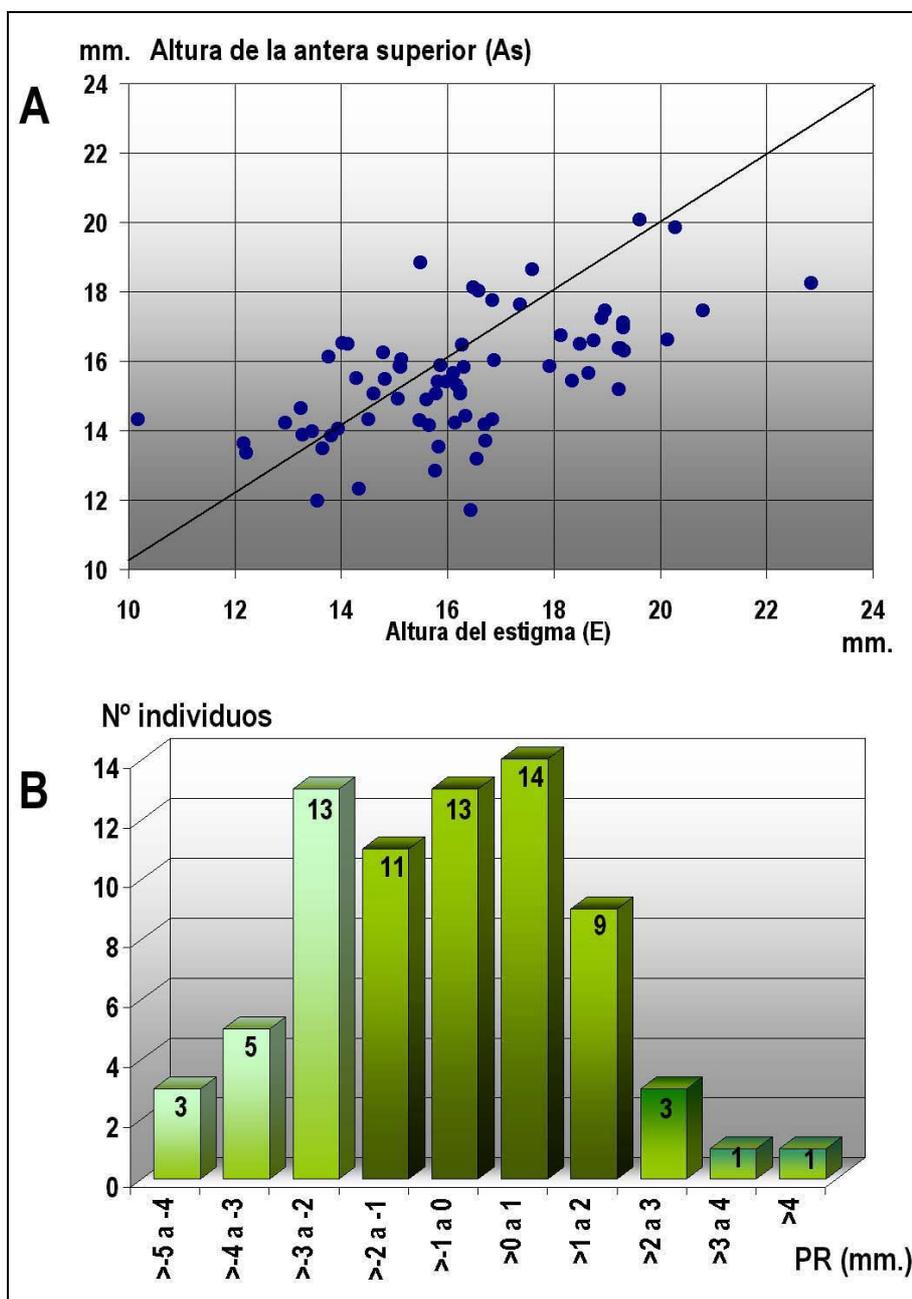


Fig. 7.5 Variabilidad observada en la morfología floral.
 A) Altura del estigma en relación a la altura de la antera superior.
 B) Distribución de los individuos estudiados en función de su PR.

Estos resultados contradicen las teorías que relacionan el contacto íntimo de las anteras y el estigma con la obtención de cuajados elevados en genotipos autocompatibles (VASILAKAKIS Y PORLINGIS, 1984; WEINBAUM, 1985; WEINBAUM *ET AL.*, 1986). A pesar de la obtención de cuajados erráticos en las ramas embolsadas, estos resultados permiten deducir que la posición relativa de las anteras superiores con relación a la del estigma no parece tener una gran influencia en los cuajados producidos, corroborando las indicaciones de GODINI *ET AL.*, (1992).

Frutos cuajados en ramas embolsadas (%)

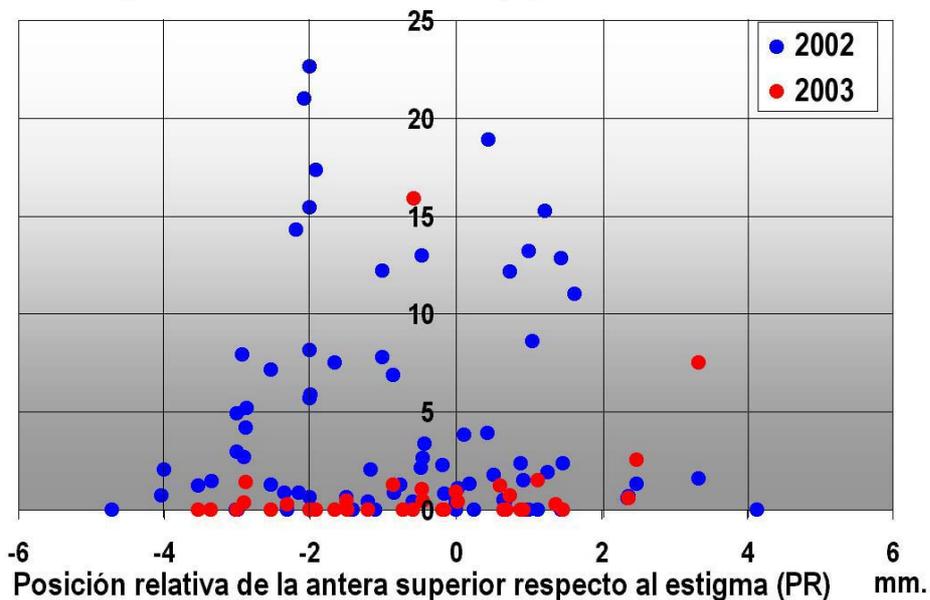


Fig. 7.6 Distribución de los cuajados en función de la morfología floral.

7.4 DISCUSIÓN

Existen muchos factores que pueden hacer variar el cuajado obtenido en ramas embolsadas. Ya se han indicado los inconvenientes del embolsado en los árboles de estas poblaciones, por su porte descompensado causado por la elevada densidad de plantación y por los vientos dominantes, que castigan seriamente las ramas embolsadas. Además, estos cuajados erráticos obtenidos en ramas embolsadas también pueden tener una base genética, principalmente por el efecto de la consanguinidad. GRASSELLY *ET AL.* (1981) encontraron unos cuajados muy bajos en ramas embolsadas de árboles procedentes de la autopolinización de 'Tuono', y por lo tanto genéticamente autocompatibles. Algunos de estos árboles se caracterizaron por presentar síntomas de consanguinidad, como escasez de flores, mala calidad de las mismas y, en algunos casos, una

elevada proporción de flores estériles, como también se ha observado en algunos de estos árboles, en los que 'Tuono' también es un parental.

Por lo tanto, en estas condiciones y con este material vegetal, teniendo en cuenta la gran cantidad de factores que pueden producir cuajados erráticos en plantas autocompatibles y las grandes variaciones observadas anualmente en su evaluación (SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 2002), no es recomendable el uso de esta técnica para la determinación de la autogamia, ni para la evaluación de la autocompatibilidad en progenies de mejora, siendo más convenientes las técnicas de laboratorio.

Las medias de la morfología floral de los descendientes autocompatibles estudiados pertenecientes a las distintas familias muestran diferencias significativas para las distintas agrupaciones creadas; según el parental autoincompatible del que proceden, según la familia a la que pertenecen y según su genotipo *S*. Todos estos grupos muestran una morfología media floral ligeramente epistigmática, al igual que sus parentales 'Ferragnès' (DE PALMA Y GODINI, 1994) y 'Tuono' (GODINI *ET AL.*, 1992).

Sin embargo, destaca la gran variabilidad observada en la morfología floral entre los individuos, a pesar de la reducida base genética de la que proceden. También se ha observado una pequeña variabilidad dentro de cada individuo. Esta variación intraindividual puede variar durante la floración, debido a que la proporción de flores estériles, caracterizadas generalmente por tener pistilos muy cortos, suele aumentar con el avance de la floración (SOCIAS I COMPANY, 1983).

Debido a la elevada proporción de cuajados erráticos producidos en las ramas embolsadas no es posible establecer una relación entre estos cuajados y la cantidad de tubos polínicos en la base del estilo tras la autopolinización en el laboratorio (Apartado 3.3.1). Por otra parte, la naturaleza de estas dos polinizaciones es distinta. En el laboratorio se realiza una autopolinización asistida provocando la saturación de la superficie estigmática con granos de polen, mientras que en los embolsamientos la autopolinización no es asistida, de manera que la llegada de granos de polen a la superficie estigmática, si se produce, tiene lugar sin intervención de ningún vector polinizador. El cuajado obtenido dependerá de la cantidad de polen que llegue al estigma, de la calidad de la autocompatibilidad de cada individuo, y de las condiciones ambientales hasta el conteo de frutos, demasiadas variables para relacionar la calidad de la autocompatibilidad observada en el laboratorio con los cuajados obtenidos. Se podrían obtener mejores resultados, aunque también sujetos a los inconvenientes de la intervención del ambiente, si se comparase la calidad de la autocompatibilidad en laboratorio con los cuajados obtenidos en ramas autopolinizadas manualmente, ya que se ha observado mucha menor variación en los cuajados producidos en autopolinizaciones asistidas que

en autopolinizaciones sin asistencia de vectores polinizadores (GODINI *ET AL.*, 1992; SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 2002).

Aunque la morfología de la flor puede tener alguna influencia en la llegada del polen al estigma, por el pequeño balanceo producido por el viento, la mayoría de las flores no tiene su eje ortogonal con el suelo, sino que están dispuestas en todos los ángulos, lo que podría ayudar a la caída del polen de la misma flor sobre el estigma, con lo que la morfología floral podría perder importancia.

Otro aspecto poco conocido y estudiado de la morfología floral es la capacidad de las flores de atraer electroestáticamente los granos de polen. Según VAKNIN *ET AL.* (2001), en ensayos realizados con réplicas metálicas de flores de almendro, la capacidad electroestática de las flores para atraer el polen con carga contraria aumenta con el ángulo de apertura de la corola y la longitud del pistilo, es decir, según la morfología floral. Se ha observado que la acumulación del polen se produce principalmente en el estigma y en la zona de la corola accesible para los insectos, pero en la ausencia de insectos cabría preguntarse si el estigma puede atraer electroestáticamente el polen dehiscente de las anteras de la misma flor. En el caso de que las anteras y el estigma tuvieran cargas del mismo signo, se produciría una repulsión y por lo tanto en lugar de la autopolinización se promovería el cruzamiento. Otra cuestión sería si las flores podrían atraer electroestáticamente el polen que cayera de flores situadas en planos superiores.

En resumen, la influencia de la morfología de la flor en la biología reproductiva, y más concretamente en la capacidad de autogamia, no se limita solamente a la distancia de las anteras con relación al estigma, sino que existen otros factores que aun se desconocen. Se conoce que los cuajados obtenidos en ramas embolsadas, e incluso en polinizaciones controladas, varían en el mismo genotipo anualmente por los factores ambientales. En consecuencia, resulta complicado obtener una relación entre la altura del estigma respecto a las anteras y los cuajados obtenidos en ramas embolsadas, debido a que hay una gran cantidad de factores que no se pueden controlar. Además, la obtención de una elevada proporción de cuajados erráticos en ramas embolsadas en familias donde se observan síntomas de consanguinidad, como en muchas descendencias de 'Tuono', pone en duda la adecuación de esta técnica para determinar los individuos autocompatibles en progenies de mejora. Por todo ello, aunque la morfología de la flor pueda tener importancia en la biología floral, la posición del estigma en relación con el plano superior de las anteras no debe considerarse como un aspecto que intervenga directamente en la biología floral, sino más bien como una característica morfológica individual.

En las ramas con flores hipostigmáticas con $PR > 2$ se observaron cuajados muy bajos, a pesar de que su estigma se encuentra inmerso entre las anteras, lo que debería traducirse en mayores cuajados. Una posible explicación es que en estos individuos los pistilos son muy pequeños, característica altamente relacionada con la esterilidad floral en descendientes de 'Tuono' (SOCIAS I COMPANY, 1983). En las ramas con flores epiestigmáticas con $PR < -2$ también disminuye mucho el cuajado, sobre todo cuando $PR < -3$, y en estos casos sí puede añadirse la imposibilidad de contacto de las anteras y el estigma.

7.5 CONCLUSIONES

A pesar de la estrecha base genética de la que proceden los individuos autocompatibles estudiados, se ha observado una gran variabilidad en su morfología floral, tanto en la posición relativa del estilo con relación al plano superior de las anteras como en la longitud de los pistilos.

La mayoría de los individuos estudiados mostraron flores con estigmas comprendidos en el rango entre 2 mm por encima y 2 mm por debajo del plano superior de las anteras, aunque no se puede deducir que estas variaciones sean suficientes para influir en su capacidad autopolinizadora.

La obtención de una elevada proporción de cuajados erráticos en estos embolsados pone de manifiesto la inconveniencia de esta técnica para determinar los individuos autocompatibles en progenies de mejora, debido a los cuajados obtenidos, además de estar influenciados por factores ambientales, también pueden ser causados por factores genéticos relacionados con la consanguinidad.

El cuajado obtenido en las ramas embolsadas es independiente de la posición del estigma en relación con el plano superior de las anteras, ya que los cuajados más elevados se obtuvieron en individuos con estigmas situados 2 mm por encima de las anteras superiores.

**8. EL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS SEGÚN LA
RELACIÓN DE PARENTESCO CON EL ESTILO**

8. EL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS SEGÚN LA RELACIÓN DE PARENTESCO CON EL ESTILO

8.1 INTRODUCCIÓN

Como se ha indicado anteriormente, algunos individuos de las familias estudiadas presentan claros síntomas de consanguinidad. No obstante, bastantes individuos autocompatibles de las familias estudiadas muestran un buen vigor, en muchos casos acompañado por una elevada densidad floral. En estos individuos se podrían realizar los primeros pasos de la selección, según la calidad de su autocompatibilidad y su fecha de floración, necesariamente tardía, para seguir con la evaluación de los otros caracteres agronómicos de interés.

Las plantaciones compuestas por las nuevas variedades autocompatibles deberán ser tan productivas o más que las plantaciones bivarietales tradicionales. Actualmente, las variedades autocompatibles disponibles presentan un genotipo S heterocigótico (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 2002), por lo que en su polinización, sólo la mitad del polen, el de genotipo S_i , tiene la capacidad de llegar con sus tubos polínicos al ovario y fecundar la flor, produciéndose una situación similar a la polinización en parcelas bivarietales semicompatibles. En estas polinizaciones los tubos polínicos compatibles tienen que crecer en estilos en los que se producen también reacciones de incompatibilidad provocadas por los tubos incompatibles. Por el contrario, en los cruzamientos totalmente compatibles no se produce ninguna reacción de incompatibilidad en el interior de los estilos, por lo que el ambiente es diferente al anteriormente descrito. En los cruzamientos "completos", todos los granos de polen tienen la capacidad inicial de llegar a la base del estilo y, por lo tanto, existe teóricamente una mayor probabilidad de fertilización que en las autopolinizaciones de variedades heterocigóticas autocompatibles o en los cruzamientos semicompatibles (ORTEGA *ET AL.*, 2002).

Por otra parte, algunos autores señalan la existencia de selección de polen en el estilo (HORMAZA Y HERRERO, 1994 y 1996b; MULCAHY *ET AL.*, 1996), de manera que un determinado genotipo de polen podría ser favorecido por esta selección en un ambiente determinado, y desfavorecido en otro (COOK *ET AL.*, 1972). Por consiguiente, dependiendo del genotipo de la planta, la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos puede aumentar o disminuir (MARSHALL Y FOLSOM, 1991, PFAHLER, 1967), de manera que también aumentan o disminuyen las posibilidades de transmitir sus genes a la siguiente generación.

Es evidente que el sistema de autoincompatibilidad gametofítica es, por sí mismo, un sistema de selección del polen en el estilo, ya que impide la llegada del propio polen al ovario en individuos autoincompatibles, y permite al polen con diferente genotipo S fecundar el óvulo, con lo

que se evita la aparición de depresión por consanguinidad (KAO Y HUANG, 1994).

En los principales programas de mejora del almendro se están utilizando repetidamente unas pocas variedades como parentales, lo que puede reducir la base genética de la especie en un futuro (KESTER *ET AL.*, 1991). El uso continuo de estas variedades e incluso de sus descendientes como parentales, puede causar la pérdida del vigor híbrido natural en el almendro al disminuir en gran parte la variabilidad genética, provocando como consecuencia la aparición de la depresión por endogamia en futuras generaciones. En el almendro, hasta ahora, sólo se ha descrito una variedad que presente endogamia, 'Ferralise', ya que procede del cruzamiento entre dos variedades hermanas completas, 'Ferraduel' y 'Ferragnès', lo que implica que posee un coeficiente de endogamia (F) igual a 0,250 (LANSARI *ET AL.*, 1994).

El uso continuado de la variedad 'Tuono' y de sus descendientes autocompatibles (SOCIAS I COMPANYY, 2002) como donante del alelo de autocompatibilidad (S_i) en los principales programas de mejora europeos (GRASSELLY Y CROSSA RAYNAUD, 1981; FELIPE Y SOCIAS I COMPANYY, 1987 Y 1997; SOCIAS I COMPANYY Y FELIPE 1999; EGEA *ET AL.*, 2000), es un ejemplo de la posibilidad de disminución de la variabilidad genética en el almendro.

Esta disminución en la base genética puede ocasionar la aparición de consanguinidad, y en algunos casos, tal como se ha visto en el apartado 6, se puede manifestar como una menor velocidad de los tubos polínicos propios respecto a los no relacionados genéticamente.

Por consiguiente, resulta interesante evaluar la eficiencia del crecimiento de los tubos polínicos en el material autocompatible heterocigótico generado en estas familias y que no muestra síntomas visibles de consanguinidad, bajo diferentes regímenes de polinización. El objetivo principal de este capítulo es determinar si en estos individuos los tubos polínicos propios son tan eficientes en su crecimiento hacia el ovario como los procedentes de polinizaciones cruzadas. Además, en diversos estudios realizados anteriormente en el almendro, con variedades autoincompatibles (SOCIAS I COMPANYY, 1982 Y 2001; PIMIENTA Y POLITO, 1983, ETI *ET AL.*, 1994; VEZVAEI, 1997; EGEA *ET AL.*, 2001; CERTAL *ET AL.*, 2002), con variedades autocompatibles (GODINI, 1981; VASILAKAKIS Y PORLINGIS, 1984; SOCIAS I COMPANYY Y FELIPE, 1992; COUSIN Y EL MAATAOUI, 1994; OUKLABI *ET AL.*, 2000; DICENTA *ET AL.*, 2001; SOCIAS I COMPANYY, 2001) y con distintas selecciones de los programas de mejora (SOCIAS I COMPANYY *ET AL.*, 1976; SOCIAS I COMPANYY Y FELIPE, 1987; BEN NJIMA Y SOCIAS I COMPANYY, 1995), se han obtenido resultados dispares.

Para alcanzar este propósito se compara la eficiencia del crecimiento de los tubos polínicos desde diversos puntos de vista. En primer lugar, para determinar si la presencia de reacciones de

autoincompatibilidad en el estilo afecta al crecimiento de los tubos compatibles, se examinó si existen diferencias entre el crecimiento de los tubos polínicos considerando tres grados de parentesco entre el polen y el estilo: la autopolinización, que es el mayor grado de parentesco posible; el cruzamiento semicompatible con 'Cristomorto' o con 'Ai', parentales de 'Ferragnès', según cuál sea el genotipo S de cada individuo; y la polinización por 'Marcona', con la cual no hay parentesco entre el polen y el estilo. En segundo lugar se realizaron comparaciones entre la eficiencia del crecimiento de los tubos polínicos en los pistilos en los que se produce la parada de la mitad de los tubos polínicos por las reacciones de autoincompatibilidad y en los pistilos en los que no se producen estas reacciones, es decir, entre las polinizaciones semicompatibles y las totalmente compatibles.

8.2 MATERIAL Y MÉTODOS

8.2.1 MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

El ensayo se realizó en nueve individuos pertenecientes a las familias estudiadas, en los que no se habían detectado síntomas de consanguinidad, con los cuales se realizaron los tratamientos de polinización en laboratorio que se especifican en el Cuadro 8.1.

Cuadro 8.1 - Individuos estudiados y tratamientos de polinización aplicados.

Designación	Familia	Genotipo S	Tratamiento de polinización			
			⊗	x 'Marcona'	x 'Cristomorto'	x 'Ai'
L-3-22	'Ferralise' x 'Tuono'	S ₁ S _f	X	X	X	-
L-3-63	'Ferralise' x 'Tuono'	S ₃ S _f	X	X	-	X
M-1-86	'Tuono' x 'Ferragnès'	S ₃ S _f	X	X	-	X
M-2-01	'Tuono' x 'Ferragnès'	S ₃ S _f	X	X	-	X
M-2-02	'Tuono' x 'Ferragnès'	S ₃ S _f	X	X	-	X
M-2-16	'Ferragnès' x 'Tuono'	S ₁ S _f	X	X	X	-
M-2-21	'Ferragnès' x 'Tuono'	S ₁ S _f	X	X	X	-
M-2-26	'Ferragnès' x 'Tuono'	S ₁ S _f	X	X	X	-
M-2-36	'Ferragnès' x 'Tuono'	S ₁ S _f	X	X	X	-

En cada uno de los nueve individuos se realizaron tres tratamientos de polinización. El primero fue la autopolinización, que es una polinización semicompatible, pero en la que los tubos polínicos se desarrollan en un entorno con el máximo grado de parentesco posible. El segundo fue el cruzamiento semicompatible con 'Cristomorto' (S₁S₂) o con 'Ai' (S₃S₄) (GRASSELLY ET AL., 1981), según el genotipo S de cada individuo, en el existe un grado de parentesco medio, de manera que en esta polinización hay un alelo de autoincompatibilidad idéntico por descendencia, ya que estas variedades son los parentales de 'Ferragnès', y abuelos de 'Ferralise'. El tercero fue la polinización

de compatibilidad total con polen de la variedad 'Marcona' ($S_{11}S_{12}$) (BOŠKOVIĆ ET AL., 1998), con la que no existe ninguna relación de parentesco, ya que 'Marcona' tiene un origen geográfico alejado del de los progenitores de estas familias.

8.2.2 MÉTODOS

En primer lugar se procedió a la extracción del polen de las variedades 'Marcona', 'Cristomorto' y 'Ai'. Para ello se recogieron en la colección de almendro más de 1000 flores por variedad, justo antes de la antesis, en estado D de FELIPE (1977). Una vez en laboratorio se procedió a la separación de las anteras del resto de la flor. Las anteras se dejaron secar en bandejas etiquetadas de papel durante 48 horas, en cuyo período se produjo la dehiscencia del polen. El polen se conservó en frigorífico, en partes alícuotas, hasta su utilización.

De cada individuo a evaluar se recogieron 180 flores, también en estado D. Seguidamente, en el laboratorio, se emascularon y se colocaron en 3 bloques de 60 flores (Fig. 8.1), uno por cada tratamiento, en bandejas que permiten el contacto del pedúnculo con el agua a través de los orificios de mallas flotantes de plástico. Con la fracción floral retirada en la emasculación se realizó la extracción del polen siguiendo el proceso descrito anteriormente.

A las 48 horas de la emasculación se realizaron los tratamientos de polinización señalados en el Cuadro 8.1. Después de la polinización las bandejas se colocaron en una cámara termoestática a la temperatura de 12°C. Cada 24 horas se recogieron muestras de 10 flores para cada tratamiento, hasta las 96 horas desde la polinización. Los pistilos se fijaron en FAA (5% de formaldehído al 40%, 5% de ácido acético glacial y 90% de etanol al 70%) dentro de frascos de cristal etiquetados y se conservaron a 4°C, hasta su preparación para la observación al microscopio.

Antes del examen microscópico, los pistilos se lavaron 3 veces con agua destilada a intervalos de 1 hora. Después las muestras se colocaron en una solución de sulfito sódico al 5% y se pasaron por autoclave a 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos, para ablandar los tejidos. Las muestras se conservaron en un frigorífico a 4°C hasta su tinción y observación microscópica.

El día anterior a su observación microscópica, se eliminaron los ovarios y la pilosidad de los pistilos mediante una aguja de laboratorio. Los estilos se tiñeron en azul de anilina al 0,1% en fosfato potásico 0,1 N durante toda la noche. Para la observación al microscopio, los estilos se montaron sobre un portaobjetos y se aplastaron con la ayuda de un cubreobjetos.

La observación del crecimiento de los tubos polínicos se realizó mediante microscopía de fluorescencia (LINSKENS Y ESSER, 1957; MARTIN, 1959; KHO Y BAËR, 1968) en un microscopio Leitz

Ortholux II con sistema de luz ultravioleta incorporado, que utiliza como fuente luminosa una lámpara de alta presión de mercurio Osram HBO 200 W/4.



Fig. 8.1. Colocación de las flores emasculadas del individuo M-2-21 en bandejas por bloques de 60 flores.

8.2.3 TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada observación, siguiendo el criterio de LEWIS (1942), se expresó el crecimiento de los tubos polínicos como el porcentaje del estilo recorrido por el tubo polínico más largo. Las mediciones se realizaron mediante la toma de coordenadas en la platina de movimiento en cruz del microscopio. Los cálculos de la longitud del estilo y la longitud del tubo polínico más largo se realizaron a partir de las coordenadas de los puntos correspondientes al comienzo del estigma, al final del estilo y al final del tubo polínico más largo. Con estas medidas se calculó posteriormente el porcentaje de estilo recorrido por el polen. Los cálculos se basaron en ocho de los diez estilos, descartando, para cada individuo y tiempo de muestra, el valor más alto y el más bajo. También se calculó la velocidad media del crecimiento de los tubos polínicos para cada día, en mm por hora, en relación a la longitud media de los tubos polínicos del día anterior.

Se realizó la transformación angular de la porción del estilo atravesada por el tubo polínico más largo, y los resultados se analizaron estadísticamente mediante el cálculo de los análisis de varianza oportunos y la separación de las medias mediante el test de Duncan, en los casos significativos, mediante el programa estadístico SAS v.8 (SAS INSTITUTE, 1989).

8.3 RESULTADOS

8.3.1 INFLUENCIA DEL TIPO DE POLINIZACIÓN SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS

Los análisis de varianza realizados (Anejo IV) indican que el crecimiento de los tubos polínicos varía en función del pistilo en el que crecen y de los distintos tipos de polinización. Se obtuvieron resultados similares al realizar los análisis al separar los individuos en función de su genotipo S.

Si no se consideran las diferencias entre los individuos, se puede obtener una evolución global de los tubos polínicos según cada tratamiento de polinización aplicado (Fig. 8.2; Cuadro 8.2), así como la separación de las medias entre los distintos tratamientos mediante el test de Duncan ($\alpha=0,05$).

A la temperatura del estudio (12°C), a las 24 horas de la polinización los tubos polínicos han atravesado aproximadamente el 30% del estilo, alcanzando unos 4 mm (Fig. 8.2), a una velocidad media de 0,166 mm/h (Cuadro 8.2). En la Fig. 8.2 se observa como los tubos polínicos procedentes de la autopolinización y de 'Marcona' atraviesan una porción mayor del estilo que los tubos del cruzamiento semicompatible.

En los individuos con genotipo S_7S_7 se observa un mayor crecimiento de los tubos polínicos de 'Marcona' en relación a los de la autopolinización, que su vez muestran un mayor crecimiento que los de 'Cristomorto'. Sin embargo, ni la longitud de los tubos polínicos ni la velocidad media de crecimiento durante las primeras 24 horas (Fig. 8.2 y Cuadro 8.2) de la autopolinización, se pueden diferenciar de las de los otros dos tipos de polinización.

En los individuos con genotipo S_3S_7 los tubos polínicos de los diferentes tratamientos de polinización recorren una porción similar del estilo, pero la longitud y la velocidad de los tubos polínicos de la variedad 'Ai', fueron menores a las de los otros tratamientos.

A las 48 horas de la polinización, los tubos polínicos han atravesado aproximadamente el 60% del estilo, alcanzando los 7,6 mm de longitud, a una velocidad media durante el segundo día de 0,148 mm/h. La porción del estilo atravesada por los tubos polínicos procedentes de la autopolinización es superior a la atravesada por el polen de los cruzamientos semicompatibles, mientras que el crecimiento del polen de 'Marcona' no puede diferenciarse estadísticamente del de las otras dos polinizaciones, aunque la longitud de los tubos de 'Marcona' fue superior a los procedentes de los cruzamientos semicompatibles.

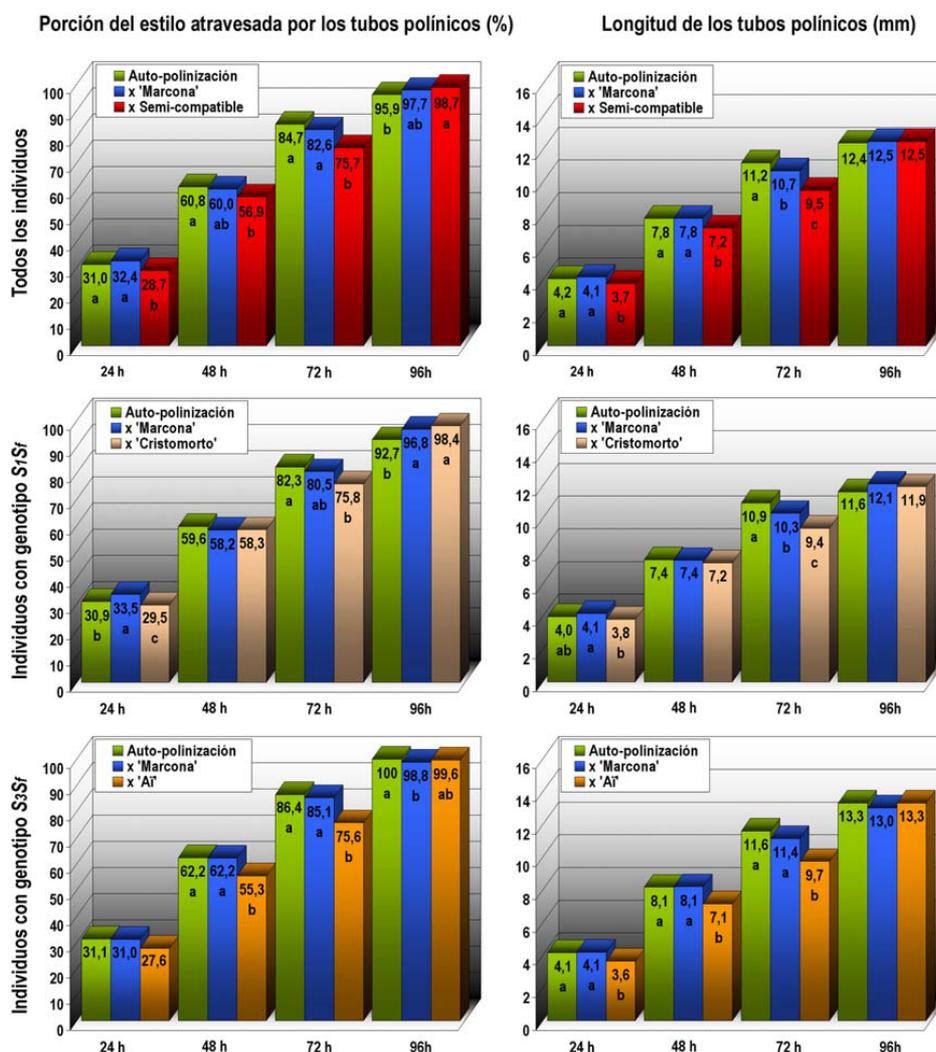


Fig. 8.2. Evolución del crecimiento de los tubos polínicos según el tipo de polinización (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha = 0,05$).

En los individuos de genotipo S_1S_f el crecimiento de los tubos polínicos se igualó entre los tratamientos, de manera que no se encontraron diferencias significativas entre los tipos de polinización. Sin embargo, en el conjunto de individuos S_3S_f los tubos polínicos de 'Ai' mostraron un crecimiento inferior a las de las otras dos polinizaciones.

A las 72 horas de la polinización, los tubos polínicos han recorrido aproximadamente el 81% del estilo alcanzando los 10,5mm de longitud, mostrando una velocidad media de crecimiento durante el tercer día de 0,12 mm/h. En el análisis conjunto se observó que los tubos polínicos

procedentes de la autopolinización y de 'Marcona' atravesaron porciones similares del estilo, mientras que los de los cruzamientos semicompatibles mostraron un crecimiento inferior.

En los individuos de genotipo S_1S_1 , los tubos polínicos procedentes de la autopolinización atraviesan una porción del estilo superior a los de 'Cristomorto', mientras que los de 'Marcona' atraviesan una porción similar a la de los otros dos tratamientos.

En los individuos de genotipo S_3S_1 , los tubos polínicos de las tres polinizaciones recorren una porción del estilo similar, a pesar de que las longitudes de los tubos procedentes de la autopolinización y de 'Marcona' son superiores a los de 'Ai'. Durante el tercer día, los tubos polínicos de los tres tratamientos de polinización crecieron a una velocidad similar (Cuadro 8.2).

Los resultados del crecimiento de los tubos polínicos a las 96 horas desde la polinización pueden resultar confusos si no se tienen en cuenta algunas consideraciones. En las condiciones del ensayo, los tubos polínicos llegan a la base del estilo en la mayoría de los pistilos durante el cuarto día de crecimiento. Debido a que el crecimiento de los tubos polínicos se midió en función de la porción del estilo recorrida por el tubo polínico más largo, el valor máximo es el 100% de la longitud del estilo, y la longitud máxima del tubo polínico estará en función de la longitud media del estilo de cada individuo. Así, en los pistilos en los que el crecimiento de los tubos polínicos ha superado la base del estilo, las medidas de la longitud del tubo polínico serán menores a las reales, obteniéndose unas velocidades para el período de 72 a 96 horas menores también a las reales.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se puede indicar que a las 96 horas de la polinización los tubos polínicos han atravesado el 97,5% del estilo, siendo su longitud de unos 12,4 mm y la velocidad de crecimiento relativa durante el cuarto día de 0,08 mm/h. En el análisis conjunto de todos los individuos, los tubos polínicos procedentes de los cruzamientos semicompatibles (98,7% del estilo) mostraron un crecimiento mayor que los de la autopolinización (95,9% del estilo), mientras que los de 'Marcona' (97,7%) no se pudieron diferenciar estadísticamente de los otros dos tratamientos. La escasa diferencia en el crecimiento del polen de los tres tratamientos se manifestó en una ausencia de diferencias significativas en sus longitudes, tanto en el análisis conjunto de todos los individuos como en los análisis que separan los individuos por su genotipo S. La velocidad calculada para las últimas 24 horas no es una velocidad real, ya que está influida por la porción de estilo que quedaba por recorrer al finalizar el tercer día a los tubos polínicos para llegar a la base. Debido a ello, no se realiza ninguna consideración sobre las velocidades registradas.

En los individuos S_1S_1 , los tubos polínicos de 'Cristomorto' y de 'Marcona' atraviesan una porción similar del estilo, siendo la de los tubos procedentes de la autopolinización menor.

Cuadro 8.2 Velocidad media de los tubos polínicos en cada período para los distintos tratamientos de polinización (mm/h).

Tipo de polinización	Individuos en conjunto				Media según polinización
	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	
Autopolinización	0,169 a	0,154	0,142 a	0,047 c	0,128
x 'Marcona'	0,174 a	0,149	0,121 b	0,078 b	0,131
x semicompatible	0,156 b	0,144	0,097 c	0,125 a	0,131
Media	0,166	0,148	0,119	0,083	0,130
Tipo de polinización	Individuos S ₇ S _r				Media según polinización
	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	
Autopolinización	0,166 ab	0,144	0,141 a	0,028 c	0,120
x 'Marcona'	0,174 a	0,134	0,119 a	0,074 b	0,125
x 'Cristomorto'	0,160 b	0,143	0,088 b	0,105 a	0,124
Media	0,167	0,140	0,116	0,069	0,123
Tipo de polinización	Individuos S ₃ S _r				Media según polinización
	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	
Autopolinización	0,173 a	0,166	0,143 a	0,071 b	0,138
x 'Marcona'	0,174 a	0,167	0,122 ab	0,083 b	0,137
x 'Ai'	0,151 b	0,146	0,107 b	0,149 a	0,138
Media	0,166	0,159	0,124	0,101	0,138

En los individuos S₃S_r, la porción del estilo atravesada por los tubos polínicos procedentes de la autopolinización es del 100%, debido a que en todos los pistilos autopolinizados de los individuos S₃S_r se produjo la llegada a la base del estilo de tubos polínicos. Los tubos de 'Marcona' recorren estadísticamente una porción inferior a la recorrida por los tubos de la autopolinización. La porción del estilo atravesada por los tubos de 'Ai' es estadísticamente similar a la de las otras dos polinizaciones.

En resumen se observa que, en el conjunto de los análisis, la longitud y la porción de estilo que atraviesan los tubos polínicos procedentes de la autopolinización y de 'Marcona' suelen ser estadísticamente similares para los tres primeros días, mientras que para los tubos polínicos de los cruzamientos semicompatibles suelen ser ligeramente inferiores. Al finalizar el cuarto día, disminuyen las diferencias entre las distintas polinizaciones, hasta tal punto que las longitudes de los tubos polínicos en las diferentes polinizaciones son similares. Sin embargo, la porción de estilo atravesada por los tubos polínicos de la autopolinización es menor a la del conjunto de los cruzamientos semicompatibles, siendo similares en los individuos con genotipo S₃S_r.

En cuanto a la velocidad de los tubos polínicos, se observa que en las tres polinizaciones la velocidad va disminuyendo ligeramente con el tiempo. La velocidad en la autopolinización es similar a la de los tubos de 'Marcona' en los dos primeros días, pero superior en el tercero. Durante el

segundo día la velocidad de los tubos en los diferentes tipos de polinización es similar. Durante el tercer día, los tubos que mayor velocidad mostraron fueron los de la autopolinización y los que menor los de los cruzamientos semicompatibles. Los valores calculados para el cuarto día no son indicativos de la velocidad, ya que no comprenden el crecimiento de los tubos polínicos por debajo de la base del estilo.

8.3.2 VARIABILIDAD DEL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS ENTRE LOS INDIVIDUOS.

En este apartado se analiza la evolución general de los tubos polínicos para el conjunto de los individuos estudiados. Para ello se realizó el análisis de varianza para cada día, tomando como única fuente de variación los individuos. De esta manera se evaluó el crecimiento de los tubos polínicos sin hacer distinciones entre los tratamientos de polinización, habida cuenta de la pequeña variabilidad observada entre ellos.

Así, al cabo de 24 horas desde la polinización, la longitud de los tubos polínicos presenta un estrecho rango de magnitudes, de 3,5 a 4,5 mm, lo que supone atravesar del 29 al 36% del estilo. La velocidad media de crecimiento durante este período fue de 0,14 a 0,16 mm/h (Cuadro 8.3).

A las 48 horas se observó una mayor amplitud en el rango de longitudes de los tubos polínicos, con una variación de las medias de 6,9 a 8,5 mm, llegando a atravesar del 53,4 al 62,9% del estilo. En el conjunto de los individuos, los tubos polínicos crecieron a menor velocidad (0,148mm/h) durante el segundo día de crecimiento en relación a la velocidad del primer día (0,166mm).

Al concluir el tercer día, las longitudes medias de los tubos polínicos variaron de 6,9 a 11,9 mm, recorriendo del 72,8 al 89,6% del estilo. En algunos individuos se observó la llegada de tubos polínicos a la base del estilo, destacando la llegada de tubos en 9 de los 24 pistilos de 'M-2-02' y en 6 de los 24 de 'M-2-36' (Cuadro 8.4). También se observó que la velocidad media de crecimiento de los tubos polínicos durante el tercer día (0,119mm/h) fue inferior a la del día anterior. En general, esta velocidad decreció en todos los individuos.

Al término de 96 horas desde la polinización, se pueden distinguir tres grupos de individuos según el crecimiento de los tubos polínicos. En el primero la mayoría de los pistilos presentaron la penetración ovárica por los tubos polínicos, con la llegada de tubos la base del estilo en todos los pistilos de 'M-1-86', 'M-2-02' y 'M-2-16' y en más del 98% de los pistilos de 'L-3-22', 'L-3-63', 'M-2-01' y 'M-2-36'. La planta 'M-2-21' presentó un porcentaje intermedio del estilo atravesado por los tubos polínicos (94,2%) y el menor fue en 'M-2-26' con sólo un 88,1%.

Cuadro 8.3 Velocidad media de los tubos polínicos en cada individuo para cada período (mm/h).

Individuo	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	Media
L-3-22	0,157 c	0,130 c	0,121 ab	0,094 b	0,126
L-3-63	0,149 c	0,157 abc	0,119 ab	0,131 a	0,139
M-1-86	0,186 ab	0,167 ab	0,115 ab	0,070 bc	0,135
M-2-01	0,162 c	0,181 a	0,153 a	0,105 ab	0,150
M-2-02	0,168 bc	0,133 c	0,109 b	0,098 ab	0,127
M-2-16	0,189 a	0,150 abc	0,093 b	0,074 bc	0,127
M-2-21	0,170 bc	0,138 bc	0,112 b	0,072 bc	0,123
M-2-26	0,161 c	0,128 c	0,126 ab	0,055 dc	0,118
M-2-36	0,157 c	0,155 abc	0,128 ab	0,051d	0,123
Media	0,166	0,148	0,119	0,083	0,130
Media individuos S ₁ S _r	0,167	0,140	0,116	0,069	0,123
Media individuos S ₃ S _r	0,166	0,159	0,124	0,101	0,138

8.3.3 COMPARACIÓN ENTRE INDIVIDUOS DENTRO DE CADA TIPO DE POLINIZACIÓN

En este apartado se comparó el comportamiento del crecimiento de los tubos polínicos entre los distintos individuos para cada tipo de polinización, de manera que se realizaron los análisis de varianza para cada intervalo de recogida de muestras. En los análisis significativos se realizó la separación de medias del crecimiento mediante el test de Duncan ($\alpha=0,05$). Con el fin de evitar redundancias, se indican solamente las diferencias relevantes observadas al cuarto día de crecimiento para los distintos tipos de polinización, incluyendo las diferencias de las medias obtenidas en las Fig. IV.2 y IV.3 del Anejo IV.

CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS DESPUÉS DE LA AUTOPOLINIZACIÓN

En todos los pistilos de 'L-3-22', 'L-3-63', 'M-1-86', 'M-2-01', 'M-2-02' y 'M-2-16' se produjo la llegada de tubos polínicos a la base del estilo al cuarto día de la polinización (Cuadro 8.4), lo que implica que las diferencias observadas entre las longitudes de los tubos polínicos se deben a las diferencias en las longitudes de sus estilos (Fig.IV.3). Los tubos polínicos procedentes de la autopolinización de 'M-2-21' y 'M-2-26' no habían llegado aun a la base del estilo a las 96 horas después de la polinización, habiendo recorrido el 87,2 y 79% del estilo.

CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS DE 'MARCONA'

Al término de 96 horas se había producido la llegada de los tubos polínicos de 'Marcona' a la base del estilo en todos los pistilos de los individuos 'L-3-22', 'M-1-86', 'M-2-02' y 'M-2-16' (Cuadro 8.4 y Fig. IV.2). El crecimiento observado en 'L-3-63', 'M-2-01' y 'M-2-36' no se puede diferenciar estadísticamente del producido en los individuos con llegada total a la base del estilo. En 'M-2-21' y

'M-2-26', los tubos polínicos mostraron un menor crecimiento debido a que sólo en la mitad de los pistilos se produjo la llegada de tubos a la base del estilo (Cuadro 8.4).

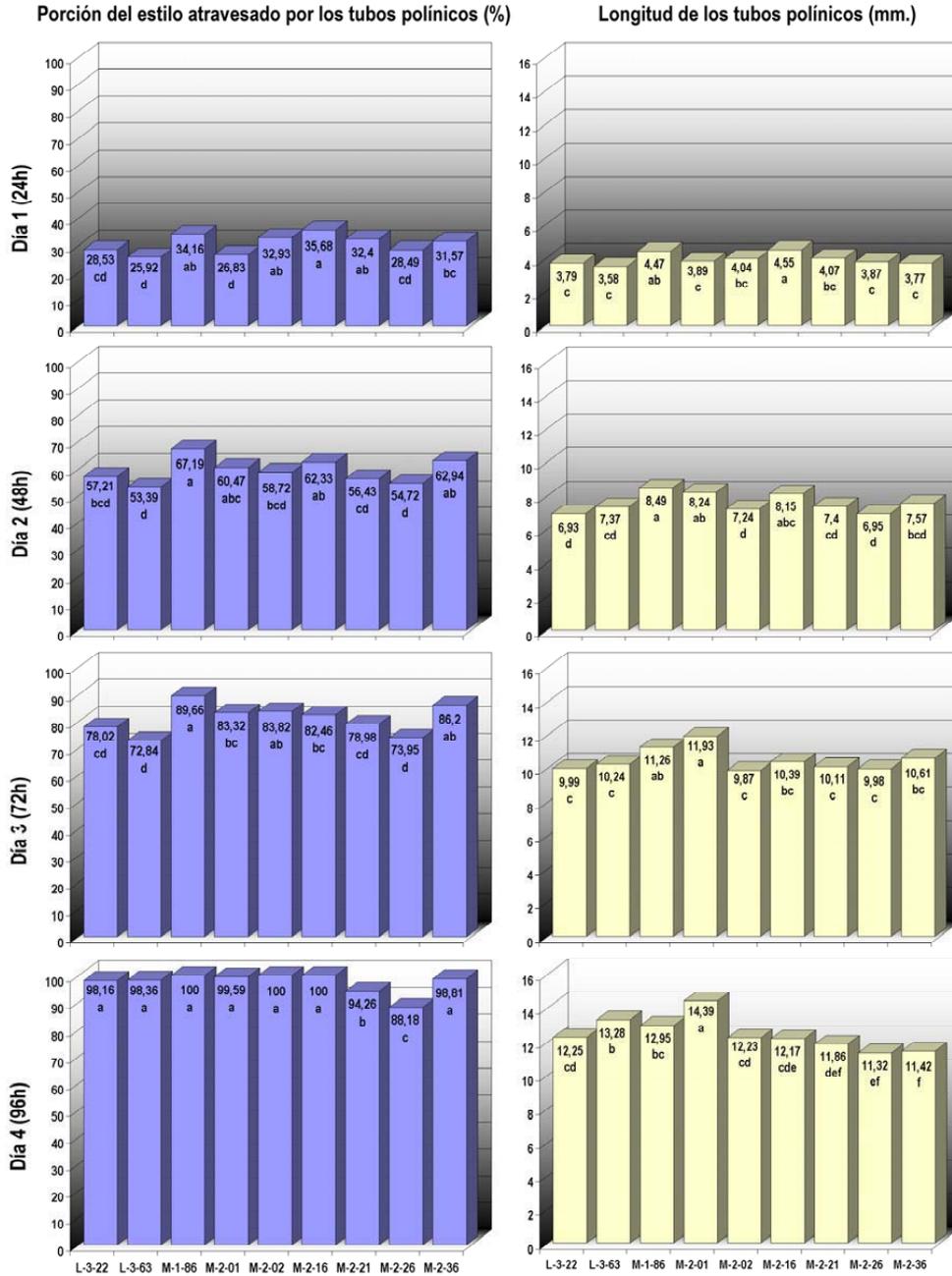


Fig. 8.3 Evolución del crecimiento de los tubos polínicos según el individuo (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha=0,05$).

CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS DE 'Ai' EN LOS INDIVIDUOS CON GENOTIPO S_3S_f

Los tubos polínicos de 'Ai' llegaron de forma generalizada a la base del estilo al acabar los intervalos de muestreo (Cuadro 8.4), de manera que no se encontraron diferencias entre los individuos S_3S_f para la porción de estilo atravesada. En este momento, las diferencias observadas en la longitud de los tubos polínicos se debieron a la mayor longitud de los estilos de 'M-2-01'. Los tubos polínicos de 'Ai' aumentaron su velocidad relativa durante el último día.

CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS DE 'CRISTOMORTO' EN LOS INDIVIDUOS CON GENOTIPO S_1S_f

Al finalizar el ensayo, los tubos polínicos de 'Cristomorto' habían llegado a la base del estilo en todos los pistilos de 'M-2-16', 'M-2-21' y 'M-2-36'. En 'L-2-33' y 'M-2-26' se observó un crecimiento ligeramente inferior, si bien el porcentaje medio de estilo atravesado fue en torno al 95. Las diferencias en longitud de los tubos polínicos se deben principalmente a las diferencias entre las longitudes de los estilos de los diferentes genotipos. Los tubos polínicos de 'Cristomorto' también aumentaron la velocidad durante el cuarto día, sobre todo en 'L-3-22', 'M-2-16' y 'M-2-21'.

Cuadro 8.4. Pistilos con tubos polínicos en la base del estilo en los distintos individuos según el tipo de polinización. (Cantidades sobre ocho observaciones realizadas)

Tratamiento Tiempo Individuo	Autopolinización		x 'Marcona'		x Semicompatible		Media (%)	
	72 h	96 h	72 h	96 h	72 h	96 h	72 h	96 h
L-3-22 (S_1S_f)	1	8	0	8	0	5	4,1	87,5
L-3-63 (S_3S_f)	0	8	0	5	0	7	0,0	83,3
M-1-86 (S_3S_f)	1	8	2	8	1	8	16,6	100,0
M-2-01 (S_3S_f)	0	8	0	7	0	8	0,0	95,8
M-2-02 (S_3S_f)	4	8	4	8	1	8	37,5	100,0
M-2-16 (S_1S_f)	0	8	1	8	0	8	4,1	100,0
M-2-21 (S_1S_f)	0	0	0	5	1	8	4,1	54,1
M-2-26 (S_1S_f)	0	1	0	4	2	6	8,3	45,8
M-2-36 (S_1S_f)	2	6	2	7	2	8	25,0	87,5
Media (%)	11,1	76,3	12,5	83,3	9,7	91,6	11,1	83,8

8.3.4 ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS EN CADA INDIVIDUO

En este apartado se analiza el comportamiento de cada tipo de polen. Para ello se realizaron los análisis de varianza considerando como única fuente de variación los diferentes tipos de polinización. Al igual que en todos los análisis anteriores, se realizó la separación de medias en los análisis que fueron significativos mediante el test de Duncan ($\alpha=0,05$). Sólo se discuten las diferencias observadas al finalizar los muestreos, incluyendo los datos de los días anteriores en las Fig.IV.4, IV.5 y IV.6 del Anejo IV.

En las plantas de genotipo S_1S_1 ('L-3-22', 'M-2-16', 'M-2-21', 'M-2-26' y 'M-2-36') se observaron variaciones en el crecimiento de los tubos polínicos procedentes de los diferentes tipos de polinización, como reflejan los cruces de las líneas que representan su crecimiento en las Fig. IV.4, IV.5 y IV.6. Al finalizar los muestreos, los tubos polínicos de 'Cristomorto' en el genotipo 'L-3-22' mostraron un crecimiento inferior en relación a los de su autopolinización o de 'Marcona'. En los genotipos 'M-2-21' y 'M-2-26', los tubos polínicos de 'Cristomorto' y de 'Marcona' mostraron un crecimiento superior a los procedentes de su autopolinización. En los genotipos 'M-2-16' y 'M-2-36' no se observaron diferencias significativas entre tratamientos al cuarto día.

En los individuos de genotipo S_3S_1 ('L-3-63', 'M-1-86', 'M-2-01' y 'M-2-02') también se observaron variaciones en el crecimiento de los tubos polínicos de los distintos tratamientos, aunque al igual que en los genotipos S_1S_1 no siguen ningún patrón determinado. Al acabar los muestreos (96 horas), no se pudo diferenciar el crecimiento de los tubos polínicos de los distintos tratamientos, llegando en su gran mayoría a la base del estilo. Al observar la evolución del crecimiento resulta evidente que el de los tubos polínicos procedentes de la autopolinización es similar al del cruzamiento completamente compatible con 'Marcona'. El crecimiento de los tubos polínicos de 'Aī' fue en algunos momentos inferior al de los otros dos tratamientos en 'L-3-63' y 'M-2-02', si bien, también llegan a la base del estilo a las 96 horas.

8.4 DISCUSIÓN

8.4.1 INFLUENCIA DEL GRADO DE PARENTESCO EN LA EFICIENCIA DE LA POLINIZACIÓN

Los individuos estudiados se eligieron porque no presentaban síntomas de consanguinidad entre las diferentes familias estudiadas. En estos individuos, la evolución en el estilo del crecimiento de los tubos polínicos propios (autopolinización) fue similar a la de los tubos procedentes de genotipos no relacionados genéticamente con ellos (polinización por 'Marcona'). Sin embargo, el crecimiento de los tubos procedentes de genotipos relacionados genéticamente con estos individuos (polinizaciones semicompatibles con 'Cristomorto' o con 'Aī'), fue generalmente más lento durante los tres primeros días de crecimiento, mientras que a las 96 horas la longitud media de sus tubos polínicos fue similar a la de los otros tipos de polinización, e incluso superaron el porcentaje de estilo atravesado por los tubos polínicos procedentes de la autopolinización.

La primera evaluación de la cinética del crecimiento de los tubos polínicos de almendro se realizó en retrocruzamientos de híbridos autocompatibles de melocotonero x almendro (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1976), encontrando que a diferentes temperaturas los tubos polínicos de 'Ne Plus Ultra' crecían generalmente a mayor velocidad en los estilos de estos híbridos que los procedentes

de su autopolinización. Estos resultados no son comparables con los presentados en este trabajo, ya que en estas selecciones híbridas se evaluaba la autocompatibilidad adquirida desde el melocotonero, y como indican los autores "aun cuando los loci S sean alélicos en las dos especies, pueden ocurrir variaciones en la compatibilidad debido al diferente entorno genético resultante del cambio del alelo S_i de una especie a otra" (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1976).

GODINI (1981) indicó la posibilidad que el parentesco entre el polen y estilo pudiera afectar a la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos, debido a la observación que los tubos polínicos procedentes de las autopolinizaciones de las variedades autocompatibles 'Filippo Ceo' (S_1S_1) y 'Genco' (S_1S_1) crecían con más lentitud que los procedentes del cruzamiento de estas variedades con 'Tuono' (S_1S_1). Estos resultados contrastan con los obtenidos en este trabajo, si bien hay que indicar que GODINI (1981) estudió tres variedades autocompatibles con igual genotipo S, procedentes todas de la región italiana de la Apulia. En este trabajo, al igual que en SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1992) y OUKABLI ET AL. (2000), la variedad utilizada para realizar los cruzamientos fue 'Marcona' ($S_{11}S_{12}$), que además de no compartir ningún alelo S con las plantas estudiadas, procede de una región (el Levante español) diferente al de los antecesores de los individuos evaluados, ya que 'Tuono' y 'Cristomorto' proceden de Italia y Ai¹ de Francia. Por lo tanto, en las polinizaciones realizadas con 'Marcona' no existen relaciones de parentesco entre el polen y el estilo, hecho más que probable en los cruzamientos realizados con 'Tuono' y las variedades estudiadas por GODINI (1981).

La velocidad de los tubos polínicos va disminuyendo a medida que descienden hacia el ovario y está directamente relacionada con la temperatura ambiental, mostrando como todo proceso biológico unos umbrales a partir de los cuales, la velocidad disminuye drásticamente o se inhibe el crecimiento de los tubos polínicos (SOCIAS I COMPANY ET AL., 1976; VASILAKAKIS Y PORLINGIS, 1984).

VASILAKAKIS Y PORLINGIS (1984) estudiaron la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos en la variedad autocompatible 'Truoito' (S_1S_1) tras su autopolinización y su cruzamiento con 'Texas' (S_1S_5) (BOŠKOVIĆ ET AL., 1997) bajo diferentes regímenes de temperatura. Los tubos polínicos procedentes de la autopolinización crecieron de forma similar que los procedentes de 'Texas' a temperaturas de 10, 15, 20 y 25 °C. A 30°C, los tubos polínicos de la autopolinización presentaron una inhibición en su crecimiento, mientras que los tubos polínicos de 'Texas' llegaron a la base del estilo a las 54 horas de la polinización. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo (12°C) y los obtenidos por SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1992), quienes observaron que el crecimiento de los tubos polínicos después de la autopolinización de la variedad autocompatible 'Guara' (S_1S_1) y de su polinización con 'Marcona' fue similar a 15 y a 20°C.

En la observación microscópica de los tubos polínicos no se advirtieron síntomas de incompatibilidad en las autopolinizaciones, como a veces se han indicado, con terminaciones de los tubos polínicos engrosadas o con superficie rugosa, sino un aspecto similar al que se observó en los tubos de 'Marcona'. Esta ausencia de síntomas de incompatibilidad en las autopolinizaciones de diferentes variedades autocompatibles también ha sido observada por GODINI (1981), VASILAKAKIS Y PORLINGIS (1984), SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1992), GODINI *ET AL.* (1994), OUKABLI *ET AL.* (2000) y SOCIAS I COMPANY Y ALONSO (2004).

En el conjunto de plantas evaluadas, el crecimiento de los tubos polínicos de los antecesores (cruzamientos semicompatibles con 'Cristomorto' y 'Ai') mostró un ligero retraso durante los tres primeros días en relación a los otros dos tipos de polen, siendo este comportamiento generalmente idéntico para las plantas con genotipos S_1S_f o S_3S_f . Sin embargo, a las 96 horas de crecimiento, la porción del estilo atravesada varió según el genotipo S de las plantas, mostrándose en las plantas S_1S_f un mejor crecimiento del polen foráneo, mientras que en los individuos S_3S_f fue mejor el del polen propio. Este comportamiento fue debido al retraso que se produjo en la llegada de los tubos polínicos propios a la base del estilo en las plantas 'M-2-21' y 'M-2-26', ambas con genotipo S_1S_f , lo que se produjo mayoritariamente a las 120 horas de la polinización.

La similitud observada en el momento de la llegada de los tubos polínicos y en su longitud en los tres tratamientos de polinización contradice en cierto modo los trabajos de ORTEGA *ET AL.* (2002) y CERTAL *ET AL.* (2002). En éstos se sugiere que en las polinizaciones cruzadas en las que no se comparte ningún alelo de incompatibilidad existe una mayor probabilidad de fertilización que en las polinizaciones semicompatibles, incluida la autopolinización de variedades autocompatibles heterocigóticas. La explicación dada por estos autores es que en la polinización cruzada el 100% de los granos de polen tienen la capacidad de llegar a la base del estilo, mientras que en las polinizaciones semicompatibles sólo el 50% de los granos de polen tienen la capacidad de llegar a la base del estilo. Si fuera así, en las polinizaciones completamente compatibles se produciría una teórica mayor cantidad de tubos polínicos en la parte inferior de los estilos. Sin embargo, estos mismos autores no encontraron un número de tubos polínicos en la proporción esperada, mientras que SOCIAS I COMPANY Y ALONSO (2004) encontraron que la eficiencia en la polinización es independiente de que ésta sea completamente compatible o sólo semicompatible, ya que observaron una cantidad similar de tubos polínicos en la base del estilo después de los dos tipos de polinización, lo que podría explicarse por el efecto regulador ejercido por la cantidad de reservas en el estilo y por la competencia entre los tubos polínicos por el espacio en el tejido transmisor

(HORMAZA Y HERRERO, 1996a).

8.4.2 LA INFLUENCIA DE LOS GENOTIPOS EN EL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS

El crecimiento de los tubos polínicos varía según el genotipo estudiado, tal como observaron BEN NJIMA Y SOCIAS I COMPANY (1995). Estas variaciones no son consistentes en el transcurso de este crecimiento a lo largo de los días. En algunos genotipos se observó un buen crecimiento inicial, superando el 30 % del estilo en los pistilos de 'M-2-16', 'M-1-86', 'M-2-2', 'M-2-21' y 'M-2-36', a pesar de que en 'Tuono', OUKABLI ET AL. (2000), observaron un crecimiento menor del 10%. La explicación más factible es la diferencia en el momento en el que se realiza la polinización, ya que OUKABLI ET AL. (2000) la realizaron a las 24 horas, cuando los estigmas pueden presentar una menor secreción y encontrarse menos receptivos. A las 48 y 72 horas de crecimiento destacaron los tubos polínicos en 'M-1-86' y 'M-2-36', mientras que los menores crecimientos se produjeron en 'L-3-63'. Las diferencias de crecimiento que se observaron a las 72 horas desaparecieron a las 96 horas, excepto para dos selecciones, 'M-2-21' y 'M-2-26', que mostraron un retraso en el crecimiento de los tubos polínicos propios y de 'Marcona', mientras que los tubos polínicos de 'Cristomorto' mostraron una longitud similar a la del resto de genotipos S_1S_2 . Quizás en estos individuos, el descenso de la temperatura influya negativamente en el crecimiento de los tubos polínicos, en relación a las condiciones térmicas de la determinación fenotípica de la autocompatibilidad (Apartado 3), donde se observó una adecuada llegada de los tubos polínicos en la base del estilo. Quizás estos individuos se comporten como genotipos parcialmente autoincompatibles en condiciones de campo, que se caracterizan por presentar un nivel muy bajo de cuajado (GRASSELLY ET AL., 1981) y por la llegada después de la autopolinización de un sólo tubo polínico a la base de unos pocos estilos (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1988), lo que se considera insuficiente para producir cosechas comerciales en plantaciones monovarietales, (SOCIAS I COMPANY, 1990).

De igual manera, tampoco se observó un comportamiento consistente a lo largo del tiempo en el crecimiento de los tubos polínicos. Ello se manifiesta en los cambios bruscos de la velocidad media diaria registrada para los diversos tratamientos en los diferentes individuos, como reflejan los cambios bruscos de pendiente observados en las gráficas que muestran el crecimiento por genotipo de los diferentes individuos (Fig. IV.4, IV.5 y IV.6 y Cuadro IV.2).

A pesar de ello se puede indicar que los tubos polínicos de la autopolinización de 'L-3-22', 'M-1-86', 'M-2-02' y 'M-2-36', mostraron un crecimiento lineal durante los tres primeros días, lo que les lleva a atravesar en torno al 90% del estilo en este período de tiempo. En 'L-3-63' y 'M-2-01', el

crecimiento inicial del polen propio fue más lento, pero al acabar el estudio se había producido la llegada de tubos polínicos a la base de todos los estilos. En 'M-2-21', a pesar de mostrar un crecimiento normal del polen propio durante los tres primeros días, hubo una disminución brusca de su velocidad en el cuarto inferior del estilo.

Los tubos polínicos de 'Marcona' crecieron de forma lineal en los genotipos 'L-3-22', 'L-3-63', 'M-2-02' y 'M-2-36'. En 'M-1-86' se produjo un crecimiento inicial menor, pero mostró elevadas tasas de crecimiento en los días posteriores, produciéndose la situación inversa en 'M-2-16'. En 'M-2-21' los tubos de 'Marcona' disminuyeron su tasa de crecimiento durante el segundo día, mientras que 'M-2-26' este descenso se produjo al segundo día.

Los tubos polínicos de 'Cristomorto' crecieron linealmente en 'L-3-22', 'M-2-21' y 'M-2-36', mientras que sufrieron un descenso en la velocidad al tercer día en 'M-2-16' y 'M-2-26'. De igual forma, los tubos de 'Aï' crecieron linealmente en 'L-3-63', 'M-2-01' y 'M-2-02', mientras que se produjo un descenso en 'M-1-86' al tercer día.

En las condiciones de este trabajo, los tubos polínicos alcanzaron mayoritariamente la base del estilo a las 96 horas de la polinización, sin embargo, SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1987), en las mismas condiciones de temperatura, indicaron como en la selección 'C-9-5' ('Aylés'), procedente de la polinización libre de 'Tuono', tanto en su autopolinización como en su polinización por 'A-10-8', se produjo la llegada de los tubos polínicos a la base del estilo a las 72 horas en todos los pistilos observados.

Esta diferencia de comportamiento respecto a nuestros resultados, podría ser debida a factores genéticos, como una longitud pequeña del estilo. Sin embargo, no se ha podido relacionar las diferencias entre individuos en las tasas de crecimiento en porcentaje del estilo recorrido por el tubo polínico más largo con la longitud del estilo. De hecho, SOCIAS I COMPANY (1987) encontró que estas tasas de crecimiento eran similares en tres variedades de almendro, a pesar de presentar pistilos de longitudes significativamente distintas, lo que implica que la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos puede estar relacionada con la longitud del estilo.

Las variaciones observadas respecto a 'C-9-5' ('Aylés') (SOCIAS I COMPANY Y FELIPE, 1987), podrían haber sido causadas por variaciones ambientales durante el ensayo, así como las condiciones atmosféricas previas a la recogida de yemas, o por razones fisiológicas, como pueden ser, la cantidad de reservas energéticas acumuladas en las yemas de flor (RODRIGO Y HERRERO, 1998), o la cantidad de glicoproteínas TTS ("Transmitting tissue-specific") sintetizadas en el estilo (CHEUNG ET AL., 1995), necesarias para la estructura de los tubos polínicos durante su elongación.

Este crecimiento irregular de los tubos polínicos en función del tiempo puede deberse al hecho de considerar exclusivamente en las mediciones el crecimiento del tubo polínico más largo, y no el conjunto del crecimiento, ya que a medida que se desciende por el estilo desde el estigma disminuye el número de tubos polínicos presentes (HERRERO Y DICKINSON, 1980), y en algún caso se encuentra un solo tubo polínico que crece mucho más que los otros, pudiendo hacer cambiar el valor de la media del tratamiento. La heterogeneidad en las inflexiones de las tasas de crecimiento de los diferentes tipos de polinización en los diferentes genotipos hace difícil ligar este proceso a la transición de la nutrición autótrofa a la heterótrofa sufrida por los tubos polínicos durante su crecimiento (HERRERO Y DICKINSON, 1980).

8.5 CONCLUSIONES

En general, la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos en las autopolinizaciones muestra claramente la presencia de autocompatibilidad genética en los genotipos estudiados, ya que los tubos polínicos propios tienen la misma eficiencia en la polinización que los ajenos.

Los tres grados de parentesco evaluados (autopolinización, cruzamiento semicompatible con un antecesor, y polinización completamente compatible sin parentesco) mostraron similar longitud de tubos polínicos a las 96 horas, produciéndose la llegada de los tubos polínicos a la base de los estilos en la amplia mayoría de los pistilos observados.

Por consiguiente, los individuos autocompatibles descendientes de 'Tuono' que no muestren síntomas de consanguinidad pueden ser seleccionados para ser evaluados en posteriores fases del proceso de mejora, y incluso ser utilizados como donantes de la autocompatibilidad, diversificando de esta manera las fuentes de la autocompatibilidad y eliminando caracteres indeseables presentes en la variedad 'Tuono'.

9. DISCUSIÓN GENERAL

9. DISCUSION GENERAL

9.1 EL FENOTIPO DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD

El análisis del crecimiento de los tubos polínicos, tras la autopolinización manual de los individuos de las poblaciones estudiadas, ha permitido no solamente conocer los individuos que muestran una autocompatibilidad agronómica y determinar las frecuencias fenotípicas para este carácter, sino también la calidad de la expresión de la autocompatibilidad en cada individuo.

En primer lugar, la transmisión de la autocompatibilidad de 'Tuono' a las descendencias estudiadas mostró un comportamiento diferencial según el parental autoincompatible utilizado, 'Ferragnès' o 'Ferralise', a pesar de que estos parentales compartan el mismo genotipo de autoincompatibilidad, S_1S_3 (CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY, 1985).

En las descendencias para cuya obtención se utilizó 'Tuono' como parental femenino, y por lo tanto segregantes para la autocompatibilidad, se obtuvieron proporciones fenotípicas opuestas. Mientras que en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' la proporción de individuos autocompatibles fue superior a la de autoincompatibles, confirmando lo ya observado por SOCIAS I COMPANY (1988) y DICENTA Y GARCÍA (1993), en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' la proporción de individuos autoincompatibles fue cuatro veces superior a la de autocompatibles.

En las descendencias para cuya obtención se utilizó 'Tuono' como parental masculino, y por lo tanto no segregantes para la autocompatibilidad, la presencia de individuos autoincompatibles sólo se produjo en los descendientes de 'Ferralise', confirmando las observaciones de GRASSELLY *ET AL.* (1985).

Aunque todos los descendientes del cruzamiento 'Ferralise' x 'Tuono' son genotípicamente autocompatibles como muestra la presencia del alelo S_r , una parte de ellos muestran autoincompatibilidad fisiológica, fenómeno no señalado previamente y que puede ligarse a la consanguinidad presente en 'Ferralise' (LANSARI *ET AL.*, 1994). Esta divergencia entre genotipo y fenotipo también se manifiesta en algunas plantas del cruzamiento recíproco, en el que sí hay segregación genotípica. Este comportamiento podría deberse a que la consanguinidad afecte a las rutas metabólicas implicadas en la nutrición de las plantas consanguíneas, lo que se manifiesta en su reducido vigor y probablemente en una deficiente acumulación de reservas en el tejido transmisor del estilo, afectando así a la elongación de los tubos polínicos, al inducir una tasa de crecimiento baja o incluso nula, de manera que los tubos polínicos se detendrían una vez que hubieran consumido las pocas reservas presentes (HERRERO Y HORMAZA, 1996).

En segundo lugar, la observación del crecimiento de los tubos polínicos muestra la implicación agronómica del comportamiento debido a la autocompatibilidad o autoincompatibilidad de los individuos. Esta técnica permite determinar para cada individuo la proporción de pistilos que presentan tubos polínicos en la base del estilo, así como en qué número llegan, pudiendo utilizarse esta información, junto con la homogeneidad de los datos, como criterio de selección.

Con este criterio, los individuos de las familias estudiadas se clasificaron fenotípicamente en función de la proporción de pistilos que presentaban tubos polínicos en la base. Así, se consideraron autoincompatibles aquellas plantas cuyos pistilos presentasen la llegada de tubos polínicos a la base en un porcentaje inferior al 25%; pseudocompatibles, aquellas plantas que mostrasen porcentajes entre el 26 y 50% de los pistilos observados; autocompatibles, las plantas con porcentajes entre el 51 y 75%; y por último, altamente autocompatibles, las plantas con valores superiores al 75%. Estas últimas plantas resultan a priori de mayor interés agronómico que las otras, ya que, cuanto mayor sea esta proporción, mayor será la posibilidad de cuajado de frutos.

La calidad de la autocompatibilidad también puede reflejarse en la cantidad de tubos polínicos observada en la base de los estilos, de tal manera que los individuos calificados como autocompatibles mostraron de 1 a 3 tubos polínicos en la base de cada pistilo, mientras que los altamente autocompatibles mostraron más de 3 tubos polínicos por pistilo.

Los descendientes de 'Ferragnès' mostraron más tubos polínicos en la base del estilo que los descendientes de 'Ferralise', lo que puede deberse al menor vigor del polen como consecuencia de la consanguinidad transmitida por 'Ferralise'.

Aunque teóricamente la fecundación del óvulo se puede producir con la presencia de un único tubo polínico en la base del estilo (PIMIENTA Y POLITO, 1983), en algunos casos el crecimiento del tubo polínico puede resultar caótico antes o después del obturador, fracasando en la fecundación del óvulo primario (COUSIN Y EL MAATAOUI, 1998), por lo que la probabilidad de éxito en la fecundación aumenta con el número de tubos polínicos que alcanzan la base del estilo. Por consiguiente, el número medio de tubos polínicos en la base del estilo puede utilizarse también como criterio de selección del nuevo material autocompatible generado en los programas de mejora.

9.2 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DEL LOCUS S

La determinación del genotipo del locus S en los individuos de las poblaciones estudiadas se realizó mediante dos procedimientos diferentes: la identificación del producto proteico codificado por los alelos de autoincompatibilidad (las S-RNAsas estilares) y la identificación de los genes que

codifican para estas glicoproteínas, habiéndose obtenido una plena concordancia entre los resultados obtenidos mediante los dos procedimientos.

La técnica utilizada para la identificación de las S-RNasas estilares, la NEpHGE (Non-Equilibrium pH Gradient Electrophoresis), resulta sencilla para analizar gran número de muestras una vez puesta a punto (LÓPEZ *ET AL.*, 2001). Indiscutiblemente, esta técnica ha resultado de una gran utilidad en el avance del conocimiento de los genotipos S en el germoplasma del almendro y el cerezo, pero no cabe duda que a medida que avanza el número de alelos S identificados (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 2003; ORTEGA, 2002), va a resultar más difícil su aplicación en la identificación de nuevos genotipos debido al estrecho rango de pH en que muchas S-RNasas muestran su punto isoelectrico. El futuro de esta técnica dentro de los programas de mejora radica en la identificación del genotipo S en las descendencias de mejora, cuando se conoce el genotipo de los parentales y se compara con el patrón de las S-RNasas de la progenie (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998).

Un gran inconveniente de esta técnica es la incapacidad de detectar el producto de la expresión del alelo de autocompatibilidad (S_f) en almendro, debido a que no muestra actividad RNasa (BOŠKOVIĆ *ET AL.*, 1998). Al utilizar esta técnica se acepta que la autocompatibilidad se manifiesta por la presencia de una sola banda con actividad S-RNasa, o con ninguna banda, como sería el caso de los homocigóticos $S_f S_f$, de posible obtención en autopolinizaciones de material autocompatible o en cruzamientos entre genotipos autocompatibles.

La determinación del genotipo S mediante marcadores moleculares basados en la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction) permitió identificar la presencia del alelo S_f en los genotipos considerados autocompatibles mediante la técnica NEpHGE. Igualmente, se confirmó que la posesión del alelo S_f no siempre se traduce en la expresión fenotípica de la autocompatibilidad, como fue el caso de los individuos con fenotipo autoincompatible y genotipo autocompatible entre los descendientes de 'Ferralise'.

Los cebadores PCR se han obtenido a partir de regiones conservadas en las S-RNasas clonadas del almendro (TAMURA *ET AL.*, 2000; MA Y OLIVEIRA, 2001; CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001), así como, más recientemente, de las secuencias de los intrones de los alelos S_1 , S_2 , S_5 , S_7 , S_8 , S_9 , S_{10} , S_{23} y S_f (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2003). Sin embargo, estos cebadores se han probado en muy pocos genotipos y, por lo tanto, en muy pocas combinaciones de alelos S. Al utilizar en las familias de este trabajo los cebadores ConF/ConR (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2001) se descubrió que también amplificaban el alelo S_3 de 'Ferragnès' y 'Ferralise', aunque el fragmento de DNA amplificado era de un tamaño muy parecido al del alelo S_f . Además, la amplificación del alelo S_f con estos cebadores se vio silenciada por la amplificación de los alelos S_1 y S_3 en la mayoría de los casos, como ya se

había observado en otras especies en las que se han utilizado cebadores procedentes de regiones conservadas de las S-RNasas (JANSSENS *ET AL.*, 1995; MATSUMOTO *ET AL.*, 1999; MATSUMOTO Y KITAHARA, 2000; ISHIMIZU *ET AL.*, 1999; TAO *ET AL.*, 1999; BRACE *ET AL.*, 1993; 1994).

Estos inconvenientes se superaron con el diseño y la aplicación de cebadores específicos para el alelo S_3 a partir de la secuencia del segundo intrón S_3 (S_3F y S_3R1) y del exón final (S_3R2), obteniéndose una buena amplificación y un buen polimorfismo en relación con los otros alelos. Estos cebadores S_3 complementan los presentados por CHANNUNTAIPAT *ET AL.* (2003), de manera que pueden utilizarse con éxito en los programas de mejora europeos, en los que el alelo S_3 tiene bastante importancia por la utilización de parentales con este alelo, especialmente como genitores de floración tardía.

La identificación de los genotipos S en progenies segregantes para la autocompatibilidad, y en particular la identificación del alelo *Sf* con los cebadores *SfF/SfR* (CHANNUNTAIPAT *ET AL.*, 2003), puede ayudar a eliminar precozmente los individuos autoincompatibles, en cuanto se disponga de hojas o de flores, con las ventajas que esto conlleva. Sin embargo, la presencia de individuos con autoincompatibilidad fisiológica entre los descendientes de 'Ferralise' es un claro ejemplo de la necesidad de una evaluación agronómica de la autocompatibilidad en los individuos que se califiquen como autocompatibles mediante las técnicas moleculares, siendo la observación del crecimiento de los tubos polínicos el mejor método para determinar la calidad agronómica de la autocompatibilidad.

9.3 PROPORCIONES GENOTÍPICAS EN LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Las familias estudiadas proceden de polinizaciones semicompatibles, lo que implica que las proporciones genotípicas obtenidas dependerán de la distribución inicial de los alelos S en los óvulos del parental femenino y de la supervivencia de los individuos generados en los cruzamientos hasta su evaluación. En las familias en las que 'Tuono' fue el parental femenino, los óvulos eran de genotipo S_7 o S_1 y sólo pudieron fecundarse con los tubos polínicos que transmitían el genotipo S_3 de 'Ferragnès' o de 'Ferralise'.

En estas familias, la distribución de los genotipos S parece variar según el parental masculino utilizado. Así, en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès' predomina ligeramente el genotipo S_7S_3 , mientras que en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' la proporción de individuos S_7S_3 es mayor del 70%. El predominio de genotipos S_7S_3 también parece confirmarse mediante determinaciones fenotípicas en otras familias de 'Tuono' x 'Ferragnès', en las que también se observó un predominio de fenotipos

autocompatibles (SOCIAS I COMPANY, 1988; DICENTA Y GARCÍA, 1993). Sin embargo, la gran desviación respecto a las proporciones esperadas en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' tiene difícil explicación. Quizás el predominio de individuos autoincompatibles (genotipo S_1S_3) en esta familia se haya producido como mecanismo de escape a la consanguinidad presente en 'Ferralise', favoreciendo la supervivencia de los embriones y las plantas que necesariamente deberían reproducirse mediante polinización cruzada, para obtener descendencias con una recombinación génica obligada y así con un mayor vigor híbrido.

En las familias en las que 'Tuono' se utilizó como parental masculino, los óvulos de 'Ferragnès' y 'Ferralise', con los dos genotipos S_1 o S_3 , sólo se pudieron fecundar con los tubos polínicos que transmitían el genotipo S_f de 'Tuono'. En estas dos familias se ha observado un ligero predominio de los genotipos S_1S_f sobre los genotipos S_3S_f . Al combinar estos resultados con los obtenidos por BALLESTER *ET AL.* (1998) y DUVAL *ET AL.* (2001), se obtiene un ajuste aceptable a la proporción $1S_1S_f : 1S_3S_f$ para las descendencias procedentes de los cruzamientos $S_1S_3 \times S_1S_f$, de acuerdo con la hipótesis propuesta por CROSSA-RAYNAUD Y GRASSELLY (1985).

9.4 INDIVIDUOS CON FENOTIPO NO CONCORDANTE A SU GENOTIPO

En la determinación fenotípica de los individuos con fenotipo autoincompatible y genotipo autocompatible se observó que unos pocos tubos polínicos habían recorrido aproximadamente el 80% del estilo. Estos tubos polínicos mostraron un vigor reducido, como se manifestó por su mayor delgadez que en los de fenotipo autocompatible, pero sin síntomas morfológicos de autoincompatibilidad, como terminaciones engrosadas o crecimiento tortuoso.

En los pistilos de estos individuos se observó un buen crecimiento de los tubos polínicos de variedades sin ninguna relación, como 'Marcona' y 'Titan', por lo que se debe descartar que la autoincompatibilidad observada pueda deberse a una incapacidad de los pistilos para sostener y nutrir a los tubos polínicos que atraviesan su tejido transmisor. Tampoco parece deberse a una falta de vigor de los tubos polínicos propios o a una deficiencia en el mecanismo de captación de nutrientes por su parte desde el tejido transmisor, ya que, de manera general, los tubos polínicos procedentes de estos individuos crecieron adecuadamente en los pistilos de la variedad 'Titan' hasta la base del estilo, así como en una cantidad adecuada para la fecundación.

Por otro lado, se observó que, en la autopolinización de estos individuos, tras 120 horas de crecimiento de los tubos polínicos, se produjo la llegada de uno o dos tubos polínicos a base del estilo en algunos pistilos. Por consiguiente, la incapacidad de autofecundación presente en estos

individuos radica en la interacción del pistilo con su propio polen, presumiblemente por la expresión en el pistilo de genes negativos para el crecimiento de sus propios tubos polínicos, debido probablemente a la presencia de consanguinidad. Ello también explicaría el mal crecimiento observado de forma general para los tubos polínicos procedentes de hermanos completos con idéntico genotipo S, aunque sean de individuos que hubieran mostrado un fenotipo altamente autocompatible.

El incremento desde 96 hasta 120 horas del crecimiento de los tubos polínicos propios permitió la llegada a la base del estilo de uno o dos tubos polínicos a la base del estilo en más pistilos, lo que implica que la reducción observada en el vigor de los tubos polínicos se traduce también en una menor velocidad del polen propio o emparentado en estos individuos consanguíneos. Esta menor velocidad debería promover teóricamente el cruzamiento con genotipos no emparentados. De esta manera se expresaría otro mecanismo natural de escape de la consanguinidad, proporcionando una base genética más amplia en la descendencia de individuos autocompatibles consanguíneos, por medio de la presencia de una autocompatibilidad encriptada.

9.5 CUAJADOS EN RAMAS EMBOLSADAS Y MORFOLOGÍA FLORAL

Los cuajados erráticos producidos en ramas embolsadas pueden tener su causa en factores ambientales adversos (SOCIAS I COMPANY *ET AL.*, 2002) o a una inadecuada morfología floral del individuo (WEINBAUM, 1985), pero también pueden ser fruto de la expresión de factores genéticos relacionados con la presencia de consanguinidad. De hecho, GRASSELLY *ET AL.* (1981) observaron cuajados muy bajos en árboles procedentes de la autopolinización de 'Tuono', que por lo tanto debían ser genéticamente autocompatibles. Algunos de estos árboles mostraban escasez de flores y una elevada proporción de flores estériles, al igual que algunos de los árboles pertenecientes a estas familias, también descendientes de 'Tuono'.

Según algunos autores (VASILAKAKIS Y PORLINGIS, 1984; WEINBAUM, 1985; WEINBAUM *ET AL.*, 1986), la morfología de la flor puede promover o impedir una buena autopolinización natural. La morfología floral media en los individuos estudiados fue ligeramente epiestigmática, al igual que sus parentales 'Ferragnès' (DE PALMA Y GODINI, 1994) y 'Tuono' (GODINI *ET AL.*, 1992), y se observaron diferencias en relación al parental autoincompatible, al cruzamiento y al genotipo S. Sin embargo, existe una gran variabilidad en la morfología floral entre los individuos, a pesar de la reducida base genética de la que proceden, lo que permitió observar que la distribución de cuajados fue

independiente de su morfología floral, tal como observaron GODINI *ET AL.* (1992), DE PALMA Y GODINI (1994) y KUMAR Y KUMAR (2000).

En los genotipos con flores con estigmas a más de 3 mm por encima del plano superior de las anteras, se observó un cuajado medio inferior al cuajado medio general, pero también en los que tenían estigmas a más de 2 mm por debajo, aunque en este último caso puede deberse a la relación entre pistilos cortos y la esterilidad floral en descendientes de 'Tuono' (SOCIAS I COMPANY, 1983).

Además, la cantidad de polen que llega al estigma puede depender de la orientación de la flor en la rama y de la posibilidad de atracción electrostática por parte de las flores sobre el polen, tanto del de la misma flor como del dehiscente en flores en un plano superior (VAKNIN *ET AL.*, 2001).

A pesar de la influencia de los factores ambientales sobre los cuajados obtenidos en ramas embolsadas, e incluso en polinizaciones artificiales, que provocan grandes variaciones de año en año para un mismo genotipo (LAYNE, 1983), la elevada proporción de cuajados erráticos observados en los individuos autocompatibles estudiados parece deberse más a factores genéticos, posiblemente relacionados con la consanguinidad, como observaron GRASSELLY *ET AL.* (1981), que no a factores ambientales.

Por ello, teniendo en cuenta la gran cantidad de factores que pueden afectar al cuajado de ramas embolsadas, la posición del estigma en relación con el plano de las anteras superiores sólo puede considerarse como una característica morfológica de cada individuo (GODINI *ET AL.*, 1992).

9.6 DINÁMICA DE LOS TUBOS POLÍNICOS EN POLINIZACIONES DE DIFERENTE PARENTESCO

Aunque en las familias estudiadas existen algunos individuos que muestran síntomas evidentes de consanguinidad, también hay individuos que muestran un fenotipo autocompatible adecuado y otros caracteres positivos que permiten considerarlos para pasar a las fases siguientes de selección. En algunos de estos individuos, que además presentaban un vigor normal y una densidad floral elevada, se evaluó la eficiencia del crecimiento de sus propios tubos polínicos frente a la de un polen extraño.

Así se observó que los tubos polínicos propios (autopolinización) mostraron una capacidad de crecimiento similar a los procedentes de genotipos no relacionados genéticamente con ellos (polinización cruzada con 'Marcona'). Sin embargo, en el conjunto de plantas evaluadas, el crecimiento de los tubos polínicos que poseían una cierta relación de parentesco con ellas (polinizaciones cruzadas semicompatibles con 'Cristomorto' y 'Aí'), mostró un ligero retraso durante

los tres primeros días en relación a los otros dos tipos de polen (propio y sin ninguna relación), siendo este comportamiento generalmente idéntico tanto para las plantas con genotipos S_1S_7 como con S_3S_7 .

Estos resultados contradicen la hipótesis de GODINI (1981), quien había indicado que la posibilidad de parentesco entre el polen y el estilo pudiera afectar a la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos, ya que los tubos polínicos procedentes de la autopolinización de 'Filippo Ceo' (S_1S_7) y de 'Genco' (S_1S_7) crecían más lentamente que los procedentes de la polinización cruzada de estas variedades con 'Tuono' (S_1S_7). Sin embargo, las observaciones de GODINI (1981) se realizaron con tres variedades de idéntico genotipo S y procedentes de la misma región, la Apulia. En el presente trabajo, se comparó el crecimiento de los tubos polínicos propios con el de una variedad que no comparte ningún alelo S con los individuos estudiados ('Marcona', $S_{11}S_{12}$) y de origen geográfico muy distante, así como con el de las variedades 'Cristomorto' y 'Aï', que sí tienen una relación de parentesco con estos individuos, con los que además comparten un alelo S.

Al igual que SOCIAS I COMPANY ET AL. (1976) y VASILAKAKIS Y PORLINGIS (1984), se observó que la velocidad de los tubos polínicos disminuyen a medida que éstos descienden hacia el ovario. Indicaron además que la velocidad de los tubos polínicos está directamente relacionada con la temperatura ambiental, mostrando unos umbrales a partir de los cuales, la velocidad disminuye drásticamente e incluso el crecimiento se detiene. Así, VASILAKAKIS Y PORLINGIS (1984) indicaron que los tubos polínicos propios en 'Truoito' (S_1S_7) crecían más rápidamente que los procedentes de 'Texas' (S_1S_5) a 10 y 15°C, siendo su crecimiento similar a una temperatura de 20 y 25°C y inferior a 30°C, ya que a esta temperatura se produjo la inhibición del crecimiento en los tubos polínicos propios. SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1992) a una temperatura de 15 y 20°C también observaron un crecimiento similar de los tubos polínicos propios de 'Guara' (S_1S_7) respecto a los de su polinización con 'Marcona'.

Sin embargo, SOCIAS I COMPANY Y FELIPE (1987), también a 12°C, indicaron como los tubos polínicos en 'C-9-5' ('Aylés'), llegan a la base del estilo a las 72 horas en todos los pistilos observados, mientras que en los individuos estudiados en este trabajo ello se produjo a las 96 horas.

Por otra parte, ORTEGA ET AL. (2002) y CERTAL ET AL. (2002) han sugerido que en las polinizaciones cruzadas en las que no se comparte ningún alelo de incompatibilidad existe una mayor probabilidad de fertilización que en las polinizaciones semicompatibles. Esta hipótesis se basa en que en las polinizaciones totalmente compatibles el 100% de los granos de polen tienen la capacidad inicial de llegar a la base del estilo, mientras que en las polinizaciones semicompatibles

sólo el 50% de los granos de polen tienen esta capacidad, lo que se traduciría en una teórica mayor cantidad de tubos polínicos en la parte inferior de los estilos en las polinizaciones completamente compatibles. Sin embargo, en el presente material se ha comprobado que los tubos polínicos procedentes de ambas polinizaciones llegaron al mismo tiempo a la base del estilo, así como SOCIAS I COMPANY Y ALONSO (2004) observaron una cantidad similar de tubos polínicos en la base del estilo después de los dos tipos de polinización, lo que podría explicarse por el efecto regulador ejercido por la cantidad de reservas en el estilo y por la competencia entre los tubos polínicos por el espacio en el tejido transmisor (HORMAZA Y HERRERO, 1996a). Ello también se relaciona con el hecho de que el crecimiento de los tubos polínicos varía según el genotipo del pistilo en el que crecen, tal como observaron BEN NJIMA Y SOCIAS I COMPANY (1995).

No se observó un comportamiento del crecimiento de los tubos polínicos consistente a lo largo del tiempo, como se manifestó por cambios bruscos en la velocidad media diaria registrada para los diversos tratamientos en los diferentes individuos. Estas variaciones pueden deberse al hecho de considerar exclusivamente el crecimiento del tubo polínico más largo, y no el conjunto de los tubos en crecimiento, ya que a medida que se desciende por el estilo desde el estigma disminuye el número de tubos polínicos presentes (HERRERO Y DICKINSON, 1980), y en algún caso se encuentra un único tubo polínico que crece mucho más que los otros, pudiéndose cambiar significativamente en este caso el valor de la media del tratamiento. La heterogeneidad en las inflexiones de las tasas de crecimiento de los distintos tipos de polinización en los diferentes genotipos hace difícil ligar este proceso a la transición de la nutrición autótrofa a la heterótrofa sufrida por los tubos polínicos durante su crecimiento (HERRERO Y DICKINSON, 1980).

Para finalizar, se ha comprobado que la consanguinidad transmitida a la descendencia, principalmente por la variedad 'Ferralise', originada del cruzamiento de dos variedades, 'Ferraduel' y 'Ferragnès', que son hermanas completas, afecta en algunos individuos a la calidad de la autocompatibilidad procedente de 'Tuono'. Esta consanguinidad se expresa en algunos casos como la incapacidad de los tubos polínicos procedentes de la autopolinización de llegar con normalidad a la base del estilo, siendo la interacción polen-estilo la causante de la carencia de vigor en estos tubos polínicos, que se traduce en una velocidad menor de su crecimiento e incluso su parada en el último cuarto del estilo, mientras que el comportamiento del polen y del pistilo en otro tipo de polinizaciones es completamente normal. La consanguinidad presente en 'Ferralise' también es la causa presumible de la desviación de las frecuencias genóticas del locus S en la descendencia 'Tuono' x 'Ferralise', en la que la presencia de individuos autoincompatibles es mayoritaria, quizás debido a la expresión de genes letales relacionados con el alelo *Sf* y que obligarían de forma

mayoritaria a la descendencia a una fecundación procedente de una polinización cruzada, como mecanismo para ampliar la heterocigosis y producir descendencias vigorosas. Como se había observado también en otras descendencias de 'Tuono' que presentaban consanguinidad, los cuajados obtenidos en individuos autocompatibles procedentes de las familias en estudio fueron muy erráticos. Se comprobó que la morfología floral era independiente de la obtención de cuajados bajos y que éstos sufren de una gran influencia ambiental. A pesar de todos estos inconvenientes, especialmente derivados de la expresión de la consanguinidad, que afectan a la transmisión y a la calidad de la autocompatibilidad, algunos descendientes de estas familias muestran interés para seguir su evaluación con el fin de obtener variedades autocompatibles de almendro, sobre todo los descendientes de 'Ferragnès', como lo atestiguan las variedades autocompatibles comerciales 'Lauranne', 'Steliette', 'Cambra', 'Antoñeta' y 'Marta'. En algunos de estos individuos interesantes se ha observado que la eficiencia en el crecimiento de los tubos polínicos propios fue similar a la de un polen sin relación de parentesco o a la del polen de sus antepasados, confirmando que en estos individuos no existe una interacción negativa entre el estilo y el polen relacionado genéticamente que afecte al vigor de crecimiento de los tubos polínicos como se había observado en individuos con presencia de consanguinidad. Así es como algunas plantas procedentes de los programas de mejora así como las variedades comerciales autocompatibles anteriormente citadas, caracterizadas todas por su floración tardía, se utilizan como parentales en lugar de 'Tuono' (SOCIAS I COMPANY, 2002), con el fin de obtener nuevo material vegetal autocompatible, de floración tardía, y con unas características de fruto similares a variedades de elevado valor comercial como 'Marcona' y 'Desmayo Largueta'. En la realización de estos cruzamientos se está ampliando además la base genética del material autocompatible dentro de los programas de mejora, así como eliminando los caracteres negativos que transmite 'Tuono' a la descendencia.

10. CONCLUSIONES GENERALES

10. CONCLUSIONES GENERALES

FENOTIPO DE LA AUTOCOMPATIBILIDAD DE LAS FAMILIAS

1.- La transmisión de la autocompatibilidad desde 'Tuono' a sus descendientes dependió del parental autoincompatible utilizado, observándose un predominio de individuos autocompatibles en la familia 'Tuono' x 'Ferragnès', mientras que en la familia 'Tuono' x 'Ferralise' el predominio fue de individuos autoincompatibles. Así, mientras que la autocompatibilidad de 'Tuono' se transmite a todos los descendientes de 'Ferragnès' x Tuono', se ha observado la presencia de varios individuos agrónomicamente autoincompatibles en la descendencia de 'Ferralise' x 'Tuono', posiblemente a consecuencia del efecto de la consanguinidad.

2.- El fenotipo de la autocompatibilidad de cada individuo se puede considerar en función de la proporción de pistilos que presentan tubos polínicos en su base, así como del número medio de tubos en la base del estilo. De esta manera se puede determinar la calidad de la autocompatibilidad para utilizarla como criterio en el proceso de selección.

3.- La consanguinidad que transmite 'Ferralise' a su descendencia afecta negativamente a la proporción de pistilos con tubos polínicos en su base y al número de tubos en la base, en relación a la calidad de la autocompatibilidad observada en los descendientes de 'Ferragnès'.

IDENTIFICACIÓN DE LAS S-RNASAS Y SU AMPLIFICACIÓN MOLECULAR

4.- La técnica de identificación de alelos S mediante la separación de las S-RNAsas estilares con la técnica NEpHGE y la amplificación de sus fragmentos de DNA codificadores pueden suponer el ahorro de muchos recursos en los programas de mejora, ya que es posible identificar precozmente los individuos autoincompatibles en poblaciones segregantes de los programas de mejora, e identificar individuos introducidos en progenies de mejora por error.

5.- Se han diseñado y probado distintos cebadores específicos para el alelo S₃, recomendando la combinación S₃F/ConR que proporciona un fragmento de DNA amplificado de 950 pb en los genotipos que poseen este alelo. Estos cebadores pueden ser utilizados con éxito en los programas de mejora europeos, en los que el alelo S₃ es importante por la utilización de parentales que poseen este alelo en los distintos programas.

6.- Se ha comprobado la especificidad de los cebadores S_7F/S_7R diseñados para la identificación del gen de autocompatibilidad (S_7) en las familias estudiadas, con lo que es teóricamente posible seleccionar los individuos que poseen este gen cuando la plántula comienza a tener hojas, con el consiguiente ahorro de espacio en las parcelas de mejora.

7.- Se ha observado la concordancia entre los genotipos asignados mediante la expresión de las S-RNasas estilares y los genotipos obtenidos en el análisis de la PCR alelo-específica.

8.- La presencia entre los descendientes de 'Ferralise' de individuos de genotipo autocompatible pero agrónomicamente autoincompatibles constata la necesidad de una evaluación agronómica de la autocompatibilidad presente en los individuos seleccionados mediante técnicas moleculares. La evaluación microscópica del crecimiento de los tubos polínicos suministra una información agronómica sobre la calidad de la autocompatibilidad, ya que se evalúa la capacidad de autofecundación de los individuos seleccionados.

PROPORCIONES GENOTÍPICAS EN LAS FAMILIAS MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ALELOS

9.- Las proporciones genotípicas obtenidas en las progenies de 'Tuono' como parental femenino varían según el parental masculino, ajustándose más a la proporción $1 S_7S_7 : 1 S_3S_7$ en la familia 'Ferragnès' x 'Tuono' que en la 'Ferralise' x 'Tuono'. El efecto de la consanguinidad presente en 'Ferralise' parece favorecer la supervivencia de los individuos autoincompatibles S_7S_3 sobre los autocompatibles S_7S_3 , quizás como mecanismo de huida de la endogamia, forzando a la polinización cruzada a la descendencia obtenida.

10.- Las proporciones genotípicas obtenidas en las progenies de 'Ferragnès' y 'Ferralise' como parental femenino con 'Tuono' como parental masculino se ajustan a las esperadas para los cruzamientos semicompatibles, $1 S_7S_7 : 1 S_3S_7$.

INDIVIDUOS CON FENOTIPO NO CONCORDANTE A SU GENOTIPO

11.- La baja velocidad de crecimiento de los tubos polínicos observada en la autopolinización de los descendientes de 'Ferralise' que poseen el alelo de autocompatibilidad S_7 pero que muestran un fenotipo agrónomicamente autoincompatible, puede ser una herramienta para fomentar su polinización cruzada.

12.- El buen comportamiento de los tubos polínicos de individuos no emparentados en los pistilos de estos genotipos, en contraste con el comportamiento observado en sus autopolinizaciones o las polinizaciones con hermanos completos del mismo genotipo S, indican que la causa principal de este comportamiento diferencial es la expresión de la consanguinidad.

CUAJADOS EN RAMAS EMBOLSADAS Y MORFOLOGÍA FLORAL

13.- En los individuos autocompatibles estudiados se obtuvieron una elevada proporción de cuajados erráticos por el embolsado de ramas, como ya se había observado anteriormente en otras familias procedentes de 'Tuono' con problemas de consanguinidad. Se comprobó que la morfología floral era independiente para la obtención de estos bajos cuajados y que existe una gran influencia ambiental, lo que pone de manifiesto la inconveniencia de esta técnica para determinar los individuos autocompatibles en progenies de mejora.

14.- Se ha observado una gran variabilidad en la morfología floral de estos individuos, tanto en la posición relativa del estilo en función del plano superior de las anteras, como en la longitud de los pistilos.

EFICIENCIA DEL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLÍNICOS EN POLINIZACIONES DE DIFERENTE PARENTESCO

15.- Las tres polinizaciones ensayadas (autopolinización, cruzamiento semicompatible con un antepasado, y cruzamiento totalmente compatible sin relación de parentesco) en individuos con interés agronómico pertenecientes a las familias estudiadas, mostraron una longitud similar de los tubos polínicos a las 96 horas desde la polinización, produciéndose la llegada de los tubos polínicos a la base de los estilos en una amplia mayoría de los pistilos observados. Ello implica que la presencia de autocompatibilidad genética en los genotipos estudiados proporciona a los tubos polínicos propios la misma eficiencia en la polinización que a los ajenos.

16.- Los genotipos autocompatibles descendientes de 'Tuono' interesantes pueden seleccionarse para su evaluación posterior, posible registro de nuevas variedades y utilización como parentales en nuevos cruzamientos como se han utilizado otros descendientes de 'Tuono'.

17.- Estas conclusiones ponen de manifiesto la necesidad de evitar la consanguinidad en los programas de mejora genética del almendro, peligro evidente por la utilización de un número reducido de parentales en muchos de estos programas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AI Y., SINGH A., COLEMAN C.E., IOERGER T.R., KHEYR-POUR A., KAO T.H. 1990. Self-incompatibility in *Petunia inflata*: isolation and characterization of cDNAs encoding tree S-allele-associated proteins. *Sex. Plant Reprod.* 3:130-138
- ALMEIDA C.R. MARQUES DE. 1945. Àcerca da incompatibilidade na amendoeira. *An. Inst. Agron. Lisboa* 15:1-186
- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., CHAFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- ANDERSON M.A., CORNISH E.C., MAU S.L., WILLIAMS E.G., HOGGART R., ATKINSON A., BÖNING I., GREG B., SIMPSON R.J., ROCHE P.J., HALEY J.D., PENSCHOW J.D., NIAL H.D., TREGAR G.W., COGHLAN J.P., CRAWFORD R.J., CLARKE A.E. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321:38-44
- ANDERSON M., MCFADDEN G.I., BERNATZKY R., ATKINSON R., ORPIN T., DEDMAN H., TREGAR G.W., FERNLEY R., CLARKE A.E. 1989. Sequence variability of three alleles of self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* 1:483-491.
- ARCHANGELI 1882. *Comp. Fl. Ital.* 209.
- ARÚS P., MESSEGUER R., VICENTE M.C. DE, PUIGDOMÈNECH P., VARGAS F. 1993. Marcadores moleculares para facilitar la mejora de *Prunus*. *HortoFruticultura* 11:54-57.
- BALLESTER J. 1998. Localització i anàlisi de caràcters d'interès agronòmic de l'ametller. Tesis doctoral, 184 pp.
- BALLESTER J., BOŠKOVIĆ R., BATLLE I., ARUS P., VARGAS F.J., VICENTE, M.C. de. 1998. Location of the self-compatibility gene in the almond linkage map. *Plant Breed.* 117:69-72
- BARAHONA M., SOCIAS I COMPANY R. 1988. Esterilidad floral en distintas descendencias de almendro. III Congr. Soc. Esp. Cienc. Hort., Puerto de la Cruz (Tenerife) 15-22 Octubre 1988. pp. 119.
- BARRETT S.C.H. 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends Ecol. Evol.* 5:144-148
- BATCSH, A.S.G. 1801. *Beytr. Gesch. Natur.* 1:30.
- 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.
- BATLLE I., ROMERO M.A., VARGAS F.J. 1999. Aplicación de las ribonucleasas (RNAsas) estilares al cultivo y mejora genética del almendro. *Frutic. Prof.* 104:54-60.
- BEN NJIMA N., SOCIAS I COMPANY R. 1995. Characterization of some self-compatible almonds. I. Pollen tube growth. *HortScience* 30(2):318-320
- BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.
- 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., ROVIRA M., ROMERO M., BATLLE I., DUVAL H., DICENTA F. 1998. Inheritance of stylar ribonucleases in two almond progenies and their correlation with self-compatibility. *Acta Hort.* 470:118-122.

- BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., DUVAL H., BATLLE I., DICENTA F., VARGAS F.J. 1999. A stilar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. *Theor. Appl. Genet.* 99:800-810.
- BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R., BATLLE I., DUVAL H., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., GRADZIEL T.M. 2003. Stilar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breed.* 122:70-76.
- BRACE J., OCKENDON D.J., KING G.J. 1993. Development of a method for the identification of S-alleles in *Brassica oleracea* based on digestion of PCR-amplified DNA with restriction endonucleases. *Sex. Plant Reprod.* 6:133-138.
- BRACE J., KING G.J., OCKENDON D.J. 1994. A molecular approach to the identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Sex. Plant Reprod.* 7:203-208.
- BREWBAKER J.L. 1959. Biology of the angiosperm pollen grain. *Ind. J. Genet. Plant Breed.* 19:121-133.
- BREWBAKER J.L. 1967. The distribution and phylogenetic significance of binucleate and trinucleate pollen grains in the Angiosperms. *Amer. J. Bot.* 54(9):1069-1083.
- BROOHTAERTS W.J., JANSSENS G.A., PROOST P., BROEKAERT W.F. 1995. cDNA cloning and molecular analyses of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27:499-551.
- BROWICZ K. 1969. *Amygdalus*. En: K.H. Rechinger (Ed.): *Flora Iranica*. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz, Austria, vol 66, pp. 166-168.
- BROWICZ K. 1972. *Amygdalus*. En: P.H. Davis (Ed.): *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh Univ. Press, vol 4, pp. 21-28.
- BROWICZ K., ZOHARY D. 1996. The genus *Amygdalus* L. (*Rosaceae*): Species relationships, distribution and evolution under domestication. *Genet. Resour. Crop Evol.* 43:229-247.
- BURGOS L., PÉREZ-TORNERO O., BALLESTER J., OLMAS O. 1998. Detection and inheritance of stilar ribonucleases associated with self-incompatibility alleles in apricot. *Sex. Plant Reprod.* 11:153-158.
- CERDÁ JUAN D. 1973. Economía antigua de Mallorca. En: J. Mascaró Pasarius (ed) *Historia de Mallorca*, vol 1. J. Mascaró Pasarius, Palma de Mallorca, pp 193-200.
- CERTAL, A.C., ALMEIDA R.B., BOŠKOVIĆ R., OLIVEIRA M.M., FEIJO J.A. 2002. Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Sex. Plant Reprod.* 15:13-20.
- CERTAL A.C., SÁNCHEZ A.M., KOKKO H., BROOHTAERTS W., OLIVEIRA M.M., FEIJÓ J.A. 1999. S-RNases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. *Sex. Plant Reprod.* 12:94-98.
- COOK S., LEFEBUNE C., MCNEILLY T. 1972. Competition between metal tolerant and normal plant populations on normal soil. *Evolution* 26:266-372
- CORNISH E., PETTITT J., BONIG I., CLARKE A. 1987. Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 326:99-102.
- COUSIN M., EL MAATAOUI M. 1998. Female reproductive organs in self-compatible almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) Loranne and fertilization patterns. *Scientia Hort.* 72:287-297.
- CLARK K.R., OKULEY J.J., COLLINS P.D., SIMS T.L. 1990. Sequence variability and development expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo self-compatible *Petunia*. *Plant Cell* 2:815-826
- CRANE M.B., BROWN A.G. 1937. Incompatibility and sterility in the sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Pomol.* 15: 86-116.

- CRANE R.B., LAWRENCE N.J. 1956. The genetics of garden plants. McMillan, London, 302 pp.
- CROSSA-RAYNAUD P., GRASSELLY C. 1985. Existence de groupes d'interstérilité chez l'amandier. Options Méditerran. CIHEAM/IAMZ 85/1:43-45.
- CROWE L.K. 1964. The evolution of outbreeding in plants. I. The Angiosperms. Heredity 19(3):435-457.
- CURRIER H.B. 1957. Callose substance in plant cells. Amer. J. Bot. 44(6):478-488.
- CHANNUNTAIPAT C., SEDGLEY M., COLLINS G. 2001. Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8 and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theor. Appl. Genet. 103:1115-1122.
- CHANNUNTAIPAT C., WIRTHENSOHN M., RAMESH S.A., BATLLE I., ARÚS P., SEDGLEY M., COLLINS G. 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant Breed. 122:164-168.
- CHEADLE V.I., GIFFORD E.M., ESAU K. 1953. A staining combination for phloem and contiguous tissues. Stain Technol. 28(2):49-53.
- DANDEKAR A.M., FISK H.J., MCGRANAHAN G.H., URATSU S.L., BAINS H., LESLIE C.A., TAMURA M., ESCOBAR M., LABAVITCH J., GRIEVE C., GRADZIEL T., VALI P.V., TEBBETS S.J., SASSA H., TAO R., VISS W., DRIVER J., JAMES D., PASSEY A., TEO G. 2002. Different genes for different folks in tree crops: what works and what does not. HortScience 37(2): 281-286.
- DICENTA F. 1991. Mejora genética del almendro (*Prunus dulcis* Miller) por cruzamientos intervarietales: Herencia de caracteres y selección. Tesis, Univ. Murcia, pp 314.
- DICENTA F., GARCÍA J.E. 1993. Inheritance of self-compatibility in almond. Heredity. 70:313-317.
- DICENTA F., ORTEGA E., CÁNOVAS J.A., EGEA J. 2001. Self-pollination versus cross-pollination of six self-compatible almond cultivars: pollen tube growth and fruit set. Cah. Options Méditerran. 56:369-372.
- DICKINSON H.G. 1994. Simply a social disease? Nature 367:517-518.
- DICKINSON H.G. 1995. Dry stigmas, water and self-incompatibility in *Brassica*. Sex. Plant Reprod. 8:1-10.
- DODDS P.N., CLARKE A.E., NEWBIGIN E. 1996. A molecular perspective on pollination in flowering plants. Cell 85:141-144.
- DUVAL H., BOUTARD A., FAUROBERT M. 2001. Analysis of stylar ribonucleases (S-Rnases) in an almond progeny of 'Ferralise' x 'Tuono'. Cah. Options Méditerran. 56:91-94.
- DUVAL H., BATLLE I., BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R. 1998. Confirmation of incompatibility alleles in almond cultivars predicted by analysis of stylar ribonucleases. Cah. Options Méditerran. 33:25-27.
- DOUGHTY J., HEDDERSON F., McCUBBIN A.G., DICKINSON H. 1993. Interaction between a coating-borne peptide of the *Brassica* pollen grain and stigmatic S-(self-incompatibility) locus-specific glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:467-471.
- EAST E.M., PARK J.B. 1917. Studies on self-sterility. I. The behavior of self-sterile plants. Genetics 2(6): 505-609.
- EAST E.M., MANGELSDORF A. 1925. A new interpretation of the hereditary behaviour of self-sterile plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 11(2):166-171.
- EGEA J., DICENTA F., BERENQUER T. 1999. 'Antoñeta' y 'Marta': dos nuevas variedades de almendro autocompatibles y de floración tardía. Frutic. Prof. 104:48-53.

- EGEA J., CÁNOVAS J.A., ORTEGA E., DICENTA F. 2001. Interference of the own pollen in self-incompatible almonds on later cross-compatible pollination: pollen tube growth and fruit set. *Cah. Options Méditerran.* 56:373-376.
- EL GHARBI A. 1973. Étude de l'autocompatibilité de la variété 'Mazetto'. *Rap. Activités Lab. Arboric. Fruit., INRAT, Ariana.*
- ENTANI T., IWANO M., SHIBA H., CHE F.S., ISOGAI A., TAKAYAMA S. 2003. Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* 8(3):203-213.
- ETI S., PAYDAS S., KÜDEN A.B., NASK N., KURNAZ S., ILGIN M. 1994. Investigations in the pollen viability, germination capability and the growth of pollen tubes on some selected almond types under Cukorova conditions. *Acta Hort.* 373:225-229.
- FELIPE A.J. 1977. Almendro: estados fenológicos. *Inf. Técn. Econ. Agrar.* 8(27):8-9.
- FELIPE A.J. 1977. Épocas de floración de variedades de almendro. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar., Ser. Prod. Veg.* 7:105-112.
- FELIPE A.J., SOCIAS I COMPANY R. 1988. Trois variétés autocompatibles d'amandier provenant d'un programme de sélection et d'amélioration. *Rap. EUR 11557:* 123-130.
- FELIPE A.J., SOCIAS I COMPANY R., GÓMEZ APARISI J. 1998. The almond rootstock ideotype. *Acta Hort.* 470:181-187.
- FERRARI T.E., BRUNS D., WALLACE D.H. 1981. Isolation of a plant glycoprotein involved with control of intercellular recognition. *Plant Physiol.* 67:270-277.
- GAGNARD, J.M. 1954. Recherches sur les caractères systématiques et sur les phénomènes de stérilité chez les variétés d'amandiers cultivées en Algérie. *Ann. Inst. Agric. Serv. Rech. Exper. Agric. Algérie* 8 (2): X + 164.
- GARCÍA J.E. 1986. Cultivo del almendro en zonas semiáridas del sureste español. *An. Edafol. Agrobiol.* 45:827-841.
- GEPTS P., CLEGG M. 1989. Genetic diversity in pearl millet (*Penisetum glaucum*) at the DNA sequence level. *J. Hered.* 80:203-208.
- GERSTEL D.U. 1950. Self-incompatibility studies in guayule. II. Inheritance. *Genetics* 35(4):482-506.
- GODINI, A. 1975. Il mandorlo in Puglia: panorama della situazione varietale. *Notic. Ortoflorofruttic.* 6:11-12.
- GODINI A. 1977. Contributo alla conoscenza delle cultivar di mandorlo (*P. amygdalus* Batsch) della Puglia: 2) Un quadriennio di ricerche sull'autocompatibilità. III Coll. GREMPA, Bari, Italia, pp. 150-159.
- GODINI A. 1979. Ipotesi sulla comparsa dell'autocompatibilità nel mandorlo. *Riv. Sci. Tecn. Agrar.* 19(2/3):3-10.
- GODINI A., 1981. Observing pollen tube growth into selfed and crossed styles of two self-incompatible almond cultivars by means of fluorescence. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 65:135-142.
- GODINI A., DE PALMA L., PALASCIANO M. 1992. Role of self-pollination and reciprocal stigma/anthers position on fruit set of eight self-compatible almonds. *HortScience* 27(8):887-889.
- GODINI A., FERRARA E., REINA A., GIOGIO V., GUIDA F. 1977. Contributo alla conoscenza delle cultivar di mandorlo (*P. amygdalus* Batsch) della Puglia, 3: Un triennio di prove d'impollinazione incrociata. III Coll. GREMPA, Bari, Italia, pp. 194-206.

- GRADZIEL T.M., KESTER D.E. 1998. Breeding for self-fertility in California almond cultivars. *Acta Hort.* 470:109-117.
- GRADZIEL T.M. 2000. Almond. En: Register of new fruit and nut varieties. List 40. *HortScience* 35:812.
- GRASSELLY C. 1976a. Origine et évolution de l'amandier cultivé. *Options Méditerran.* 32:45-50.
- GRASSELLY C. 1976b. Les espèces sauvages d'amandiers. *Options Méditerran.* 32:28-43.
- GRASSELLY C. 1985. Avancement du programme "autocompatibilité" chez l'amandier. *Options Méditerran. CIHEAM/IAMZ 85/I:39-41.*
- GRASSELLY C., GROSSA-RAYNAUD P. 1980. L'amandier. G. P. Maisonneuve et Larose, Paris, XII + 446 pp.
- GRASSELLY C., GROSSA RAYNAUD P., OLIVIER G., GALL H. 1981. Transmission du caractère d'auto-compatibilité chez l'amandier (*Amygdalus communis*). *Options Méditerran. CIHEAM/IAMZ. 81/I:71-75.*
- GRASSELLY C., OLIVIER G. 1976. Mise en évidence de quelques types autocompatibles parmi les cultivars d'amandier (*P. amygdalus* Batsch) de la population des Pouilles. *Ann. Amélior. Plant.* 26:107-113.
- GRASSELLY C., OLIVIER G. 1984. Avancement du programme de création de variétés d'amandier autocompatibles. *Options Méditerran. CIHEAM/IAMZ 84/II:129-131.*
- GREEN P.J. 1994. The ribonucleases of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 45:421-445.
- HARING V., GRAY J.E., MCCLURE A., ANDERSON M.A., CLARKE A. E. 1990. Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science* 250:937-941.
- HAUCK N.R., IEZZONI A.F., YAMANE H., TAO R. 2001. Revisiting the S-allele nomenclature in sweet cherry (*Prunus avium* L) using RFLP profiles. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127:654-660.
- HERRERO M., FELIPE A.J. 1975. Pollinisation de l'amandier: incompatibilité pollen-style. II Coll. GREMPA, Montpellier-Nîmes, sp.
- HERRERO M., CAMBRA M., FELIPE A.J. 1977. Interpolinización de variedades de almendro. *An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Prod. Veg.* 7:99-103.
- HIRATSUKA S., OKADA Y., KAWAI Y., TAMURA F., TANABE K. 1995. Styler basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese pears. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64(3):471-478.
- HORMAZA J.I. 1996. Marcadores de ADN aplicados a la mejora de frutales. *Inf. Técn. Econ. Agrar.* 92V(1):5-15.
- HORMAZA J.I., HERRERO M. 1994. Gametophytic competition and selection. In: Williams E.G., Clarke A.E., Knox R.B. (eds) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Kluwer, Dordrecht, pp 372-400.
- HORMAZA J.I., HERRERO M. 1996a. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sex. Plant Reprod.* 9:153-160
- HORMAZA J.I., HERRERO M. 1996b. Male gametophyte selection as a plant breeding tool. *Scientia Hort.* 65(4):321-333.
- HUGHES M.B., BABCOCK E.B. 1950. Self-incompatibility in *Crepis foetida* (L.) subsp. *Rhoedifolia* (Bieb) Schinz et Sëller. *Genetics* 35(5):570-588.

- HUANG S., LEE H.S., KARUNANANDAA B., KAO T.H. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* 6:1021-1028.
- IDA K., NORIOKA S., YAMAMOTO M., KUMASAKA T., YAMASHITA E., NEWBIGIN E., CLARKE A.E., SAKIYAMA M., SATO M. 2001. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* 314:103-112.
- IGIC B., KOHN J.R. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13167-13171.
- IOERGER T.R., GOHLKE J.R., XU B., KAO T.H. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* 4:81-87.
- ISHIMIZU T., SHINKAWA T., SAKIYAMA F., NORIOKA S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.* 37:931-941.
- ISHIMIZU T., INOUE K., SHIMONAKA M., SAITO T., TERAJ O., NORIOKA S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:961-967.
- JANSSENS G.A., GODERIS I.J., BROEKAERT W.F., BROOHTAERTS W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. *Theor. Appl. Genet.* 91:691-698.
- JONES R.W. 1972. Titan, a seed source for F1 almond x Nemaguard peach hybrids. *Fruit Var. Hort. Dig.* 26:18-20.
- JUKOVSKI P.M. 1950. Kurturmic rastenia I ch sorodici. Moscow Sovietskaia nauka.
- KAO T., HUANG S. 1994. Gametophytic self-incompatibility: a mechanism for self / nonself discrimination during sexual reproduction. *Plant Physiol.* 105:461-466.
- KAUFMANN H., KIRCH H.H., WENNER T., THOMPSON R. 1991. The relationship of major pistil proteins of *Solanum tuberosum* to self-incompatibility. En: Hallick R.B. (ed) III Int. Congr. Plant Mol. Biol., Tucson, USA, Abstract 37.
- KESTER D.E. 1963. California almond varieties. *Calif. Agr. Expt. Sta. Ext. Serv. Lft.* 152, 8pp.
- KESTER D.E. 1970. Transfer of self-fertility from peach (*Prunus perica* L.) to almond (*Prunus amygdalus* Batsch). *West. Sec. Amer. Soc. Hort. Sci., Berkeley* (Abstract).
- KESTER D.E., ASAY R. 1975. Almonds. En: J. Janick y J.N. Moore (eds.): *Advances in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, pp. 387-419.
- KESTER D.E., ASAY R.N. 1978. Variability in noninfectious bud-failure of 'Nonpareil' almond. I. Location and environment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 377-382.
- KESTER D.E., GRADZIEL T.M., GRASSELLY C. 1991. Almonds (*Prunus*). *Acta Hort.* 290: 699-758.
- KESTER D.E., GRADZIEL T.M., MICKE W.C. 1994a. Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119 (1):106-109.
- KESTER D.E., GRIGGS W.H. 1959. Fruit setting in the almond: the pattern of flower and fruit drop. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 74:214-219.
- KESTER D.E., MICKE W.C., VIVEROS M. 1994b. A mutation in 'Nonpareil' almond conferring unilateral incompatibility. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119:1289-1292.
- KHEJR-POUR A., BINTRIM S.B., IOERGER T.R., REMY R., HAMMOND S.A., KAO T.H. 1990. Sequence diversity of pistil S-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Sex. Plant Reprod.* 3:88-97.
- KHO Y.O., BAER J. 1968. Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica* 17(2):298-302.

- KISHORE D.K., RANDHAWA S.S. 1993. Wild germplasm of temperate fruits. En K.L. Chada y O.P. Parrek (Ed.). *Advances in Horticulture*, vol 1 – Fruit Crops Part 1. Mahotra Publ. House, New Delhi, India, pp. 227-241.
- KNIGHT, R. L. Abstract bibliography of fruit breeding and genetics to 1965; *Prunus*. Tech. Commun. Commonw. Bur. Hort. Plant. Crops, 31 649 pp.
- KUMAR K., KUMAR U. 2000. Evidence of self-compatibility in indigenous almond (*Prunus dulcis* (Miller) D. A. Webb.) selections from India. *J. Amer. Pomol. Soc.* 54(2):68-71.
- LADIZINSKY G. 1999. On the origin of almond. *Genet. Resour. Crop Evol.* 46:143-147.
- LAI Z., MA W., HAN B., LIANG L., ZHANG Y., HONG G., XUE Y. 2000. An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* 50(1):29-42
- LAYNE R.E.C. 1983. Hybridization. En: Moore J.N., Janick J. (Eds.). *Methods in fruit breeding*. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Indiana, pp. 48-65.
- LEE H.S., HUANG S., KAO T.H. 1994. S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367:560-563.
- LEWIS D. 1942. The physiology of incompatibility in plants. I. The effect of temperature. *Proc. Royal Soc., Ser. B* 131:11-26.
- LEWIS D. 1979. *Sexual incompatibility in plants*. Edward Arnold, London, 59 pp.
- LINNAEUS C. 1735. *A system of vegetables*. London.
- LINSKENS H.F., ESSER K. 1957. Über eine spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenschaften* 44:16-21.
- LUU D.T., QIN X., MORSE D., CAPPADOCIA M. 2000 S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407:649-651.
- MA R.C., OLIVEIRA M.M. 2001. Molecular cloning of the self-compatibility genes S₁ and S₃ from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sex Plant Reprod.* 14:163-167.
- MA R.C., OLIVEIRA M.M. 2001. Molecular identification of S-genotypes of almond (*Prunus dulcis*). *ISHS Acta Hort.* 546:575-580.
- MAHOU A., DENNIS F.G. 1992. The almond in Morocco. *HortTechnology* 2 (4):488-492.
- MAPA. 2002. Análisis de la economía de los sistemas de producción. Resultados técnico-económicos de explotaciones agrícolas de Aragón en el año 2001. Dirección General de Planificación Económica y Coordinación Institucional. Madrid, octubre 2002. 84 pp.
- MARSHALL D.L., FOLSOM M. 1991. Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22:37-64.
- MARTIN F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol.* 34:125-128.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ P., DANDEKAR A.M., GRADZIEL T.M., LÓPEZ M., BATLLE I., ALONSO J.M., ORTEGA E., SÁNCHEZ-PÉREZ R., DICENTA F., SOCIAS I COMPANY R. 2003. Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. *Acta Hort.* 622:397-401.
- MASCARENHAS J.P. 1993. Molecular mechanisms of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell.* 5:1303-1314.
- MATSUMOTO S., KITAHARA K. 2000. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. *HortScience* 35: 1326-1332.

- MATSUMOTO S., KITAHARA K., KOMORI S., SOEJIMA J. 1999. A new S-allele in apple, 'Sg', and its similarity to the 'Sf' allele from 'Fuji'. *HortScience* 34: 708-710.
- MATSUURA T., SAKAI H., UNNO M., IDA K., SATO M., SAKIYAMA F., NORIOKA S. 2001. Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* 276:45261-45269.
- MATTON D.P., MAES O., LAUBLIN G., XIKE Q., BERTRAND C., MORSE D., CAPPADOCIA M. 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell* 9:1757-1766.
- MCCLURE B., HARING V., EBERT P., ANDERSON M., SIMPSON R., SAKIYAMA F., CLARKE A. 1989. Style self-incompatibility products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 32:955-957.
- MCCLURE B.A., GRAY J.E., ANDERSON M.A., CLARKE A.E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347:757-760.
- MCCUBBIN A.G., DICKINSON H. 1997. Self-incompatibility. En: K.R. Shivanna y V.K. Sawhny (Eds.): *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge Univ. Press, pp. 199-217.
- MCCUBBIN A.G., KAO T. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:333-364.
- MIGUEL C.M., OLIVEIRA M.M. 1999. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Rep.* 18:387-393.
- MONASTRA F., DELLA STRADA G., FIDEGHELLI C., QUARTA R. 1988. Supernova, une nouvelle variété d'amandier obtenue par mutagenèse. *Rap. EUR* 11557:3-7.
- MOUKHTOURI-STYLIANIDES E. 1977. Effects of self-pollination and cross-pollination on the 'Truaito', called almond variety cultivated in Greece. III Coll. GREMPA, Bari, Italia, 23-31.
- MULCAHY D.L., SARI-GORLA M., MULCAHY G.B. 1996. Pollen selection -past, present and future. *Sex. Plant Reprod.* 9:353-356.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- MUNRO R. 1868. On the reproduction and cross-fertilization of Passifloras. *Trans. Proc. Bot. Soc. Edinb.* 9:399-402.
- MURFETT J., ATHERTON T.L., MOU B., GASSER C.S., MCCLURE B.A. 1994. S-Rnase expressed in transgenic *Nicotiana glauca* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367:563-566.
- NASRALLAH J.B., NASRALLAH M.E. 1989. The molecular genetics of self-incompatibility in *Brassica*. *Annu. Rev. Genet.* 23:121-139.
- NASRALLAH J.B., NASRALLAH M.E. 1993. Pollen-stigma signalling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell* 5:1325-1335.
- NETTANCOURT D de. 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer-Verlag, Heidelberg, XXIX + 322 pp.
- NEWBIGIN E. 1996. The evolution of self-incompatibility: a molecular voyeur's perspective. *Sex. Plant Reprod.* 9:357-361.
- NEWBIGIN E., ANDERSON M.A., CLARKE A.E. 1993. Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell* 5:1315-1324.

- NORIOKA N., NORIOKA S., OHNISHI Y., ISHIMIZU T., ONEYAMA C., NAKANISHI T., SAKIYAMA F. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding S-allele specific stylar RNases in a self-incompatible cultivar and its self-compatible mutant of Japanese pear, *Pyrus pyrifolia* Nakai. *J. Biochem.* 120:335-345.
- O'FARRELL P.Z., GOODMAN H.M., O'FARRELL P.H. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1142.
- ORTEGA E. 2002. Mejora genética del almendro: nuevas estrategias para la obtención de variedades autocompatibles. Tesis doctoral, Univ. Murcia, 212 pp.
- ORTEGA E., DICENTA F. 2003. Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. *Theor. Appl. Genet.* 106:904-911.
- ORTEGA E., EGEA J., CANOVAS J.A., DICENTA F. 2002. Pollen tube dynamics following half- an fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sex. Plant Reprod.* 15:47-51.
- OUKABLI A., LANSARI A., WALLALI D.L., ABOUSALIM A., EGEA, J., MICHAUX-FERRIERE N. 2000. Self and cross effects on pollen tube growth and fertilization in self-compatible almond *Prunus dulcis* cv. Tuono. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75:739-744.
- PALASCIANO M.; LOGOLUSO V.; GODINI A., CARIELLO F. 1998. Evaluation of self-compatible offsprings of almond hybrids 'Ferragnès' x 'Falsa Barese', 'Ferragnès' x 'Genco' and 'Ferragnès' x 'Tuono'. *Cah. Options Méditerran.* 33:151-155.
- PANDEY K.K. 1959. Mutations of the self-incompatibility gene (S) and pseudocompatibility in angiosperms. *Lloydia* 22(3):222-234.
- PANDEY K.K. 1970. Time and site of the S-gene action, breeding systems and relationships in incompatibility. *Euphytica* 19:364-372.
- PFÄHLER P.L. 1967. Fertilization ability of maize pollen grains. II. Pollen genotype, female sporophyte and pollen storage interactions. *Genetics* 57:513-521.
- PIMIENTA E., POLITO V.S. 1983. Embryo sac development in almond (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb) as affected by cross-, self-, and non-pollination. *Ann. Bot.* 51:469-479.
- PUNT W. 1964. Names found to be incorrect for which no legitimate alternative name is available. *Regn. Veg.* 36:9.
- REINA A., GIORGIO V., GODINI A. 1985. Autres types autocompatibles parmi la population d'amandier des Pouilles. *Options Méditerran.* CIHEAM/IAMZ 85/1:25-29.
- REHDER A. 1947. Manual of cultivated trees and shrubs. 2nd ed. MacMillan, New York, 996 pp.
- RICHMAN A.D., BROOthaerts W., KOHN J.R. 1997. Self-incompatibility RNases from three plant families: homology or convergence? *Amer. J. Bot.* 84: 912-917.
- RIKHTER A.A. 1969. (Formas y métodos de mejora del almendro). *Tr. Gos. Nikit. Bot Sad* 43:81-94. (en ruso).
- RIVERS B.A., BERNATSKY R., ROBINSON S.J., JAHNEN-DECHENT W. 1993. Molecular diversity at self-incompatibility locus is a salient feature in natural populations of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Mol. Gen. Genet.* 238:419-427.
- RODRIGO J., HERRERO M. 1998. Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Sex. Plant Reprod.* 11(2):86-93.
- ROVIRA M., CLAVÉ J., ROMERO M., SANTOS J., VARGAS F.J. 1997. Self-compatibility in almond progenies. *Acta Hort.* 470:66-71.

- ROYO J., KUNZ C., KOWYAMA Y., ANDERSON M.A., CLARKE A.E., NEWBIGIN E. 1994. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6511-6514.
- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.
- SAS Institute. 1989. SAS/STAT User's Guide. SAS Institute, Cary, N.C.
- SASSA H., HIRANO H., IKEHASHI H. 1992. Self-incompatibility related RNases in styles of Japanese Pear (*Pyrus serotina* Rehd). Plant Cell Physiol. 33:811-814.
- SASSA H., HIRANO H., IKEHASHI H. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear (*Pyrus serotina*) Rehd. Mol. Gen. Genet. 241:17-25
- SASSA H., MASE N., HIRANO H., IKEHASHI H. 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus x domestica*). Theor. Appl. Genet. 89:201-205.
- SASSA H., NISHIO T., KOWYAMA Y., HIRANO H., KOBA T., IKEHASHI H. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of T2/S-ribonuclease superfamily. Mol. Gen. Genet. 250:547-557.
- SCHNEIDER K. 1904. Handbuch des Laubholzkunde. Jena: Gustav Fisher.
- SERAFINOV S. 1971. A spontaneous hybrid of *A. kuramica* Korsh. and *A. spinosissima* Bge. from Afghanistan. C.R. Acad. Sci. Agric. Bulgaria 4 (3):349-351.
- SINGH A., KAO T. 1992. Gametophytic self-incompatibility: biochemical, molecular, genetic and evolutionary aspects. Int. Rev. Cytol. 140:449-483.
- SPACH, E. 1843. Monographia generis *Amygdalus*. Ann. Sci. Nat. (Paris) Ser. 2, 19:106-108.
- SOCIAS I COMPANY R. 1979. Aportación a las técnicas de observación de tubos polínicos. Caso del almendro. An. Inst. Nac. Invest. Agrar. Ser. Prod. Veg. 10:233-236.
- SOCIAS I COMPANY R. 1982. Ensayos de polinización de diferentes clones del almendro 'Marcona'. An. Inst. Nac. Invest. Agrar., Ser. Agric. 139:11-21.
- SOCIAS I COMPANY R. 1983. Flower sterility in almond. Acta Hort. 139:69-74.
- SOCIAS I COMPANY R. 1984. A genetic approach to the transmission of self compatibility in almond (*Prunus amygdalus* Batsch). Options Méditerran. CIHEAM/IAMZ 84/II:123-127.
- SOCIAS I COMPANY R. 1988. Le rôle du pistil dans la croissance des tubes polliniques chez l'amandier. Rap. EUR 11557:155-163.
- SOCIAS I COMPANY R. 1988. La densité florale comme critère variétal chez l'amandier. Rap. EUR 11557:119-122.
- SOCIAS I COMPANY R. 1990. Breeding self-compatible almonds. Plant Breed. Rev. 8:313-338.
- SOCIAS I COMPANY R. 1996. L'autogamia nel miglioramento genetico del mandorlo. Frutticoltura. 48(12):67-70.
- SOCIAS I COMPANY R. 1998. La taxonomie de l'amandier. Cah. Options Méditerran. 33:91-93.
- SOCIAS I COMPANY R. 2001. Avances recientes en la autocompatibilidad del almendro. Inf. Técn. Econ. Agrar. 97V(3):215-225.

- SOCIAS I COMPANY R. 2001. Differential growth of almond pollen tubes in three environments. *Cah. Options Méditerran.* 56:59-64.
- 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., FELIPE A.J. 1977. La polinización del almendro. CRIDA 03, Zaragoza, 29 pp.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1977. Impollinazione incrociata di cultivar di mandorlo a fioritura tardiva. III Coll. GREMPA, Bari, Italia, pp. 194-206.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1979. La polinización del almendro. Hoja Técn. INIA 31, 31 pp.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1987. Pollen tube growth and fruit set in a self-compatible almond selection. *HortScience* 22:113-116.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1988. Self-compatibility in almond: transmission and recent advances in breeding. *Acta Hort.* 224:307-317.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1992. Self-compatibility and autogamy in 'Guara' almond. *J. Hort. Sci.* 67(3):313-317.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J. 1999. Recent advances in breeding for autogamy in almond. *Cah. Options Méditerran.* 56: 65-69.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J., GÓMEZ APARISI J. 1999. A major gene for flowering time in almond. *Plant Breed.* 118: 443-448.
- SOCIAS I COMPANY R., FELIPE A.J., GÓMEZ APARISI J., GARCÍA J.E., DICENTA F. 1998. The ideotype concept in almond. *Acta Hort.* 470:51-56.
- SOCIAS I COMPANY R., KESTER D.E., BRADLEY M.V. 1976. Effects of temperature and genotype on pollen tube growth of some self-incompatible and self-compatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101:490-493.
- SOCIAS I COMPANY R., GÓMEZ APARISI J., ALONSO J. M. 2002. Factores ambientales en el cuajado del almendro. V Jornadas de Experimentación en Fruticultura, Lleida, 27-29 Noviembre 2002.
- SONNEVELD T., ROBBINS T.P., BOŠKOVIĆ R., TOBUTT K.R. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor. Appl. Genet.* 102:1046-1055.
- STYLIANIDIS D.C., ISAAKIDIS A.M., MICHAELIDIS Z.S. 1990. Studies on the inheritance of self-compatibility and other characters in F1 hybrids of 'Truuito' x 'Ferragnès'. *Rap. EUR* 14081:51-65.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 101:344-349.
- TAO R., HABU T., NAMBA A., YAMANE H., FUYUHIRO Y., IWAMOTO K., SUGIURA A. 2002. Inheritance of S^f-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 105:222-228.
- TAO R., YAMANE H., SASSA H., MORI H., GRADZIEL T.M., DANDEKAR A.M., SUGIURA A. 1997. Identification of stilar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.* 38(3):304-311.
- TAO R., YAMANE H., SUGIURA A. 1999a. Cloning and nucleotide sequences of cDNAs encoding SI- and S4-RNases (Accession Nos. AB028153 and AB028154) from sweet cherry (*Prunus avium* L.). (PGR99-121). *Plant Physiol* 120:1207

- TAO R., YAMANE H., SUGIURA A. 1999b. Cloning of genomic DNA sequences encoding S1, S3, S4, and S6-RNases (Accession Nos. AB03185, AB03186, AB03187 and AB03188) from sweet cherry (*Prunus avium* L.). (PGR99-166). *Plant Physiol* 121:1057
- TAO R., YAMANE H., SUGIURA A., MURAYAMA H., SASSA H., MORI H. 1999c. 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.
- THORP R.W. 1996. Bee management for pollination. En *Almond Production Manual*. Univ. California, Div. Agric. Nat. Resour., pp. 132-154.
- THOMPSON R.D., KIRCH H.H. 1992. The S locus of flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet.* 8:381-387.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F., HIGGINS D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
- TSAI D.S., LEE H.S., POST L.C., KREILING K.M., KAO T.H. 1992. Sequence of an S-protein of *Lycopersicum peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sex. Plant Reprod.* 5:256-263.
- TUFTS W.P. 1919. Almond pollination. *Calif. Agric. Bull.* 306, 32 pp.
- TUFTS W.P., PHILP G.L. 1922. Almond pollination. *Calif. Agric. Bull.* 346, 35 pp.
- USHIJIMA K., SASSA H., TAO R., YAMANE H., DANDEKAR A.M., GRADZIEL T.M., HIRANO H. 1998. Cloning and characterization of cDNA encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequences diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Mol. Gen. Genet.* 260:261-268.
- USHIJIMA K., SASSA H., TAMURA M., KUSABA M., TAO R., GRADZIEL T.M., DANDEKAR A.M., HIRANO H. 2001. Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for an S haplotype. *Genetics* 158:379-386.
- 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. *Plant Cell* 15(3):771-781.
- VAKNIN Y., GAN-MOR S., BECHAR A., RONEN B., EISIKOWITZ D. 2001. Are flowers morphologically adapted to take advantage of electrostatic forces in pollination? *New Phytol.* 152:301-306.
- VARGAS F.J., CLAVÉ J., ROMERO M., BATLLE I., ROVIRA M. 1997. Autogamy studies on almond progenies. *Acta Hort.* 470:74-81.
- VASILAKAKIS M.D., PORLINGIS I.C. 1984. Self-compatibility in "Truuito" almond and the effect of temperature on selfed and crossed pollen tube growth. *HortScience* 19 (5):659-661.
- VAVILOV N.I. 1930. Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and Caucaus and the problem of the origin of fruit trees. *Proc. IX Int. Hort. Congr., London, August 7-15*, pp. 271-286.
- VAVILOV N.I. 1951. *The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants*. Ronald, New York.
- VEZVAEI A. 1997. Pollen tube growth in Nonpareil almond in relation to pollen genotype, temperature and competition among mixed pollen. *Acta Hort.* 470:251-261.
- WEBB D.A. 1967. *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb, comb. nov. *Repertorium Specierum novarum Regni vegetabilis*. Berlin. 74:24.

- WEINBAUM S.A. 1985. Role of natural self-pollination in self-fruitfulness in almond. *Scientia Hort.* 27:295-302.
- WEINBAUM S.A., POLITO V.S., KESTER D.E. 1986. Pollen retention following natural self pollination in peach, almond, and peach x almond hybrids. *Euphytica* 35:193-200.
- WESTWOOD M.M., STEPHEN W.P., CORDY C.B. 1966. The possibility of wind pollination in pear. *HortScience* 1:28-29.
- WHITEHOUSE H.L.K. 1951. Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in evolution of angiosperms. *Ann. Bot.* 14:198-216.
- WIERSMA P.A., WU Z., ZHOU L., HAMPSON C., KAPPEL F. 2001. Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theor. Appl. Genet.* 102:700-708.
- WILLSON C.M. 1977. Plant nucleases III. Polyacrylamide gel electrophoresis on corn ribonuclease isoenzymes. *Plant Physiol.* 48:64-68.
- XU B., MU J., NEVINSQ D.L., GRUN P., KAO T.H. 1990a. Cloning and sequencing of cDNAs encoding two self-incompatibility associated proteins in *Solanum chacoense*. *Mol. Gen. Genet.* 224:341-346.
- XU B., GRUN P., KHEYR-POUR A., KAO T.H. 1990b. Identification of pistil-specific proteins associated with three self-incompatibility alleles in *Solanum chacoense* Sex. *Plant Reprod.* 3:54-60.
- XUE Y., CARPENTER R., DICKINGSON H., COHEN E.S. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus Rnases. *Plant Cell* 8:805-814.
- YAEGAKI H., SHIMADA T., MORIGUCHI T., HAYAMA H., HAJI T., YAMAGUCHI M. 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., TAO R.; SUGIURA A.; HAUCK N.R., IEZZONI A. 2001. Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(6):661-667.
- YAMASHITA K., GAUDE T., DUMAS C., GRASSELLY C., CROSSA-RAYNAUD P. 1987, Protein analysis on pistils and pollens of almonds with special reference to Sf, a self-fertile gene. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 56(3):300-305.
- YATES F. 1934. Contingency tables involving small numbers and the chi-squared test. *J. Roy. Statist. Soc. Suppl.* 1:217-235.
- ZUCCHERELLI S., TASSINARI P., BROOHAERTS W., TARTARINI S., DONDINI L., SANSAVINI S. 2002. S-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sex. Plant Reprod.* 15(3):153-158.
- Direcciones web:**
- ALMOND BOARD, 2003. Almond Board of California. Almond Almanac 2003. (http://www.almondboard.com/docs/current_almanac.pdf)
- FAO, 2002. FAOSTAT AGRICULTURA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_es.asp)
- MAPA, 1999. Anuario de estadística agroalimentaria del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. (http://www.mapa.es/estadistica/Anu_01/Indice.asp)
- NCBI (Accesiones), National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Building 38ABethesda, MD 20894 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

12. ANEJOS

ANEJO I

PROTOCOLO PARA LA TÉCNICA ELECTROFORÉTICA NEPHGE VERTICAL DE RIBONUCLEASAS ESTILARES (S-RNASAS) DE ALMENDRO

EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESTILARES

1. Recoger 30 estilos (Fig. I.1A) por individuo procedentes de yemas de flor en estado D, repartidos en dos tubos Eppendorff.
2. Preparar la solución de Triton X-100 al 10% (Cuadro I.1).
 - 2.1. Mantener el frasco de Triton X-100 durante 20-30 minutos a 50°C.
 - 2.2. Pipetear 1 ml de Triton X-100.
 - 2.3. Colocar 9 ml de agua destilada en un vaso de precipitados y mantener a 40-50°C.
 - 2.4. Verter pipeteando varias veces el Triton X-100 en el vaso de precipitados para asegurarse de que todo está en el agua.
 - 2.6. Disolver bien mediante agitación.
3. Preparar el tampón de extracción (Cuadro I.2).
4. Triturar los pistilos en nitrógeno líquido con ayuda del taladro con broca de plástico (Fig. I.1,B y C).
5. Añadir 500 µl de tampón de extracción. El tampón debe prepararse inmediatamente antes de cada sesión de extracción.
7. Homogeneizar mediante la agitación de las muestras.
8. Centrifugar a 14.500 rpm durante 1 hora y a -4° C (Fig. I.1D).
9. Guardar el sobrenadante a -80° C en nuevos tubos Eppendorff hasta su posterior utilización.

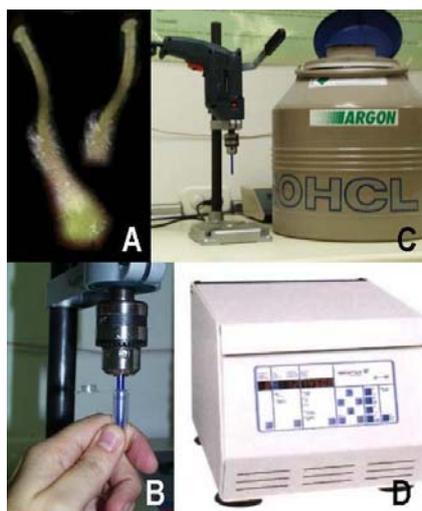


Fig.I.1 Extracción proteica de los estilos (A la izquierda).
 A) Pistilo y estilo.
 B) Taladro y depósito de nitrógeno líquido.
 C) Detalle de trituración.
 D) Ultra-centrifuga SIGMA K-3.

Cuadro I.1 Composición del Triton X-100 al 10%.

Triton X-100 al 10%	%
1 ml de Triton X-100	10 %
9 ml de H ₂ O destilada	90%

Cuadro I. 2 Composición del Tampón de extracción por orden de adición.

Tampón de Extracción (50 ml)	%
25 ml H ₂ O destilada	50%
15 ml Dimetilsulfoxido (DMSO)	30%
5 g Sacarosa	10%
0.05g Metabisulfito sódico	0,1%
100 µl Pharmalyte pH 3-10	0,2%
250 µl Triton X-100 al 10%	0,5%
Completar hasta 50ml con H ₂ O destilada	9,2%

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA

El protocolo de electroforesis está optimizado para la utilización de la Protean II (Fig. I.2).

1. Lavado de los cristales con agua destilada y acetona.
2. Montado de las piezas y cristales que hacen de molde para el gel. (Fig. I.3).
3. Mezcla de los componentes del gel de poli(acrilamida) (Cuadro I.3).
4. Vertido inmediato de la mezcla entre los cristales del molde del gel con cuidado para no crear burbujas de aire.
4. Introducción de los peines antes de la solidificación del gel.
5. Marcado de los pocillos y del gel con rotulador permanente.
6. Esperar el tiempo de polimerización del gel: 30 minutos o hacerlo a última hora de la jornada y dejar toda la noche en frigorífico con humedad elevada.

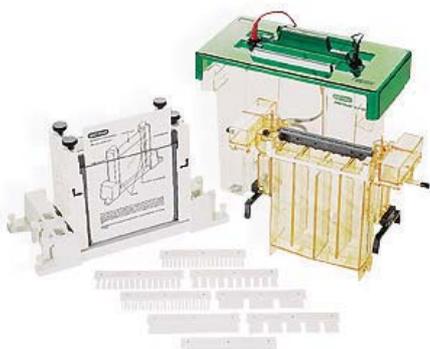


Fig. I. 2 Cubeta vertical PROTEAN® II xi Cell de BIO-RAD, con capacidad para dos geles de dimensiones 160 x 160 x 1 mm y 15 muestras por gel.

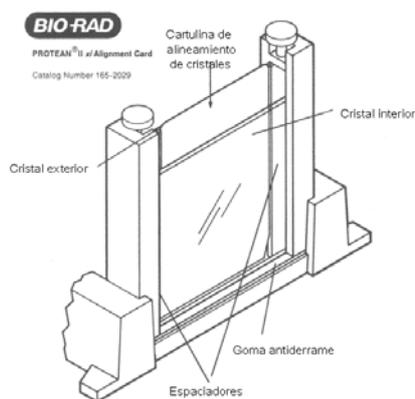


Fig. I.3 Montaje de las piezas para la preparación de un gel de poli(acrilamida).

Cuadro I.3 Composición de la solución - gel acrilamida.

Solución - Gel de Poli(acrilamida) (50 ml)	%
25 ml H ₂ O destilada	50%
5 g Sacarosa	10%
13,2 ml Stock Poli(acrilamida) (Cuadro I.4)	26,4%
2,8 ml Amfolito pH 3-10	5,6%
840 µl Amfolito pH 6.7-7.7	1,7%
260 µl Persulfato amónico 10% (Cuadro I.5)	0,5%
100 µl TEMED	0,2%
Completar hasta 50 ml H ₂ O destilada	

Cuadro I.4 Composición del stock de poli(acrilamida).

Stock Poli(acrilamida) 30%T; 2,7%C (200ml)	%
100 ml H ₂ O destilada	50%
58,4 g Acrilamida	29,2%
1,6 g Metilen-bis-acrilamida	0,8%
Completar hasta 200 ml H ₂ O destilada	20%

Cuadro I 5 Composición del Persulfato amónico al 10%

Persulfato amónico al 10%	%
1 ml de Persulfato amónico	10 %
9 ml de H ₂ O destilada	90 %

PREPARACIÓN DE LOS TAMPONES DE LOS ELECTRODOS

1. Preparar los tampones de los electrodos (Cuadro I.6) y conservar en frío o hielo hasta su uso.

Cuadro I.6 Composición de las soluciones tampón de los electrodos

Solución del Ánodo			Solución del Cátodo		
pH \approx 3			pH \approx 13.5		
H ₂ O destilada	400 ml	99,4%	H ₂ O destilada	2000 ml	99,6%
DL- ácido glutámico	2,35 g	0,6%	NaOH	8 g	0,4%
0,04 M			0,1 M		

ELECTROFORESIS NEpHGE: CONDICIONES DE MIGRACIÓN

1. Una vez finalizada la gelificación en los geles, retirar los peines y montar las placas en el cuerpo de la cubeta de electroforesis.
2. Colocar la solución del ánodo en el depósito superior y comprobar la estanqueidad del mismo.
3. Colocar la solución del cátodo en el depósito inferior.
4. Conectar la fuente de alimentación de la cubeta a 100 V durante 30 minutos con polaridad invertida en nevera (Fig. I.4), para crear un gradiente constante pH en el gel por migración de los anfólitos.
5. Sacar del congelador las muestras a utilizar 5-10 minutos antes de la carga.
6. Una vez acabado el pre-enfocado, cargar cada pocillo con 50 μ l de extracto proteico, con ayuda de pipeta y puntas de cargado de geles verticales.
7. Ejecutar el programa de migración deseado, en este caso los mejores resultados se han obtenido con la NEpHGE II. (Cuadro I.7).



Fig.I.4 Electroforesis dentro de frigorífico.

Cuadro I.7 Condiciones de migración NEpHGE II

Condiciones de migración	Duración
100 V	30 min (Pre-enfocado)
150 V	1 hora
300 V	1 horas
400 V	3 horas
Total: 1550 V	5 h

FIJACIÓN Y TINCIÓN

1. Retirar los geles del cuerpo de la cubeta.
2. Separar el gel de los cristales y marcar muescas en las esquinas de los geles con bisturí para posterior identificación del orden de los pocillos y el número del gel.
3. Incubar cada gel en 200 ml de tampón pH 5,8 (Cuadro I.8) a 37°C durante 20 minutos.
4. Verter el Tampón pH 5,8 e incubar cada gel con 100 ml de la solución de RNA (Cuadro I.9) a 37°C durante 40 minutos.
5. Verter la solución de RNA e incubar de nuevo cada gel con 200 ml de tampón pH 5,8, a 37°C durante 20 minutos.
6. Verter y fijar cada gel en ácido acético al 7% (Cuadro I.10) durante 3 minutos.
7. Verter y añadir la solución de azul de toluidina, mantener durante 90 segundos.
8. Verter la solución de azul de toluidina.
9. Añadir agua en abundancia y dejar desteñir toda la noche.
10. Interpretación del gel y fotografiado con cámara digital.

Cuadro I.8 Composición Tampón pH 5,8

Tampón pH 5,8 (1200 ml)		
1000 ml de H ₂ O destilada	83,3%	
9,84g de Acetato sódico	0,82%	0,1 M
8,88 g de Cloruro potásico	0,74%	0,1 M
Completar con H ₂ O destilada hasta 1200 ml	15,14%	
Ajustar pH a 5.8 con ácido acético glacial		

Cuadro I.9 Composición solución de RNA

Solución de RNA (400 ml)
400 ml de Tampón pH 5,8
0,8 g de RNA

Cuadro I.10 Composición de azul de toluidina.

Solución de azul toluidina (400 ml)
400 ml de H ₂ O destilada
2 ml de ácido acético glacial
0,4 g de azul de toluidina

Cuadro I.11 Lista de reactivos utilizados para la NEpHGE.

Lista de reactivos utilizados	
DMSO (dimethyl sulphoxide)	PANREAC 131954 (1000 ml)
Sacarosa	PANREAC 131621 (1000 g)
Sodio Disulfito	PANREAC 131698 (500 g)
Triton X-100	SIGMA 119F0733 (100 ml)
Acrilamida	BIO-RAD 66656B (500 g)
Methylenbisacrylamide	BIO-RAD 66659B (50 g)
Pharmalyte pH 3-10	AMERSHAM 17-0456-01 (25ml)
Pharmalyte pH 6.7-7.7	AMERSHAM 17-0566-01 (25ml)
Ammonium persulphate	SIGMA 20K0224 (100 ml)
TEMED	BIO-RAD 66306B (50 ml)
DL-ácido glutámico	SIGMA G-1126 (1000 g)
Sodio Acetato Anhidro	PANREAC 141633 (500 g)
Potasio Cloruro	PANREAC 131494 (500 g)
Ribonucleic acid from Torula Utilis	FLUKA 83850 (25 g)
Azul de Toluidina O	SIGMA T-3260 (25 g)
Ácido Acético glacial	PANREAC 131008 (1000 g)

ANEJO II
PROTOCOLO PARA LA APLICACIÓN DE TÉCNICA PCR EN LA AMPLIFICACIÓN DE LOS ALELOS
DE INCOMPATIBILIDAD Y AUTOCOMPATIBILIDAD

EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

EXTRACCIÓN EN TUBOS DE 45 ML.

- 1.- Verter 12 ml del tampón de extracción en tubos estériles de 45 ml.
- 2.- Poner los tubos en baño María a 65 °C.
- 3.- Una vez el tampón está a 65°C, triturar en mortero 3g de tejido joven fresco, con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
- 4.- Antes de que se produzca la descongelación del tejido pulverizado, verter en el tubo con el tampón de extracción.
- 5.- Invertir 30 veces suavemente el tubo para perfecto mezclado del tampón de extracción con el tejido vegetal.
- 6.- Incubar en baño María las muestras a 65°C durante 20 minutos (agitar suavemente de vez en cuando).
- 7.- Sacar los tubos del baño y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 8.- Añadir 10 ml de cloroformo : isoamil alcohol (24:1) a cada tubo (en campana).
- 9.- Mezclar suavemente invirtiendo el tubo 20 – 30 veces (en campana).
- 10.- Equilibrar los tubos con cloroformo: isoamil alcohol para una correcta centrifugación (en campana).
- 11.- Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C.
- 12.- Transferir la fase superior a un tubo estéril de 45 ml (en campana).
- 13.- Añadir 5 ml de cloroformo : isoamil alcohol (24:1) (en campana). Repetir pasos 10 a 12.
- 14.- Precipitar el DNA añadiendo 10 ml de isopropanol (2-propanol) a temperatura de -20°C.
- 15.- Agitar suavemente y mantener el DNA en isopropanol (2-propanol) durante 10 minutos.
- 16.- Eliminar el isopropanol (2-propanol) y añadir 10 ml de la solución de lavado, agitar suavemente.
- 17.- Cambiar la solución de lavado después de una hora a temperatura ambiente (se puede dejar este punto a 4°C hasta el día siguiente).
- 18.- Eliminar la solución de lavado.
- 19.- Secado del DNA a temperatura ambiente hasta que toda la solución de lavado se evapore.
- 20.- Resuspensión del DNA añadiendo 800 µl de TE

21.- Disolución del DNA a temperatura ambiente al menos 1 h, o más si existen impurezas en el DNA, agitando muy suavemente de vez en cuando manteniendo a 4 °C (se puede dejar este punto hasta el día siguiente).

22.- Transferencia del DNA a un tubo de micro-centrífuga de 1,5 ml y centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos.

23.- Si no se observan visualmente impurezas en el fondo del tubo, no es necesario traspasar el sobrenadante a nuevos tubos de 1,5 ml. El DNA se puede guardar a 4°C (o a -20°C para largo plazo).

EXTRACCIÓN EN TUBOS DE 1,5 ML

1.- Poner un frasco con 50 ml de tampón de extracción en baño María a 65 °C.

2.- Cortar dos discos de material vegetal fresco sin nervaduras cerrando el tubo de 1,5 ml.

3.- Ultracongelar la muestra con nitrógeno líquido y triturar con ayuda de un taladro con broca de plástico.

4.- Antes de que se produzca la descongelación del tejido pulverizado, añadir 400 µl de tampón de extracción.

5.- Invertir 30 veces suavemente el tubo para un perfecto mezclado del tampón de extracción con el tejido vegetal.

6.- Incubar en baño María las muestras a 65°C durante 20 minutos (agitar suavemente de vez en cuando).

7.- Sacar los tubos del baño y dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

8.- Añadir de 400 µl de cloroformo : isoamil alcohol² (24:1) a cada tubo (en campana).

9.- Mezclar suavemente invirtiendo el tubo 20 – 30 veces (en campana).

10.- Centrifugar durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C.

11.- Transferir la fase superior a un tubo estéril de 1,5 ml. Repetir pasos 8, 9, 10 y 11.

12.- Precipitar el DNA añadiendo 400 µl de isopropanol (2-propanol) a temperatura de -20°C.

13.- Agitar suavemente y mantener el DNA en isopropanol (2-propanol) durante 10 minutos.

14.- Centrifugar a 8.000 rpm durante 5 minutos.

15.- Eliminar el isopropanol (2-propanol) y añadir 400 µl de la solución de lavado³ y agitar suavemente.

16.- Cambiar la solución de lavado después de una hora a temperatura ambiente (se puede dejar este punto a 4°C hasta el día siguiente).

17.- Eliminar la solución de lavado.

- 18.- Secado del DNA a temperatura ambiente hasta que toda la solución de lavado se evapore.
- 19.- Resuspensión del DNA añadiendo 200 μ l de TE⁴.
- 20.- Disolución del DNA a temperatura ambiente al menos 1 h, o más si existen impurezas en el DNA, agitando muy suavemente de vez en cuando manteniendo a 4 °C (se puede dejar este punto hasta el día siguiente).
- 21.- Transferencia del DNA a un tubo estéril de 1.5 ml y centrifugado a 12.000 rpm durante 5 minutos.
- 22.- Si no se observan visualmente impurezas en el fondo del tubo, no es necesario traspasar el sobrenadante a nuevos tubos de 1,5 ml. DNA que se puede guardar a 4°C (o a -20°C para largo plazo).

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN:

SOLUCIÓN BASE (Se puede guardar a temperatura ambiente)

- 1.- Verter 800 ml de agua destilada.
- 2.- Añadir productos (Cuadro II.1).
- 3.- Ajustar el pH a 9.5 con Na OH.
- 4.- Ajustar el volumen final a 990 ml.
- 5.- Pasar por autoclave.

Cuadro II.1. Solución base para el tampón de extracción.

Solución base	1 litro	Concentración
Tris Base	6.06 g	50 mM
NaCl	40.91 g	700 mM
EDTA	3,72 g	10 mM
SDS	10 .00 g	1%

TAMPÓN DE EXTRACCIÓN (Preparar justo antes de triturar el material vegetal)

- 1.- Incubar la solución base durante 10 o 15 minutos a 60°C para disolver bien el SDS.
- 2.- Separar la cantidad estimada para la sesión de extracción en frasco con tapón de rosca.
- 3.- Añadir el 2% de β -mercaptoetanol y el 5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP)
- 4.- Agitar bien.

Cuadro II. 2. Solución del tampón extracción de DNA.

Solución	Concentración	0,1 litros
Solución base	93 %	93 ml
β -mercaptoetanol	2 %	2 ml
PVPP	5 %	5 gr.

CLOROFORMO – ISOAMIL ALCOHOL (24 : 1) (Cuadro II.3)

Guardar en oscuridad a temperatura ambiente. Trabajar siempre en campana de extracción.

- 1.- En bote cristal con tapón de rosca verter
192 ml de cloroformo.
- 2.- Añadir 8 ml de Isoamil Alcohol.
- 3.- Agitar.
- 4.- Cubrir con papel de aluminio el bote para
que no penetre la luz.

Cuadro II.3. Solución de Cloroformo-Isoamil Alcohol.

Solución	Concentración	0,2 litros
Cloroformo	96 %	192 ml
Isoamil Alcohol	4 %	8 ml

SOLUCIÓN DE LAVADO DE DNA (Guardar en oscuridad a temperatura ambiente)

Preparación de la solución de Acetato amónico 5 M (Cuadro II.4)

- 1.- En matraz aforado de 100 ml se añaden
50 ml de H₂O millipore.
- 2.- Añadir 38,505 g de acetato amónico.
- 3.- Disolver con agitación y rellenar hasta
volumen con H₂O millipore.

Cuadro II. 4. Solución de Acetato amónico 5 M

Ac. amónico 5 M	Concentración	0,1 litros
H ₂ O millipore	50 %	50 ml
Acetato Amónico	5 M	38,505 g
H ₂ O millipore	≈11,4 %	Resto

Preparación de solución de lavado (Cuadro II.5)

- 1.- Verter en matraz aforado de 500 ml, 400
ml de etanol del 95%.
- 2.- Añadir 1 ml de acetato amónico 5M.
- 3.- Agitar y rellenar hasta volumen con H₂O
millipore.

Cuadro II.5. Solución de lavado

Solución de lavado	Concentración	0,5 litros
Etanol 95%	76%	400 ml
Acetato amónico 5 M	10 mM	1 ml
H ₂ O millipore	≈23%	Resto

TE pH 8.0 (Guardar a temperatura ambiente, pasar por autoclave después de prepararlo en alícuotas de 200 ml) (Cuadro II.6)

- 1.- Verter 800 ml de agua destilada en
matraz aforado de 1.000 ml.
- 2.- Añadir 1,21g de Tris Base
- 3.- Añadir 0,37 g de EDTA.
- 4.- Disolver mediante agitación.
- 5.- Ajustar pH a 8,0 con HCl.
- 6.- Rellenar hasta volumen con H₂O millipore.

- 7.- Pasar por autoclave en alícuotas de 200
ml.

Cuadro II.6. Preparación de solución TE

TE	Concentración	1 l
H ₂ O millipore	80 %	800 ml
Tris Base	10 mM	1,21 g
EDTA	1 mM	0,37 g
H ₂ O millipore	≈28,42 %	Resto

CUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO EXTRAIDO

El objetivo de la cuantificación del DNA extraído del material vegetal es la preparación de unas soluciones de DNA, llamadas de trabajo, de concentración conocida, con el fin de incluir en la reacción de PCR una cantidad conocida aproximada de DNA.

Para las extracciones realizadas se utilizó el espectrofotómetro de rango ultravioleta Gene Quant II de Pharmacia Biotech.

En primer lugar se deben preparar 70 μ l de solución del DNA extraído con un factor de dilución de 35. Para ello se añaden 68 μ l de TE y 2 μ l de DNA extraído en tubos de 0,5 ml. Se introduce la muestra en la cubeta Ultrospec de 70 μ l y se coloca en el portacubetas del aparato.

El aparato proporciona la cantidad de DNA de la extracción en μ g/ml al relacionar esta cantidad con la radiación ultravioleta que absorbe la disolución, de manera que una absorbancia a 260 nm igual a 1,0 corresponde con 50 μ g de DNA de cadena doble por ml de disolución. Anteriormente se ha dado al aparato como referencia la absorbancia de 70 μ l de TE.

También el aparato da una idea de la pureza del DNA extraído, de manera que el DNA puro tiene una relación entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm aproximadamente de 1,8.

Se consideran las lecturas fiables cuando las absorbancias oscilan entre 0,1 y 2,5.

DILUCIÓN DEL DNA GENÓMICO EXTRAIDO

Una vez conocida la concentración de cada extracción, se calcula el volumen necesario para obtener una concentración de 10 μ g/ml empleando la ecuación:

$$\text{Volumen inicial} \times \text{Concentración inicial} = \text{Volumen Final} \times \text{Concentración final}$$

Ejemplo: Se quiere crear una solución de trabajo de DNA de 200 μ l con una concentración de 10 μ g/ml, partiendo de una extracción de DNA de 450 μ g/ml:

$$\text{Volumen inicial} \times 450 \mu\text{g/ml} = 0,2 \text{ ml} \times 10 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Volumen inicial} = (0,2 \text{ ml} \times 10 \mu\text{g/ml}) / 450 \mu\text{g/ml} = 0,0044 \text{ ml} = 4,4 \mu\text{l}$$

De manera que se deben añadir 4,4 μ l de la extracción inicial de DNA a 195,6 μ l de TE pH 8, para conseguir una solución de trabajo de 10 μ g/ml.

Las soluciones de trabajo se deben guardar a una temperatura de -20°C.

SESIÓN PCR

1.- Agitar muy bien los tubos de SOLUCIÓN DE TRABAJO DE DNA obtenidos por dilución del DNA genómico total y centrifugarlas por unos segundos. Así se evita que el DNA se encuentre en la zona de evaporación-condensación.

2.- Preparar tubos estériles de 0,2 ml para las muestras de PCR en una gradilla.

3.- Preparar el PCR-MIX (Cuadro II.7)

4- Preparar un Eppendorf de 1,5 ml que contenga el total de mezcla (excepto el DNA) necesario para todas las muestras.

5- Repartir 17 μ l de PCR-MIX en cada tubo de 0,2 ml.

6- Añadir 8 μ l de solución de trabajo de DNA en cada tubo y mezclar bien con la micropipeta.

7.- Realizar el programa PCR en el termociclador (Fig. II.1)

8.- Conservar las reacciones PCR realizadas a -20°C hasta su electroforesis.

Cuadro II. 7. Creación del PCR-MIX

PCR-MIX	μ l por muestra
H ₂ O millipore estéril	8,05
Tampón 10 x de PCR	2,50
dNTPs	1,25
MgCl ₂	1,00
Cebador 1 (Forward)	2,00
Cebador 2 (Reverse)	2,00
Taq DNA polimerasa	0,20
<i>Volumen SubTOTAL</i>	<i>17,00</i>
Solución de trabajo de DNA	8,00
<i>Volumen total</i>	<i>25 μl</i>

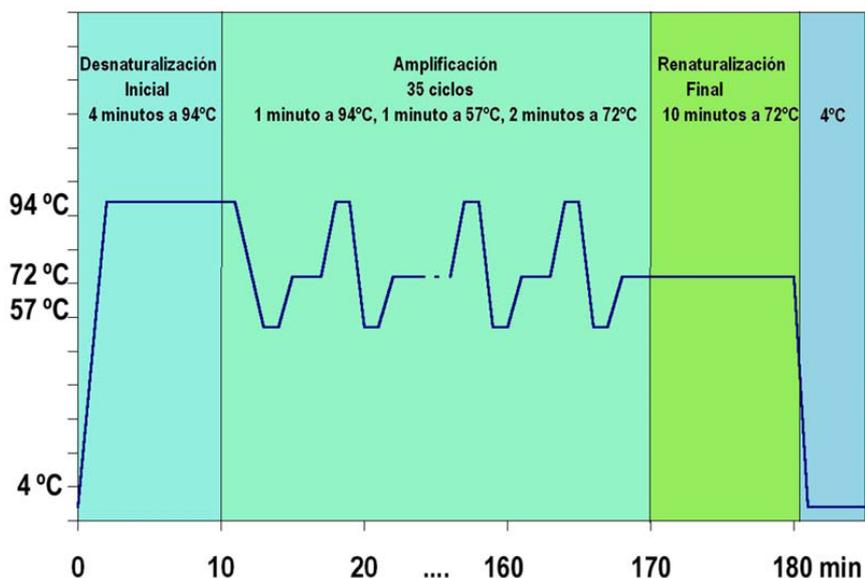


Fig. II.1 Programa realizado en el termociclador.

CREACIÓN DE LA SOLUCIÓN MEZCLA DE TRABAJO DE dNTPs

Para la reacción PCR se utilizó una mezcla de dNTPs (2'-desoxinucleósido 5' trifosfato) con una concentración final de 2mM, de manera que para cada reacción de PCR de un volumen de 25 μ l se añaden 1,25 μ l de la solución para alcanzar una concentración de 0.1 mM dNTP.

Se partió de un conjunto de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a una concentración de 100mM de la casa Invitrogen.

Para crear la solución se aplicó la fórmula anterior de:

$$\text{Volumen inicial} \times \text{Concentración inicial} = \text{Volumen Final} \times \text{Concentración final}$$

de manera que para crear una solución final de 250 μ l con concentración 2 mM de dNTPs:

$$\text{Volumen inicial} \times 100 \text{ mM} = 250\mu\text{l} \times 2\text{mM}$$

$$\text{Volumen inicial} = (250\mu\text{l} \times 2\text{mM}) / 100\text{mM} = 5 \mu\text{l de cada dNTP}$$

Por consiguiente se añade:

- dATP \rightarrow 5 μ l
- dCTP \rightarrow 5 μ l
- dGTP \rightarrow 5 μ l
- dTTP \rightarrow 5 μ l
- H₂O \rightarrow 230 μ l

RECONSTITUCIÓN DE LOS CEBADORES Y CREACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

Los cebadores se reciben liofilizados en cantidades en torno a 300 μ g. La etiqueta muestra la secuencia de bases y los datos del solicitante. Para su uso se deben reconstituir con la cantidad de TE pH 8 determinada, que se calcula en función del peso molecular del cebador para conseguir normalmente una concentración 100 μ M. A partir de ésta, se creará la solución de trabajo, en nuestro caso 2,6 mM. Ambas se conservaran a -20 °C.

Ejemplo de *reconstitución con el cebador CONF* (CHANNUNTAPITAT ET AL., 2001) recibido de Invitrogen:

Peso molecular: 6419

Peso del liofilizado: 206,62 μ g \approx 207 μ g

1 M \rightarrow 6419 g / 1000 ml TE

10⁶ μ M \rightarrow 6419 \times 10⁶ μ g / 1000 ml TE

100 μ M \rightarrow 641900 μ g / 1000 ml TE

207 μ g / X ml TE

X = 0,322 ml = 322 μ l TE pH=8 a añadir en el tubo del cebador para conseguir una concentración 100 μ M

Una vez reconstituido el cebador CONF con una concentración 100 μ M, se ha de crear una *Solución de trabajo CONF* de 500 μ l con una concentración 2,6 μ M:

Volumen inicial \times 100 μ M = 500 μ l \times 2,6 μ M; Volumen inicial = 13 μ l

500 μ l *Solución de trabajo CONF* = 13 μ l cebador CONF 100 μ M + 487 μ l agua

Para cada reacción PCR de 25 μ l se utilizaron 2 μ l de cada cebador con una concentración 2,6 mM, de manera que la concentración de cada cebador en cada reacción PCR es 0,2 mM.

TAQ DNA POLIMERASA (Invitrogen)

Es recomendable adquirir la Taq DNA polimerasa junto con la solución 25 mM de MgCl₂ y el Tampón 10X para la PCR. Se conserva bien a -20C y no se diluye. Como se utiliza 1 unidad por reacción de PCR, se añadirán 0.2µl de Taq al PCR-Mix ya que se adquiere a una concentración de 5 ud/µl. Como se adquieren 500 unidades implica que hay 100µl.

SOLUCIÓN 25mM DE MgCl₂

Se recibe conjuntamente con el Tampón 10X y la Taq Polimerasa, con un volumen total de 1,5 ml de solución 25mM de MgCl₂. Se conserva a -20C y durante su manejo se utiliza hielo para conservar su temperatura.

TAMPÓN 10X PARA PCR

Composición: 1,5 ml de solución 200 mM de Tris-HCl (pH 8,3) y 500 mM de KCl. Se recibe ya listo para tomar la cantidad deseada. Se conserva a -20C y durante su manejo se utiliza hielo para conservar su temperatura.

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN DE LA PCR

Mediante la electroforesis se pueden observar las amplificaciones del DNA de cada muestra.

CREACIÓN DEL GEL HORIZONTAL DE AGAROSA.

- 1.- Preparar el tampón TAE 50X como solución base y crear el volumen suficiente de la dilución TAE 1X para crear el gel y tampón de electroforesis.
- 2.- Pesar la agarosa en función de la concentración deseada en el gel y el tamaño de la cubeta de electroforesis. Para una cubeta de 300 ml de volumen y un gel con un 2% de agarosa, utilizados en este trabajo, se pesan 6 g de agarosa por gel.
- 3.- Disolver la agarosa en 300 ml de tampón TAE1X.
- 4.- Sellar con cinta adhesiva el molde del gel.
- 5.- Calentar hasta ebullición la solución de agarosa (unos 3 minutos en el microondas).
- 6.- Dejar enfriar la agarosa en agitación hasta 60-65 °C con hielo antes de verterla en la placa.
- 7.- Verter la agarosa en el molde del gel de la cubeta de electroforesis, colocar los peines y dejar enfriar a temperatura ambiente hasta su solidificación (10-15 minutos).
- 8.- Quitar la cinta adhesiva y colocar el molde con el gel dentro de la cubeta de electroforesis.
- 9.- Cubrir el gel con el tampón TAE1X y quitar los peines.

CARGADO DE LAS MUESTRAS EN EL GEL HORIZONTAL DE AGAROSA

- 1.- Descongelar las reacciones PCR.
- 2.- Agitar y centrifugar durante unos segundos a 4.000 rpm.
- 3.- Ordenar las reacciones de PCR en función del orden que van a tener en el gel, para evitar confusiones.
- 4.- Preparar en tubos de 0,5 ml las muestras para correr en el gel, a base 5 μ l de solución de azul de bromofenol + 10 μ l de la reacción PCR.
- 5.- Preparar la escalera con 5 μ l de azul de bromofenol + 5 μ l de escalera 123pb para cada pocillo que se quiera poner como escalera de referencia del peso molecular.
- 6.- Cargar con una micropipeta de 20 μ l los pocillos del gel de agarosa con los 15 μ l de muestra por pocillo y en los extremos los 10 μ l de la escalera, evitando burbujas al pipetear las muestras.

ELECTROFORESIS Y TINCIÓN

- 1.- Conectar la cubeta a la fuente de alimentación a 150 V durante unas 2-2,5 horas.
- 2.- Teñir el gel con bromuro de etidio (3-5 ppm) durante unos 15 minutos en agitación.
- 3.- Aclarar con agua destilada durante 15 minutos en agitación.
- 4.- Observar los resultados y captar la imagen en el transiluminador Gel Doc de Bio-Rad.

TAMPÓN CONCENTRADO TAE (TRIS ACETATO) 50X Y TAE 1X

- 1.- Crear la disolución de EDTA 0,5 M a pH 8 (hay que calentar para que se produzca la disolución del EDTA, antes de ajustar el pH) (Cuadro II.8).
- 2.- Preparar la solución del tampón concentrado TAE 50X. (Cuadro II.9)
- 3.- Crear la solución tampón TAE 1X, añadiendo a 980 ml de agua bidestilada 20 ml de tampón concentrado TAE 50X.

Cuadro II.8 Solución EDTA 0,5M

Na ₂ EDTA 0,5M	Concentración	1 l
H ₂ O millipore	80 %	800 ml
EDTA	0,5 M	186,13 g
NaOH 0,1N	Ajustar a pH 8	
H ₂ O millipore		Resto

Cuadro II.9 Tampón concentrado TAE 50X

TAE 50X	Concentración	1 l
H ₂ O millipore	50 %	500 ml
Tris base	2 M	242 g
Ac Acético	1M	57,1 ml
Na ₂ EDTA 0,5M	0,05 M	100 ml
H ₂ O millipore	≈10,9%	Resto

ESCALERA DE DNA DE 123PB (Invitrogen)

No se diluye, se conserva a -20C hasta 1 año. Sirve para relacionar el tamaño de los fragmentos de DNA amplificados con los tamaños de los fragmentos que tienen la escalera.

SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOFENOL

Para 50 ml de solución:

- 1.- Verter 20 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 100 ml.
- 2.- Añadir 20 g de sacarosa.
- 3.- Añadir 0,125 g de azul de bromofenol.
- 4.- Agitar durante 5 minutos para perfecta disolución.
- 5.- Añadir agua destilada hasta un volumen de 50 ml.
- 6.- Añadir gotas de KOH 0,5N hasta que cambie de color amarillento a azul.

BROMURO DE ETIDIO

Añadir a 1 litro de agua 100 μ l de solución comercial con concentración inicial de 10 mg/ml, de manera que la concentración final sea de 1 μ g/ml.

Cuadro II.10 Lista de productos utilizados para la utilización de la PCR.

PRODUCTO	CASA	CANTIDAD	NºCATALOGO
Trizma Base	SIGMA	1000 g	T6066
NaCl	SIGMA	500 g	S3014
EDTA	SIGMA	500 g	E5134
SDS	SIGMA	250 g	L4390
NaOH	SIGMA	500 g	S8045
β -mercaptoetanol	SIGMA	100 ml	M3148
PVPP	SIGMA	100 g	P5288
Cloroformo	SIGMA	3000 ml	C2432
Isoamil alcohol	SIGMA	500 ml	I9392
Etanol 95%	SIGMA	1gal	E7148
Acetato Amónico	SIGMA	100 g	A1542
Azul de bromofenol	SIGMA	5 g	B5525
Bromuro de etidio	SIGMA	5 ml	E1385
Ácido acético glacial	SIGMA	500 ml	A6283
Ácido bórico	SIGMA	500 g	B6768
Isopropanol (2-propanol)	SIGMA	500 ml	I9516
Taq DNA polimerasa	GIBCO BRL	500 UND	18038-067
dNTP Set	GIBCO BRL	4 x 25 μ l	10297-018
Agarosa	GIBCO BRL	500 g	15510-027
123bp DNA Ladder	GIBCO BRL	250 μ l	15613-029



Fig. II.2 Identificación de genotipos S mediante la amplificación de fragmentos de DNA procedentes de los genes S.
 A) Hojas jóvenes de almendro para la extracción de DNA.
 B) Soluciones y material estéril para la extracción de DNA.
 C) Proceso de extracción, después de la centrifugación del material incubado y mezclado con cloroformo-isoamil alcohol. La fase superior se separará y mezclará con isopropanol (2-propanol) para obtener la precipitación de DNA.
 D) Cuantificación de la extracción de DNA mediante el espectrofotómetro ultravioleta Gene Quant II.
 E) Termociclador GenAmp PCR System 9700 PE Applied Biosystems.
 F) Electroforesis en geles de agarosa de las reacciones PCR.
 G) Digitalización de resultados mediante el GenDoc 2000.

ANEJO III

FENOTIPO OBSERVADO Y GENOTIPO S DE LOS INDIVIDUOS DE LAS FAMILIAS ESTUDIADAS

Cuadro III.1 Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Tuono' (S_1S_1) x 'Ferragnès' (S_1S_3).

Individuo	M-1-78	M-1-79	M-1-80	M-1-81	M-1-82	M-1-83	M-1-84	M-1-85	M-1-86	M-1-87
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AI	AC	AI	AI	AI	DUD.	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3
S PCR	S_1S_3									
Individuo	M-1-88	M-1-89	M-1-90	M-1-91	M-1-92	M-1-93	M-1-94	M-1-95	M-1-96	M-1-97
Fenotipo Microscopía		AI	AC							
Genotipo S-RNasas	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3
S PCR	S_1S_3									
Individuo	M-1-98	M-1-99	M-2-1	M-2-2	M-2-3	M-2-4	M-2-5	M-2-6	M-2-7	M-2-8
Fenotipo Microscopía	AC		AC	AC	AI	AI	AI	AI	AI	AI
Genotipo S-RNasas	S_1S_3		S_1S_3							
S PCR	S_1S_3									
Individuo	M-2-9	M-2-10	M-2-11	M-2-12	M-2-13	M-2-14	M-2-15			
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC	AC		AI	AI			
Genotipo S-RNasas	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3			
S PCR	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3			

Cuadro III.2 Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Ferragnès' (S_1S_3) x 'Tuono' (S_1S_1).

Individuo	M-2-16	M-2-17	M-2-18	M-2-19	M-2-20	M-2-21	M-2-22	M-2-23	M-2-24	M-2-25
Fenotipo Microscopía	AC									
Genotipo S-RNasas	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1
S PCR	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1
Individuo	M-2-26	M-2-27	M-2-28	M-2-29	M-2-30	M-2-31	M-2-32	M-2-33	M-2-34	M-2-35
Fenotipo Microscopía	AC	AC		AC	AC	AC	AC	AC	AC	
Genotipo S-RNasas	S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1		S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1
S PCR	S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1
Individuo	M-2-36	M-2-37	M-2-38	M-2-39	M-2-40	M-2-41	M-2-42	M-2-43	M-2-44	M-2-45
Fenotipo Microscopía	AC		AC		AC	AC			AC	DUD.
Genotipo S-RNasas	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1		S_3S_1		S_3S_1	S_3S_1	S_3S_1	S_1S_1
S PCR	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1						
Individuo	M-2-46	M-2-47	M-2-48	M-2-49	M-2-50	M-2-51	M-2-52	M-2-53	M-2-54	
Fenotipo Microscopía		AC	AC		AC		AC	AC	AC	
Genotipo S-RNasas		S_1S_1	S_1S_1		S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	
S PCR	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_3S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	S_1S_1	

Cuadro III.3 Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Tuono' (S_1S_1) x 'Ferralise' (S_1S_3).

Individuo	M-2-55	M-2-56	M-2-57	M-2-58	M-2-59	M-2-60	M-2-61	M-2-62	M-2-63	M-2-64
Fenotipo Microscopía	AI		AC	AI						
Genotipo S-RNasas	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3						
S PCR	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3						
Individuo	M-2-65	M-2-66	M-2-67	M-2-68	M-2-69	M-2-70	M-2-71	M-2-72	M-2-73	M-2-74
Fenotipo Microscopía	AC	AI	AC	AI						
Genotipo S-RNasas	S_1S_3									
S PCR	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3		S_1S_3	S_1S_3	S_1S_3
Individuo	M-2-75	M-2-76								
Fenotipo Microscopía	AC	AI								
Genotipo S-RNasas	S_1S_3	S_1S_3								
S PCR	S_1S_3									

Cuadro III.4 Fenotipo y genotipo S en la progenie de 'Ferralise' (S₁S₂) x 'Tuono' (S₁S₁).

Individuo	L-2-72	L-2-73	L-2-74	L-2-75	L-2-76	L-2-77	L-2-78	L-2-79	L-2-80	L-2-81
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC	DUD.	AC	AI	AC	AI	DUD.	AC
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁			
S PCR	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
Individuo	L-2-82	L-2-83	L-2-84	L-2-85	L-2-86	L-2-87	L-2-88	L-2-89	L-2-90	L-2-91
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC			AC	DUD.	DUD.	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁		S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
S PCR	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁		S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
Individuo	L-2-92	L-2-93	L-2-94	L-2-95	L-2-96	L-2-97	L-2-98	L-2-99	L-3-1	L-3-2
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC	AC	AC	DUD.	AC	AC	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁			
S PCR	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁			
Individuo	L-3-3	L-3-4	L-3-5	L-3-6	L-3-7	L-3-8	L-3-9	L-3-10	L-3-11	L-3-12
Fenotipo Microscopía	AC	DUD.								
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
S PCR	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
Individuo	L-3-13	L-3-14	L-3-15	L-3-16	L-3-17	L-3-18	L-3-19	L-3-20	L-3-21	L-3-22
Fenotipo Microscopía	AI	DUD.	DUD.	AC	AC	AI	AC	AC	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S ₂ S ₂	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁		S ₁ S ₁
S PCR	S ₂	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁		S ₁ S ₁
Individuo	L-3-23	L-3-24	L-3-25	L-3-26	L-3-27	L-3-28	L-3-29	L-3-30	L-3-31	L-3-32
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC	AI	AC	AC	AC	AC	AC	AI
Genotipo S-RNasas	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
S PCR	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁
Individuo	L-3-33	L-3-34	L-3-35	L-3-36	L-3-37	L-3-38	L-3-39	L-3-40	L-3-41	L-3-42
Fenotipo Microscopía	AC	AI	AC	AC						
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁				
S PCR	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁				
Individuo	L-3-43	L-3-44	L-3-45	L-3-46	L-3-47	L-3-48	L-3-49	L-3-50	L-3-51	L-3-52
Fenotipo Microscopía	AC	AC	DUD.	AC	AI	AC	AC	AC	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁				
S PCR	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁				
Individuo	L-3-53	L-3-54	L-3-55	L-3-56	L-3-57	L-3-58	L-3-59	L-3-60	L-3-61	L-3-62
Fenotipo Microscopía	AC	AC	AC	AI	AC	AC	DUD.	AC	AC	AC
Genotipo S-RNasas	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁			
S PCR	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁	S ₂ S ₁	S ₁ S ₁	S ₂ S ₁			
Individuo	L-3-63									
Fenotipo Microscopía	AC									
Genotipo S-RNasas	S ₂ S ₁									
S PCR	S ₂ S ₁									

ANEJO IV INFORMACIÓN ADICIONAL AL APARTADO 8

Cuadro IV.1 Análisis de varianza del crecimiento de los tubos polínicos para cada día de muestreo.

	G.L.	Porción del estilo recorrida por los tubos polínicos				Longitud de los tubos polínicos				
		S.C.	Varianza	F	N.S.	S.C.	Varianza	F	N.S.	
Individuos en conjunto	Día 1 (24h.)									
	Individuo	8	891,1	111,3	12,1	***	20,082	2,510	5,21	***
	Polinización	2	210,1	105,0	11,4	***	7,290	3,645	7,57	***
	Individuo x Polinización	16	658,6	41,1	4,4	***	31,728	1,983	4,12	***
	Error	189	1740,0	9,2			91,056	0,481		
	Total	215	3500,0				150,156			
	Día 2 (48h.)									
	Individuo	8	1345,0	168,1	6,5	***	62,900	7,862	6,27	***
	Polinización	2	163,0	81,5	3,1	*	14,483	7,241	5,77	**
	Individuo x Polinización	16	1823,4	113,9	4,4	***	95,107	5,944	4,74	***
	Error	189	4828,3	25,5			237,121	1,254		
	Total	215	8159,9				409,613			
	Día 3 (72h.)									
	Individuo	8	5260,6	657,5	9,7	***	91,204	11,400	7,22	***
	Polinización	2	1874,9	937,4	13,8	***	106,088	53,044	33,60	***
	Individuo x Polinización	16	2271,0	141,9	2,1	***	82,082	5,130	3,25	***
Error	189	12766,0	67,5			298,370	1,578			
Total	215	22172,8				577,745				
Día 4 (96h.)										
Individuo	8	6529,5	816,1	29,2	***	164,805	20,600	26,02	***	
Polinización	2	467,3	233,6	8,3	***	1,135	0,567	0,72	n.s.	
Individuo x Polinización	16	3291,1	205,6	7,3	***	62,205	3,887	4,19	***	
Error	189	5278,5	27,9			149,651	0,791			
Total	215	15566,6				377,799				
Individuos con genotipo S/Sr	Día 1 (24h.)									
	Individuo	4	343,4	85,8	10,30	***	10,153	2,538	6,44	***
	Polinización	2	130,6	65,3	7,84	***	2,458	1,229	3,12	*
	Individuo x Polinización	8	235,0	29,3	3,53	***	14,055	1,756	4,46	***
	Error	105	875,1	8,3			41,398	0,394		
	Total	119	1584,3				68,065			
	Día 2 (48h.)									
	Individuo	4	477,3	119,3	6,30	***	24,208	6,052	4,93	***
	Polinización	2	14,9	7,4	0,39	n.s.	0,774	0,387	0,32	n.s.
	Individuo x Polinización	8	1159,7	144,9	7,65	***	67,408	8,426	6,86	***
	Error	105	1988,4	18,9			128,951	1,228		
	Total	119	3640,4				221,343			
	Día 3 (72h.)									
	Individuo	4	1799,2	449,8	8,92	***	7,185	1,796	1,62	n.s.
	Polinización	2	613,8	306,9	6,09	**	47,918	23,959	21,60	***
	Individuo x Polinización	8	1535,7	191,9	3,81	***	70,566	8,820	7,95	***
Error	105	5295,2	50,4			116,482	1,109			
Total	119	9243,9				242,152				
Día 4 (96h.)										
Individuo	4	4818,3	1204,5	31,19	***	12,842	3,210	3,54	***	
Polinización	2	1027,4	513,7	13,30	***	4,468	2,284	2,52	n.s.	
Individuo x Polinización	8	2521,6	315,2	8,16	***	47,053	5,881	6,49	***	
Error	105	4054,6	38,6							
Total	119	12422,1								
Individuos con genotipo S/Sr	Día 1 (24h.)									
	Individuo	3	504,4	168,1	16,33	***	9,917	3,305	5,59	***
	Polinización	2	106,8	53,4	5,19	**	5,993	2,996	5,07	**
	Individuo x Polinización	6	396,3	66,0	6,42	***	16,511	2,751	4,66	***
	Error	84	864,8	10,29			49,657	0,591		
	Total	95	1872,4				82,080			
	Día 2 (48h.)									
	Individuo	3	828,4	276,1	8,17	***	28,031	9,343	7,26	***
	Polinización	2	269,3	134,6	3,98	*	22,423	11,211	8,71	***
	Individuo x Polinización	6	542,6	90,4	2,67	*	18,985	3,164	2,46	*
	Error	84	2839,8	33,8			108,170	1,287		
	Total	95	4480,2				177,609			
	Día 3 (72h.)									
	Individuo	3	3010,3	1003,4	11,28	***	64,092	21,364	9,87	***
	Polinización	2	1447,6	723,8	8,14	***	60,470	30,235	13,96	***
	Individuo x Polinización	6	548,8	91,4	1,03	n.s.	9,216	1,536	0,71	n.s.
Error	84	7470,8	88,9			181,887	2,165			
Total	95	12477,7				315,666				
Día 4 (96h.)										
Individuo	3	149,3	49,7	3,42	*	58,154	19,384	29,85	***	
Polinización	2	85,2	42,6	2,63	n.s.	2,041	1,020	1,57	n.s.	
Individuo x Polinización	6	124,0	20,6	1,42	n.s.	9,677	1,612	2,48	*	
Error	84	1223,9	14,5			54,552	0,649			
Total	95	1582,5				124,426				

Significación: * 5% > p > 1% ** 1% > p > 1% *** 1% > p

G.L. = Grados de libertad S.C. = Suma de cuadrados N.S. = Nivel de significación

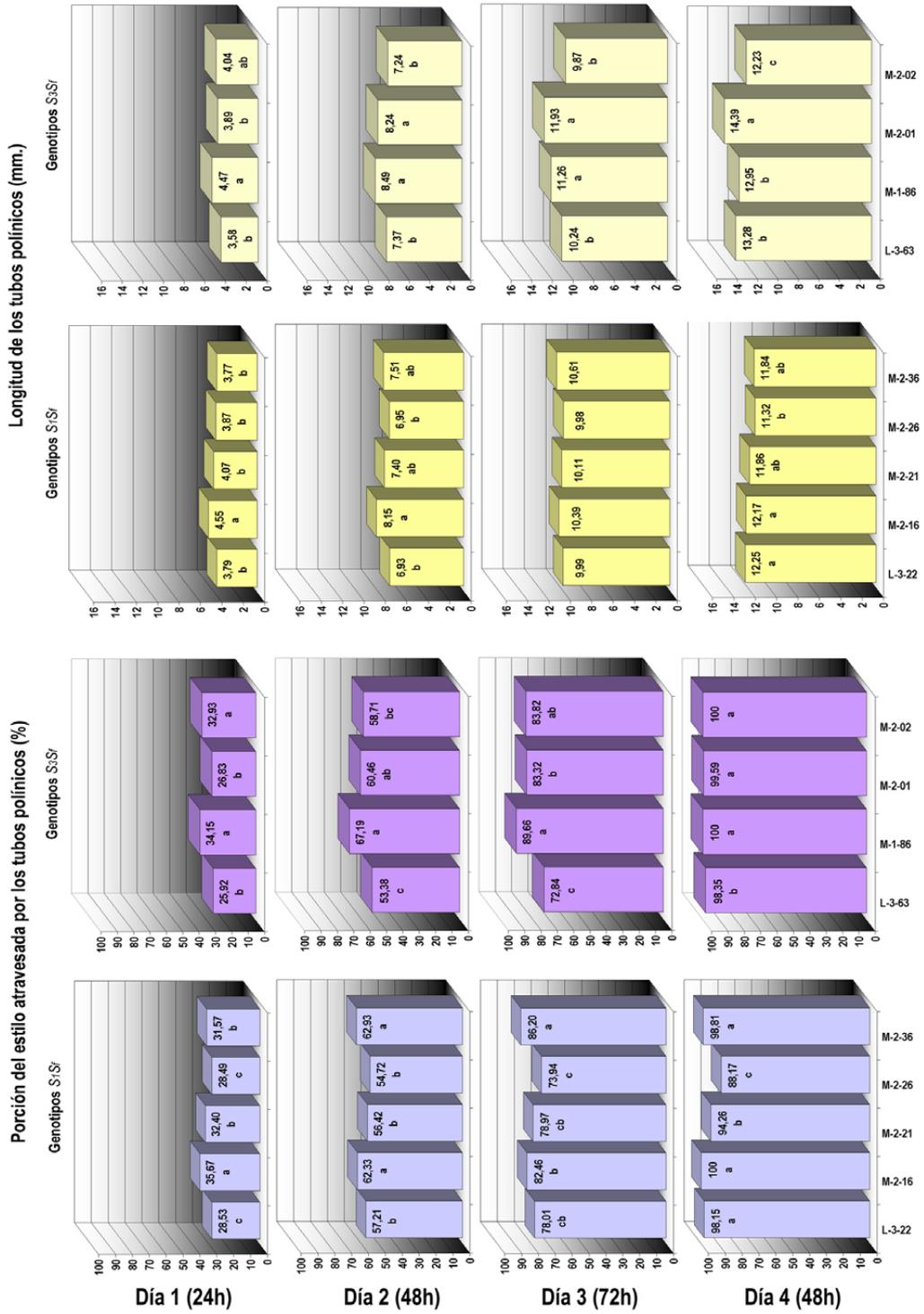


Fig. IV.1 Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en el conjunto de los tipos de polinización según el genotipo S de los individuos (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha=0,05$).

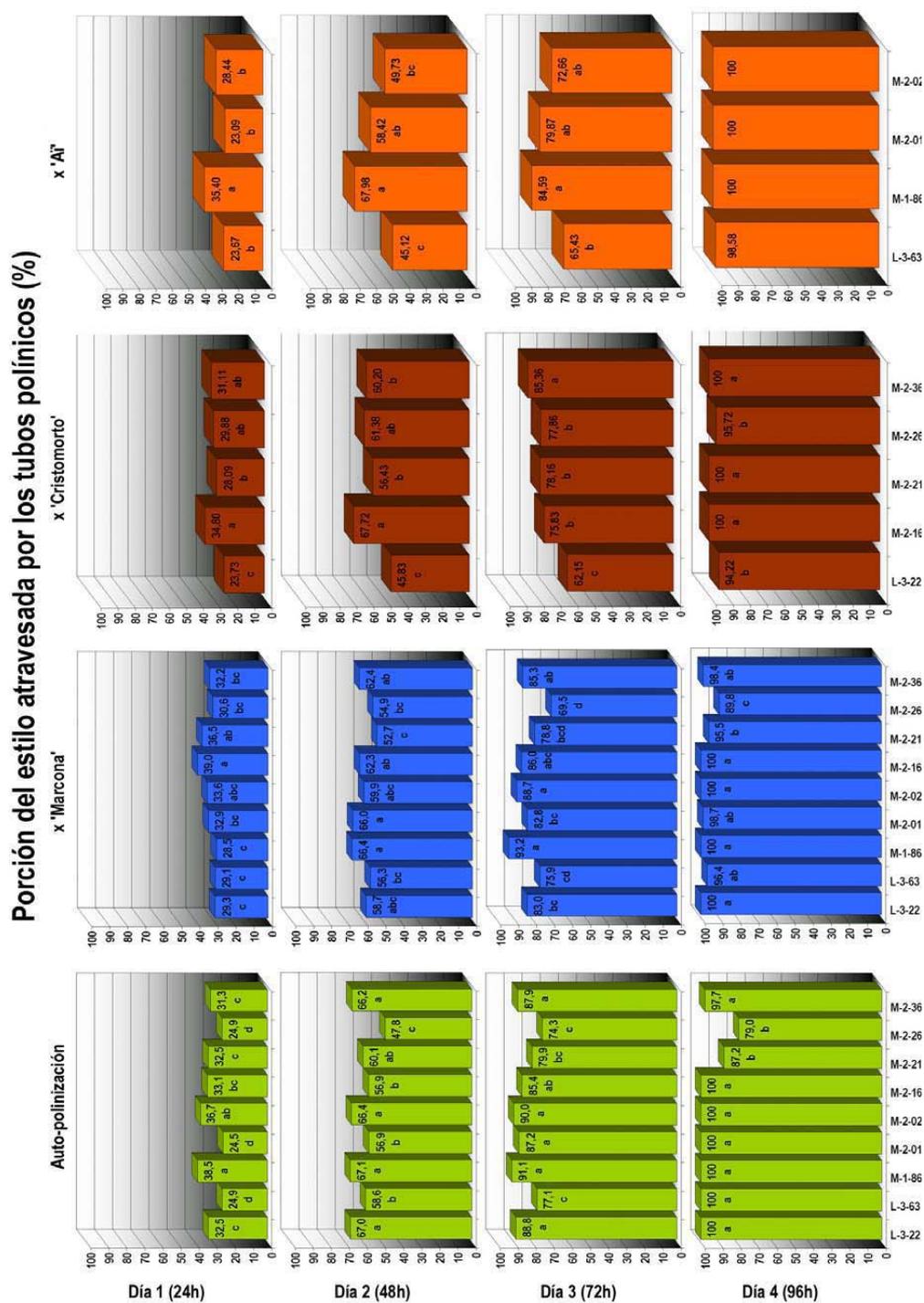


Fig. IV.2 Evolución de la porción del estilo atravesada (%) por los tubos polínicos en los individuos en los diferentes tipos de polinización (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha = 0,05$)

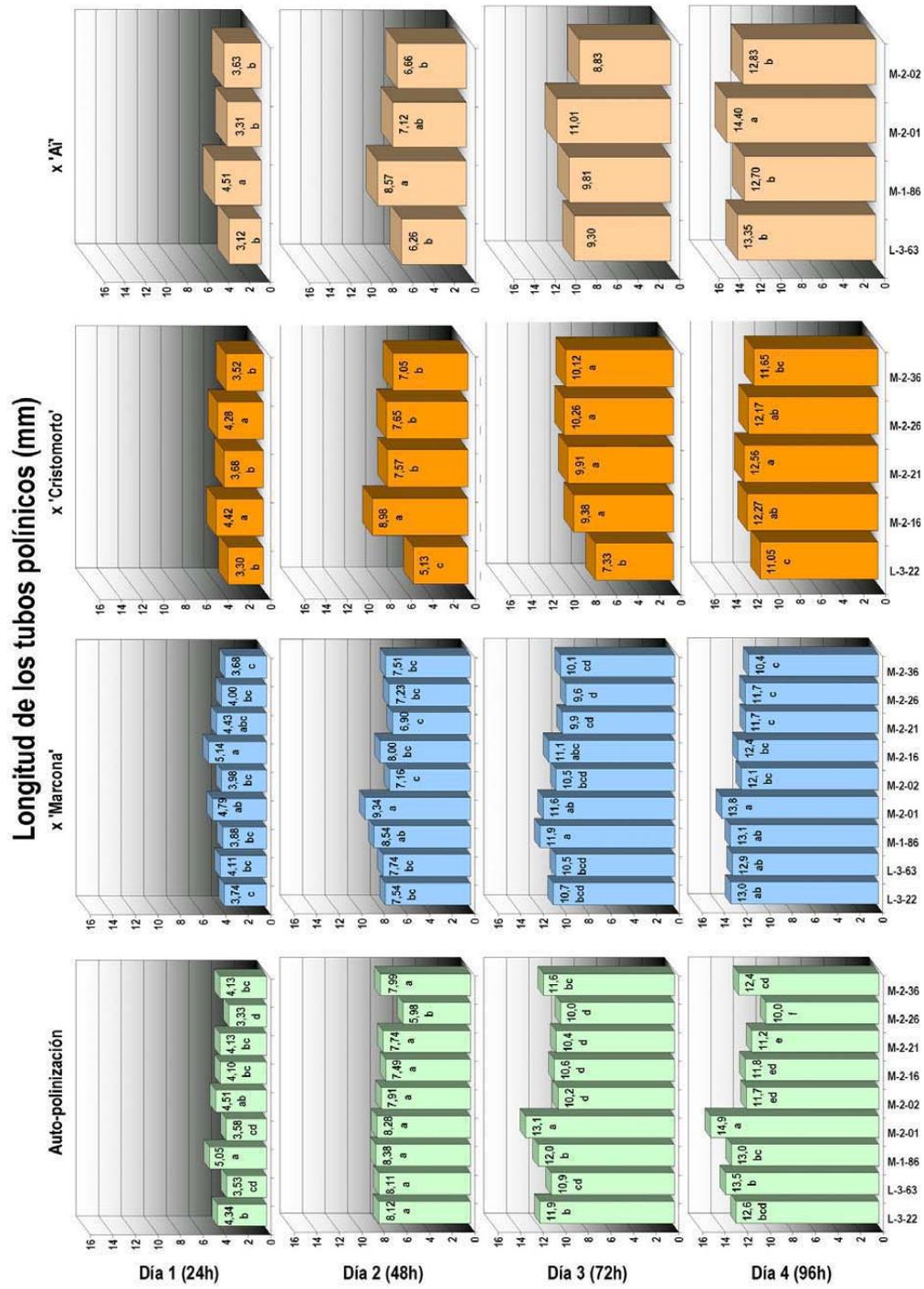


Fig. IV.3 Evolución de la longitud de los tubos polínicos (mm) en los individuos en los diferentes tipos de polinización (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha = 0,05$)

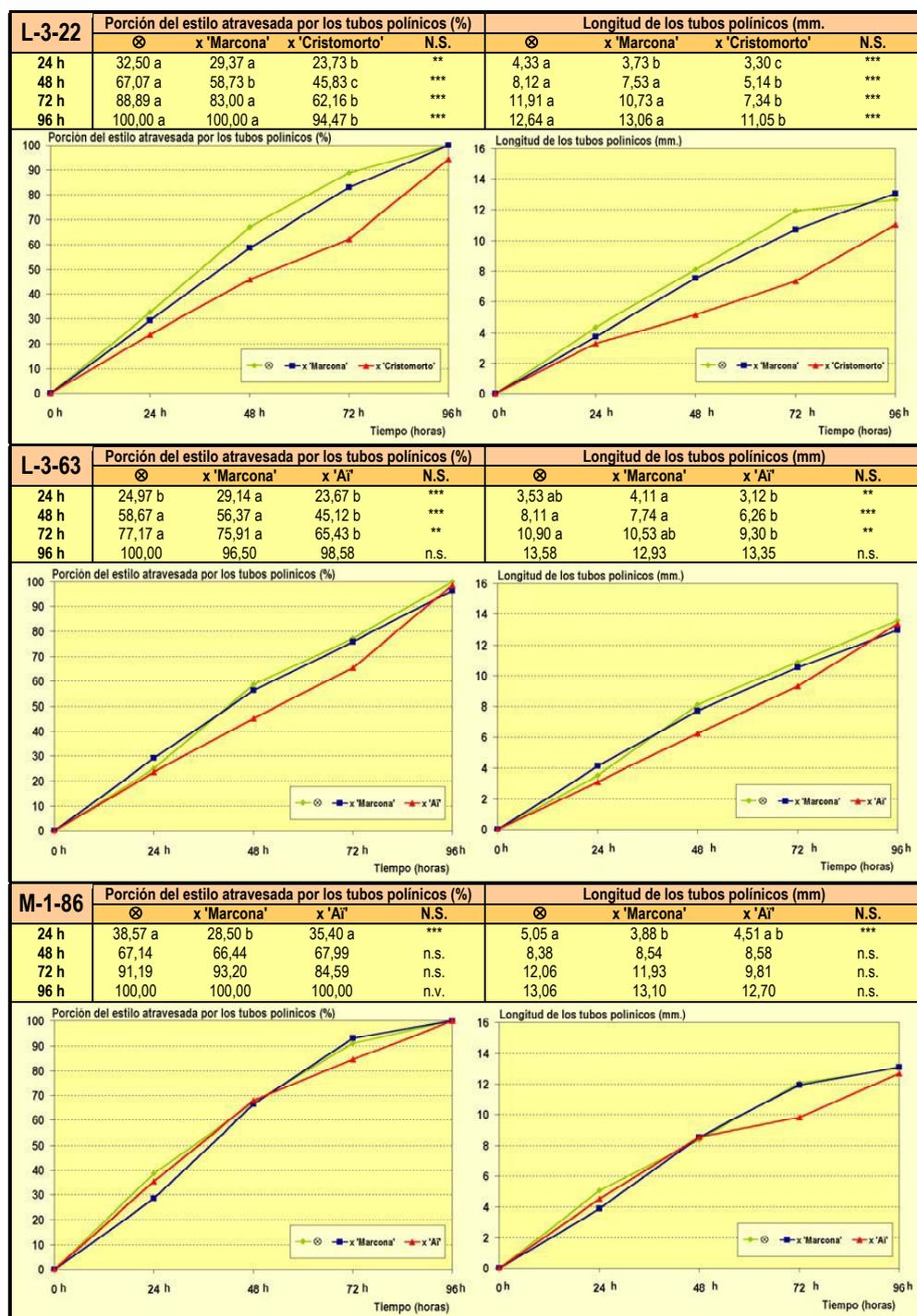


Fig.IV.4 Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'L-3-22', 'L-3-63' y 'M-1-86' (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha=0,05$)

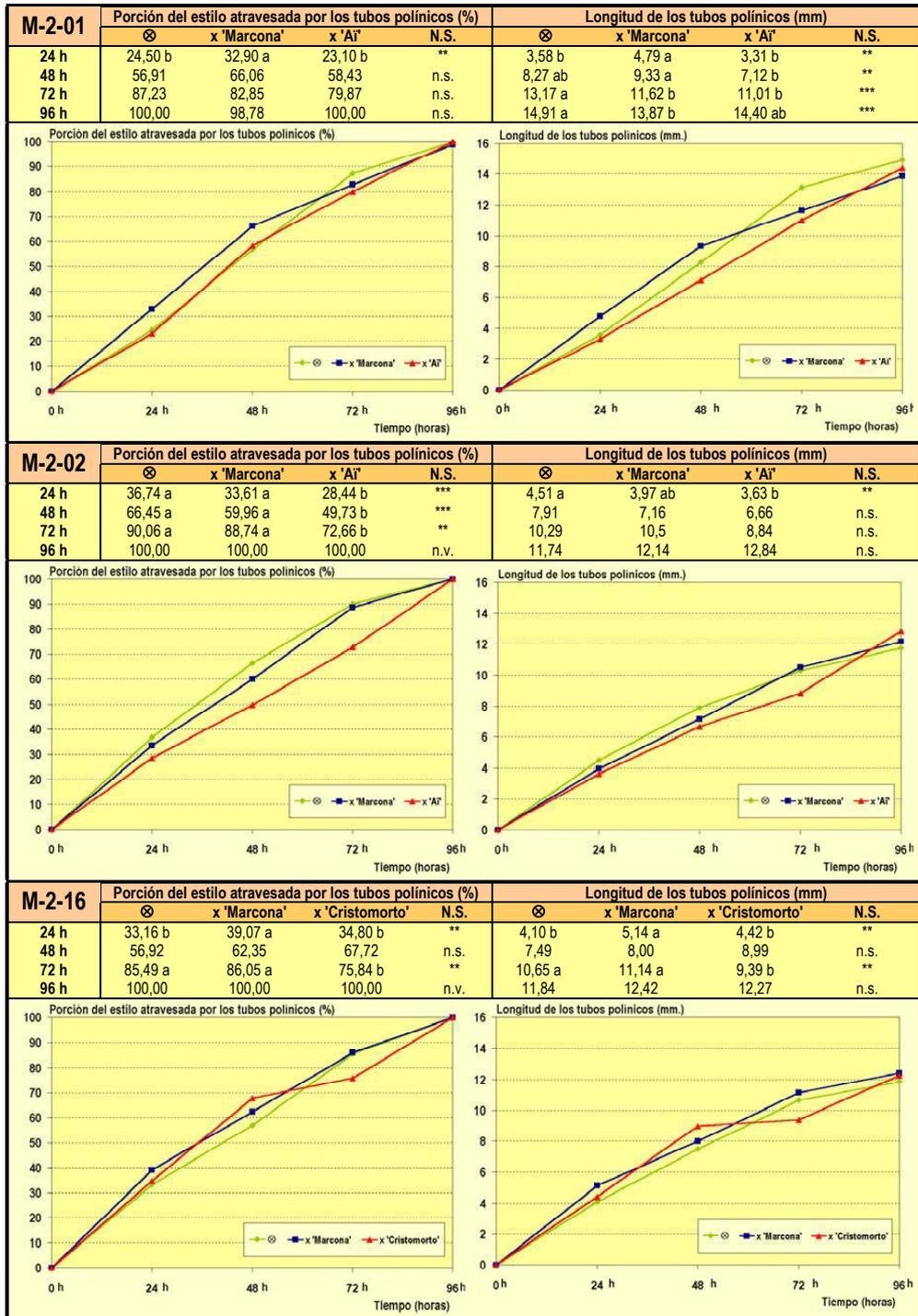


Fig.IV.5 Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'M-2-01', 'M-2-02' y 'M-2-16' (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha=0,05$)

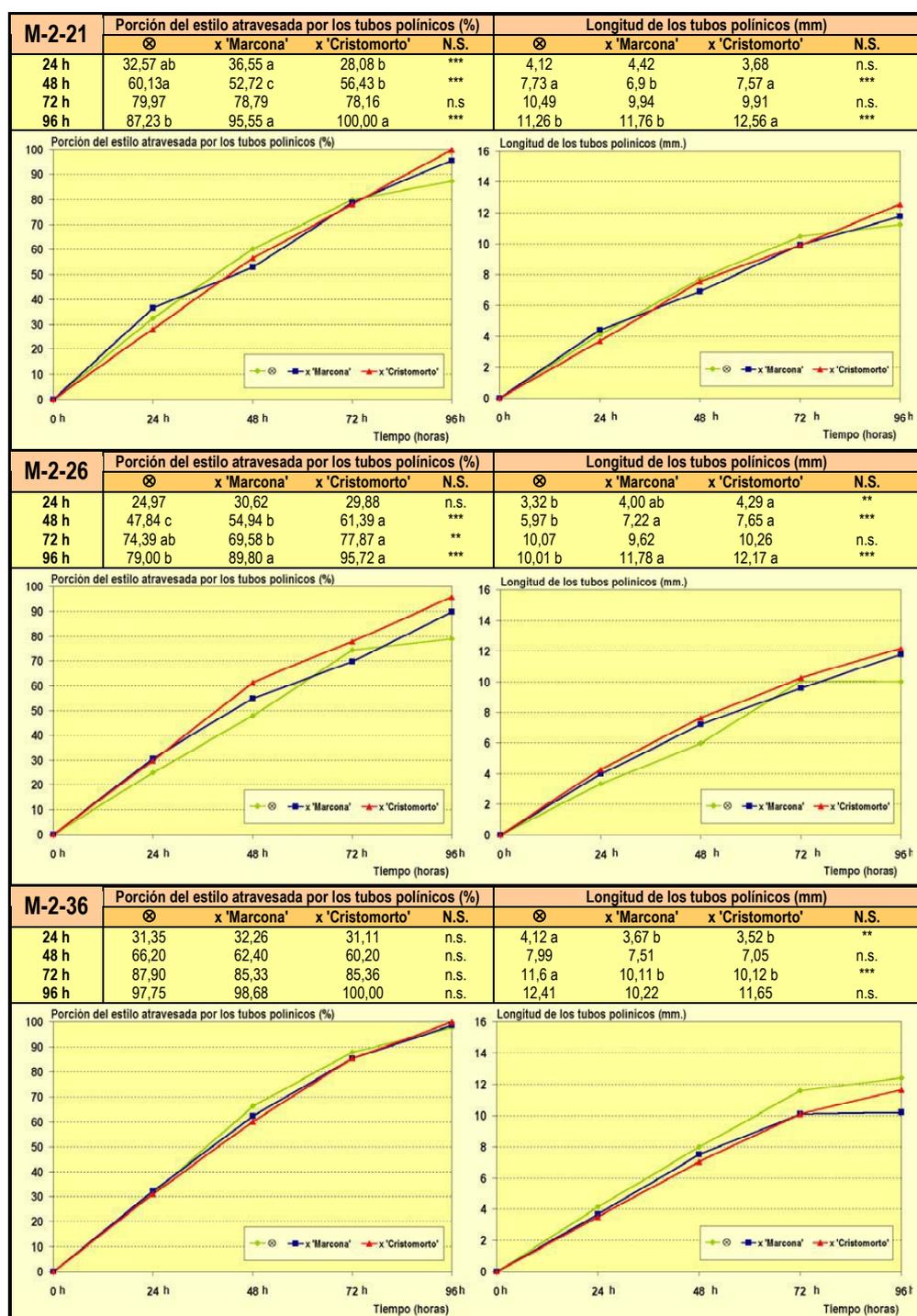


Fig.IV.6 Evolución del crecimiento de los tubos polínicos en los individuos 'M-2-21', 'M-2-26' y 'M-2-36' (separación de medias mediante el test de Duncan $\alpha = 0,05$)

Cuadro IV.2 Velocidad media de los tubos polínicos en cada individuo para cada intervalo y tipo de polinización (mm/h).

Autopolinización						x 'Marcona'					
Tiempo	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	Promedio individuo	Tiempo	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	Promedio individuo
Individuo						Individuo					
L-3-22	0,180 b	0,157 ab	0,138 bcd	0,030 bc	0,126	L-3-22	0,155 c	0,158abc	0,133	0,114 ab	0,140
L-3-63	0,146 cd	0,190 a	0,116 cd	0,111 a	0,141	L-3-63	0,171 bc	0,151 abc	0,116	0,096 a	0,134
M-1-86	0,210 a	0,138 bc	0,153 bc	0,041 bc	0,136	M-1-86	0,161 bc	0,194 a	0,141	0,048 d	0,136
M-2-01	0,149 cd	0,195 a	0,203 a	0,072 ab	0,155	M-2-01	0,199 ab	0,189 a	0,095	0,103 ab	0,147
M-2-02	0,188 ab	0,141 bc	0,099 d	0,060 b	0,122	M-2-02	0,165 bc	0,133 bc	0,139	0,068 cd	0,126
M-2-16	0,170 bc	0,141 bc	0,131 bcd	0,049 b	0,123	M-2-16	0,214 a	0,119 bc	0,130	0,053 cd	0,129
M-2-21	0,171 bc	0,150 b	0,114 cd	0,032 bc	0,117	M-2-21	0,184abc	0,102 c	0,126	0,075abcd	0,122
M-2-26	0,138 d	0,110 c	0,170 ab	-0,002 c	0,104	M-2-26	0,166 bc	0,134 bc	0,099	0,089 abc	0,122
M-2-36	0,171 bc	0,160 ab	0,150 bc	0,033 bc	0,129	M-2-36	0,153 c	0,159 ab	0,108	0,056 cd	0,119
Promedio por día	0,169	0,154	0,142	0,047	0,128	Promedio por día	0,174	0,149	0,121	0,078	0,130
x 'Cristomorto'						x 'Ai'					
Tiempo	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	Promedio individuo	Tiempo	De 0 a 24 horas	De 24 a 48 horas	De 48 a 72 horas	De 72 a 96 horas	Promedio individuo
Individuo						Individuo					
L-3-22	0,137 b	0,076 c	0,091 a	0,155 a	0,115	L-3-63	0,130 b	0,130	0,126 ab	0,168 a	0,139
M-2-16	0,184 a	0,190 a	0,017 b	0,120 b	0,128	M-1-86	0,188 a	0,169	0,051 b	0,120 b	0,132
M-2-21	0,153 b	0,162 ab	0,097 a	0,110 b	0,131	M-2-01	0,138 b	0,158	0,161 a	0,141 ab	0,150
M-2-26	0,178 a	0,140 b	0,108 a	0,079 c	0,126	M-2-02	0,151 b	0,126	0,089 ab	0,166 a	0,133
M-2-36	0,146 b	0,147 ab	0,128 a	0,063 c	0,121						
Promedio por día	0,160	0,143	0,088	0,105	0,124	Promedio por día	0,152	0,146	0,107	0,149	0,138

Velocidad media (mm/h)

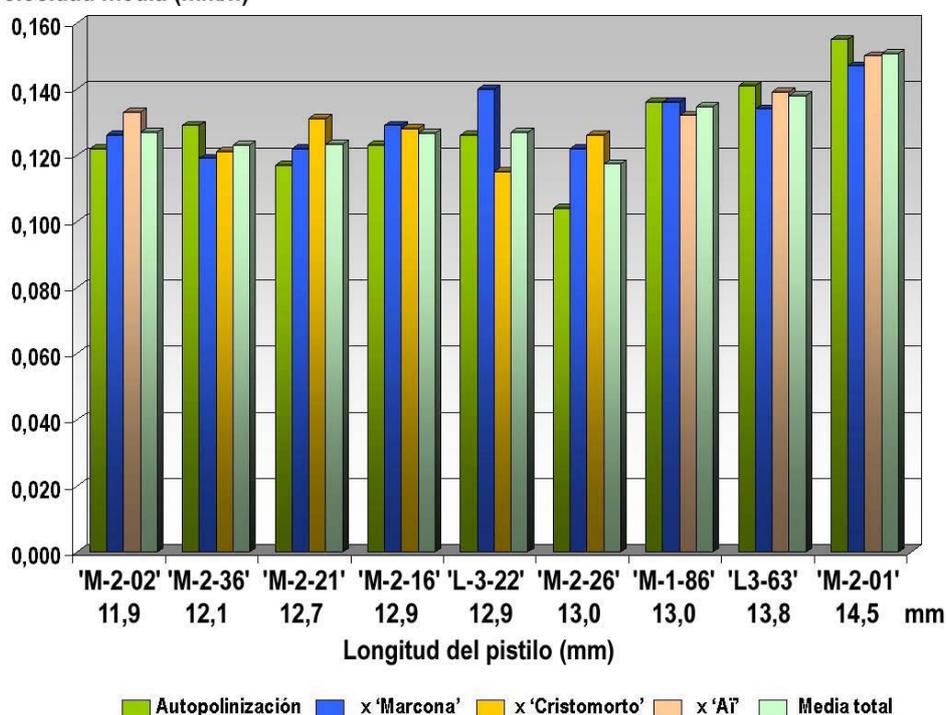


Fig. IV.7 Relación entre la velocidad media de crecimiento de los tubos polínicos y la longitud del pistilo en los individuos.

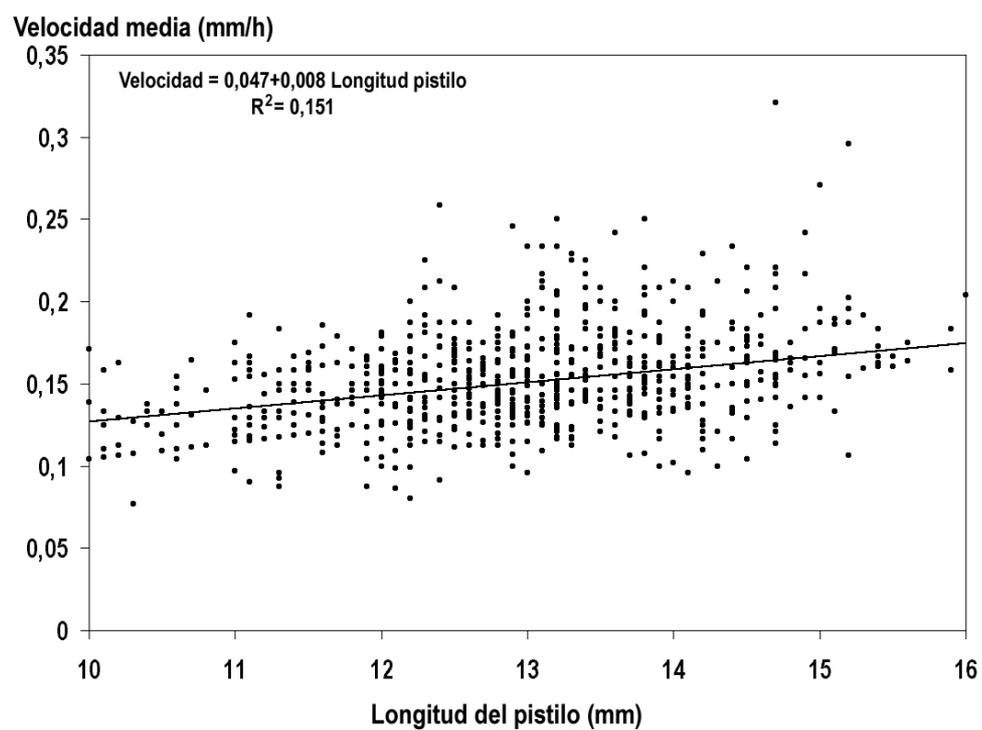


Fig. IV.8 Relación entre la velocidad media de crecimiento de los tubos polínicos y la longitud del pistilo.

