

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD GENÉTICA EN VARIEDADES DE
ALEMENDRO MEDIANTE OBSERVACIÓN DEL TUBO POLÍNICO**

ALEJANDRA ANTONIA NÚÑEZ FONTECILLA

SANTIAGO-CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD GENÉTICA EN VARIEDADES DE
ALEMENDRO MEDIANTE OBSERVACIÓN DEL TUBO POLÍNICO**

**POLLEN COMPATIBILITY OF ALMOND VARIETIES EVALUATED
THROUGH OBSERVATION OF POLLEN TUBE GROWTH**

ALEJANDRA ANTONIA NÚÑEZ FONTECILLA

SANTIAGO-CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD GENÉTICA EN VARIEDADES DE ALMENDRO
MEDIANTE OBSERVACIÓN DEL TUBO POLÍNICOMemoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo
Mención: Fruticultura

ALEJANDRA ANTONIA NÚÑEZ FONTECILLA

PROFESOR GUÍA	Calificaciones
Sr. Gabino Reginato M. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.	6,3
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Rodrigo Infante E. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,2
Sr. Claudio Pastenes V. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.	7,0

Santiago, Chile. 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía, Gabino Reginato, por su colaboración, sabiduría y disposición en la realización de esta memoria, además de su meticulosidad en las correcciones e infinita paciencia.

A Gabriel León, del laboratorio de reproducción y desarrollo de plantas y profesor asistente de la Universidad Andrés Bello, quien con mucha generosidad me facilitó los materiales e instrumentos del laboratorio y me guió en el proceso de observación de las muestras; sin su ayuda y buena disposición esta memoria no hubiera podido llegar a término.

A Daniel Otero, por su colaboración y generosidad.

A la empresa “The Andes Nursery Association”, por las facilidades otorgadas en la realización de este estudio.

A mi familia, en especial a mis padres, mi marido y mis hijos, Benjamín y Valentina, quienes, en todo momento, me entregaron la energía para poder terminar este proceso.

A mis amigas, Roma y Tania, por estar y ayudarme siempre.

ÍNDICE

RESUMEN	3
Palabras clave	3
ABSTRACT	4
Key Words	4
INTRODUCCIÓN	5
Antecedentes generales	5
Compatibilidad	7
Evaluación de la compatibilidad	7
Incompatibilidad	8
Hipótesis	11
Objetivo	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Materiales	12
Método	12
Caracterización de la floración (2011)	12
Estudio de compatibilidad 2005 y 2011	13
Obtención del polen	14
Viabilidad del polen	14
Polinización manual	14
Fijación de las muestras	15
Observación de tubos polínicos	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
Ensayo año 2005	17
Condiciones para la germinación del polen y desarrollo del tubo polínico	17
Viabilidad del polen	17
Extracción del polen	18
Deshidratación del polen	18
Conservación del polen	18
Receptividad del estigma	18
Procedimiento utilizado para la observación de tubos polínicos	19

Ensayo año 2011	20
Caracterización de la floración	20
Viabilidad del polen	22
Observación de tubos polínicos	23
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA	26
ANEXOS	31

RESUMEN

El almendro es una especie predominantemente autoincompatible entre algunas de sus variedades, lo que obliga a los productores a establecer huertos con al menos dos variedades intercompatibles. Esta incompatibilidad actúa para prevenir la autofecundación, la que es del tipo gametofítica, por la expresión de proteínas específicas dentro de los estilos. Es por esto que es de suma importancia conocer la compatibilidad entre las variedades, existiendo diversos métodos para determinarla. En los últimos años, se ha establecido la compatibilidad a través de evaluaciones moleculares, que utilizan técnicas específicas para determinar el genotipo S de cada variedad, y han existido avances importantes en el desarrollo de técnicas biológicas para la determinación de la compatibilidad.

Durante la floración del año 2011, con las variedades de almendro Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Nonpareil, Fritz, Wood Colony, Carmel, Thompson, Sonora, Solano, Masbovera, Francolí, Price, Ne plus Ultra, Glorieta y Marcona, se utilizó la técnica propuesta por Mori *et al.* (2006), basada en el protocolo del laboratorio Daphne Preuss, para determinar la compatibilidad entre ‘Marcona’ y 14 variedades de almendro. Esta técnica está basada en la tinción de la callosa de los tubos polínicos con anilina azul, permitiendo la observación del crecimiento, utilizando microscopio de fluorescencia.

Además, se realizó un seguimiento de los estados fenológicos de las variedades analizadas, en campo, determinando que Desmayo Rojo, Thompson, Glorieta, Masbovera y Francolí coincidieron en menos de 5 días con la floración de ‘Marcona’.

Se determinó la compatibilidad de todas las variedades con Marcona, resultando compatible con las 14 variedades ensayadas. Los resultados concuerdan con los análisis genéticos moleculares encontrados en diversos estudios, validando a este método como una herramienta para determinar compatibilidad, sobre todo en variedades donde aún los alelos S no han sido identificados.

Palabras clave: *Prunus dulcis*, incompatibilidad, fluorescencia, tubos polínicos.

ABSTRACT

Almond cultivars are predominantly self-incompatible which requires to plant at least two inter-compatible varieties. This incompatibility acts to prevent self-fertilization, which is the gametophytic type given by specific proteins produced in the styles. Because of this, knowing the compatibility between cultivars is required and different methods to determine it have been established in recent years through molecular or biological techniques.

During the 2011 flowering, the compatibility between Marcona and the cultivars Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Nonpareil, Fritz, Wood Colony, Carmel, Thompson, Sonora, Solano, Masbovera, Francolí, Price, Ne plus Ultra and Glorieta, were analyzed using the technique developed by Mori et al. (2006), based on Daphne Preuss laboratory protocol. This technique stains callose using aniline blue, allowing pollen tube growth to be observed with fluorescence microscopy.

Furthermore, flowering of analyzed cultivars was monitored in the field, showing that Desmayo Rojo, Thompson, Glorieta, Masbovera and Francolí cultivars coincided in less than five days with Marcona cultivar.

Marcona was compatible with all studied cultivars, in accordance with genetic molecular analysis found in different studies. Also, these results validated this method as useful to determine genetic compatibility, especially for cultivars where the S alleles have not been identified yet.

Key words: *Prunus dulcis*, incompatibility, fluorescence, pollen tubes.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes generales

El almendro (*Prunus dulcis* Mill.) es una especie diploide que pertenece a la familia de las Rosáceas (*Rosaceae*), al género *Prunus*, y al subgénero *Amygdalus* (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984; Fernández, 2010; Lavín y Silva, 2001); salvo unas pocas excepciones, es una especie alógama y requiere de la polinización cruzada para producir semillas (Alonso, 2004). Por ello, la producción en el almendro, entre otros factores, está directamente relacionada con la coincidencia en la floración de las variedades polinizantes, con la compatibilidad de su polen y una buena polinización y cuaje (Castro *et al.*, 1994).

La necesidad de lograr una buena cosecha y la regularidad de producción de un huerto de almendros pone de relieve la importancia que adquiere el buen desarrollo de todo el ciclo reproductivo, que empieza con la inducción y continúa con la diferenciación floral, durante el verano precedente al año en que se produce la floración, que se ve reflejado en la formación anual de un número suficiente y regular de yemas florales (Felipe, 2000). 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 del almendro que se registran año a año; estas fluctuaciones pueden ser amortiguadas con el uso de variedades autógamas de floración tardía, adaptadas a las distintas zonas de cultivo, explotadas en cultivos intensivos, con los mismos cuidados que cualquier otro árbol frutal (Alonso, 2004).

Según López *et al.* (2005), las variedades de almendro se pueden clasificar en:

Autoincompatible: variedad que necesita polen de otra variedad diferente para fructificar (polinización cruzada). El tubo polínico (originado por los granos de polen) no puede desarrollarse en pistilos de la misma variedad.

Autocompatible: variedad capaz de fructificar con su propio polen (autopolinización). El tubo polínico puede desarrollarse en pistilos de la misma variedad.

Autofértil: variedad autocompatible y capaz de producir una cosecha normal disponiendo solamente de su propio polen (autofertilidad o autogamia).

En el mundo, existen diversas variedades de almendro, de diversos orígenes y características (Anexo I). Las variedades comerciales de origen californiano son de buena presentación, con cáscara delgada, liviana y blanda, lo que deriva en un alto rendimiento en pepa comestible (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984; Lavín y Silva, 2001). Además, las

características de la cáscara las hace susceptibles a larvas de *Amyelois transitella*; las variedades resistentes a este insecto son de cáscara dura, como Padre, Mission y Peerless. Estas dos últimas son de producción baja y de limitado uso en industria (Viveros, 2007a).

Las variedades españolas tradicionales poseen características destacables, pero también limitaciones importantes. Así, Marcona y Desmayo Langueta, las más difundidas, son de floración temprana-media; notable capacidad productiva; fruto de alta calidad, normalmente sin almendras dobles y con cáscara dura (Vargas *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 2009).

En Chile, las variedades utilizadas son principalmente de origen californiano (Lavín y Silva, 2001), siendo Nonpareil la variedad más importante, seguida de Carmel (Castro, 2007). Los huertos comerciales se distribuyen, principalmente, entre las V y VI Región, con una superficie total de 7.617 hectáreas y un rendimiento promedio de 1.286 kg/ha (Ciren, 2010).

Nonpareil es la variedad industrial más importante en el mercado internacional, desgraciadamente es de cáscara blanda y susceptible a *Amyelois transitella*; este daño es de gran preocupación, porque la pepa puede ser contaminada por los hongos del género *Aspergillus* (Viveros, 2007a).

Marcona es una variedad de alta calidad, florece 3 días antes y se cosecha 4 semanas después de Nonpareil (Viveros, 2007b). Reginato y Mauro (2007) señalan que Marcona posee una buena producción y la almendra es muy sana, pudiendo ser una interesante alternativa para el secano y zonas con riego, pero es necesario detectarle un polinizante apropiado. A pesar de su gran calidad de fruto y ser la mayor variedad producida en España (Viveros, 2007a), en Chile, la variedad Marcona recién comenzó a salir a la venta el año 2006.

El panorama varietal ha experimentado un notable cambio en los últimos 25 años, debido a la difusión de selecciones de programas de investigación de Francia, España y Estados Unidos. Los objetivos específicos se han orientado a la obtención de variedades con floración tardía (reducción del riesgo de heladas), autofertilidad (disminución de la problemática de la polinización), alta capacidad productiva, calidad de fruto, facilidad de formación y poda, buen vigor y tolerancia a condiciones adversas (enfermedades, sequía, etc.) (Vargas *et al.*, 2009).

El tiempo de las etapas de la floración de una variedad, en particular, es muy importante por la necesidad de polinización cruzada en el almendro, por lo que se debe conocer este factor, antes de planificar el establecimiento de un huerto. También, es importante señalar que la fecha de ocurrencia y el largo de la floración dependen de la variedad y de las condiciones climáticas del invierno/primavera. Por ejemplo, el almendro necesita pasar por el período de frío invernal para comenzar su desarrollo primaveral (Muncharaz, 2003); cuando el requerimiento de frío no se ha cumplido satisfactoriamente, la floración es tardía, irregular, larga y de menor calidad. Cuando el periodo de frío ha sido prolongado y seguido

por temperaturas cálidas, la floración es uniforme, corta y de buena calidad (Sotomayor, 2007). Las variedades de floración tardía se ven más afectadas por la insuficiente acumulación de frío invernal que las variedades de floración temprana (Universidad de California, 1985), sin embargo, sus necesidades de frío invernal son muy bajas, pues se estima que están entre las 100 y las 400 horas de frío (Muncharaz, 2003).

Compatibilidad

En el almendro, la secuencia del desarrollo de la compatibilidad en la polinización es la siguiente (adaptado de Sotomayor, 2007):

- El grano de polen llega al estigma, donde en menos de 1 hora se hidrata y germina. El estigma exuda un fluido rico en estigmasterol (un esteroide) y compuestos fenólicos.
- Emerge el tubo polínico a través del poro germinativo y continúa creciendo. La concentración osmótica se iguala entre el estigma y tubo polínico y así no absorbe agua en exceso.
- El tubo polínico libera enzimas hidrolíticas (cutinasa y pectinasa), que disuelven la cutícula y la pectina en la lamela media de las células estilares, y el tubo continúa avanzando entre ellas.
- Cuando estilo y tubo polínico son compatibles, éste alcanza el ovario y entra al lóculo. Poco antes se rompe la unión con el grano de polen y el tubo debe nutrirse exclusivamente de los tejidos del estilo y ovario. En el saco embrionario el tubo descarga los 2 núcleos espermáticos. Uno de ellos fecunda o fertiliza la ovocélula y forma el cigoto (diploide) que originará el embrión. El otro núcleo espermático se une con los dos núcleos polares para formar el endosperma (triploide). Este proceso se conoce como “doble fertilización” y es esencial para que se desarrolle una semilla (almendra) normal.

Según Herrero y Arbeloa (1989), el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del pistilo no es continuo y, a medida que va atravesando el estigma, ocurren cambios en la estructura de éstos. El proceso de fecundación en algunos *Prunus*, incluyendo el almendro, comienza con la presencia de tubos polínicos en el tejido de transmisión, que activa la fase final de desarrollo de los óvulos y conducen a la receptividad de éstos.

Evaluación de la compatibilidad

Un método para la determinación de la compatibilidad ha sido la realización de polinizaciones manuales en campo, calculando los porcentajes de cuajado de frutos (Rovira

et al., 1998). Para ello, se empaquetan ramas antes de floración, para prevenir la polinización cruzada, se poliniza, y después de 2 meses se determina autocompatibilidad, según el porcentaje de fruta cuajada. Los ensayos de campo son necesarios, pero no concluyentes, pues en ellos influyen muchas variables del medio, que causan diferencias significativas en el cuajado de un año a otro o entre diferentes localidades. Por esta razón, es recomendable realizar polinizaciones en laboratorio, donde las condiciones ambientales son controlables y, además, se puede examinar al microscopio el crecimiento de los tubos polínicos (Socias i Company, 1979).

Los ensayos de autoincompatibilidad o compatibilidad en laboratorio consisten en simular el proceso natural de polinización y crecimiento del tubo polínico. La evaluación es realizada mediante microscopía de fluorescencia. En este método, los tubos polínicos del pistilo fluorescen debido a que los depósitos de callosa se tiñen (Socias i Company, 1979; Rovira *et al.*, 1998). Si después de 72 horas los pistilos observados muestran tubos polínicos en la base del estilo, el cruzamiento o la autopolinización es considerado compatible; cuando todos los tubos polínicos fallan en alcanzar el ovario, los individuos son considerados incompatibles.

La polinización en el laboratorio puede realizarse sobre ramas cortadas o con flores individuales, siguiendo los sistemas tradicionales de recogida del polen, emasculación y polinización (Kester y Asay, 1975).

En el último tiempo, se han desarrollado métodos más exactos para la determinación de la compatibilidad (Martínez *et al.*, 2003), basados en análisis genético, como la identificación de S-RNAs estilar por electroforesis (Boskovic *et al.*, 1997) y la amplificación específica de alelos S, mediante PCR; en este caso la identificación de genotipos S se logra mediante la utilización de “primers” PCR específicos (Tamura *et al.*, 2000).

Estas nuevas técnicas moleculares han sido una gran herramienta en los programas de mejoramiento genético en almendro, ya que permiten conocer precozmente el genotipo de las descendencias segregantes, cuando se dispone de las primeras flores u hojas (Alonso, 2004).

Incompatibilidad

La realidad en los huertos comerciales es que la mayoría de las variedades de almendro presentan autoincompatibilidad. Asimismo, existen algunas combinaciones de variedades interincompatibles. Por todo esto, para la obtención de una buena cosecha, es necesaria la plantación de al menos dos variedades intercompatibles. Esta característica obliga a los productores el establecimiento de plantaciones con dos o más variedades intercompatibles, con los inconvenientes conocidos (el riesgo de la floración no simultánea, la posible ausencia de las abejas, las malas condiciones climáticas, la cosecha en diferentes fechas, etc.) (Dicenta *et al.*, 2002).

El almendro es una especie predominantemente autoincompatible. La incompatibilidad es del tipo gametofítica y actúa para prevenir la autofecundación. Esta característica es controlada por un locus simple con múltiples alelos S codominantes (Socias i Company *et al.*, 1976; Lewis y Crowe, 1954; López *et al.*, 2001). El locus S consiste en un número de genes que se expresan, tanto en el polen como en el estigma (Fichet, 2002). Boskovic *et al.* (1997) y Ortega (2002) señalan que estos genes se expresan en los estilos de las flores como glicoproteínas S-RNasas, responsables de la detención de crecimiento del tubo polínico (Martínez *et al.*, 2003); su actividad es esencial para el rechazo del polen no compatible, mecanismo que involucra la acción citotóxica de la ribonucleasa (Sotomayor, 2007). El modelo que se postula es que estas S-RNasas son citoquininas que están en la secreción estilar, las cuales son internalizadas por receptores en la superficie de los tubos polínicos incompatibles y causan la degradación del RNA ribosomal (rRNA) (Fichet, 2002).

La incompatibilidad comienza unos minutos después de la captura del grano de polen por el estigma y sus primeras consecuencias son bloquear el flujo de agua hacia el grano de polen y evitar que el citoplasma del grano sea capaz de desarrollar su turgencia. Actualmente, se han identificado los genes de los locus S en el estigma, que contiene 2 genes, uno SLG (S locus glycoprotein), que codifica para una glicoproteína, la cual es secretada dentro de la pared de la célula de la papila estigmática, y el otro SRK (S locus receptor kinase), que codifica para un receptor de quinasa y está situada en la membrana plasmática de la célula de la papila estigmática. Al mismo tiempo, se ha aislado otro gen, en la cubierta del grano de polen, que codifica para una proteína y que ha sido denominado SCR (locus cysteine rich). El acoplamiento SRK-SCR determinaría la incompatibilidad (Fichet, 2002). Cuando las variedades son incompatibles, los tubos polínicos crecen hasta la primera mitad del estilo, detienen su crecimiento y no alcanzan el ovario (Egea *et al.*, 1999).

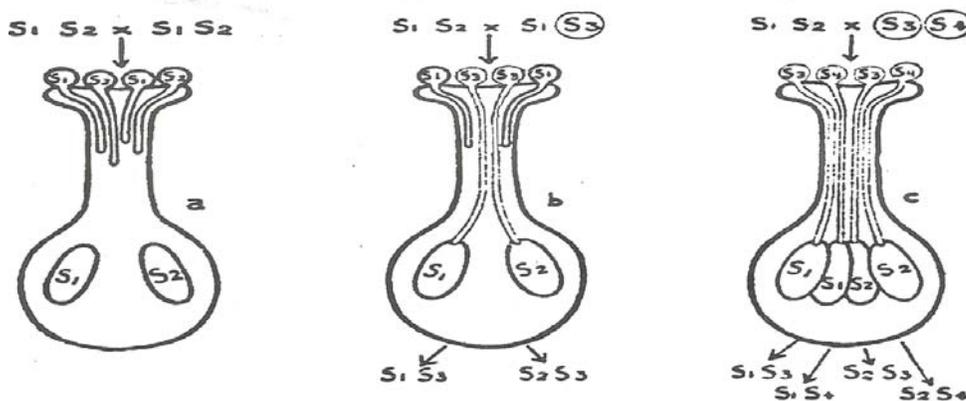


Figura 1. Diversas combinaciones de alelos entre granos de polen y células del estilo de la flor de almendro. Los alelos S no deben coincidir para no interferir en el desarrollo del tubo polínico. En el caso (a) no hay fecundación (Ej: Nonpareil con IXL). En (b) solo hay un 50% de probabilidad de fecundación (Ej: Nonpareil con Carmel) y en el

caso (c) hay un 100% de probabilidad de fecundación (Nonpareil con Texas) (Sotomayor, 2007).

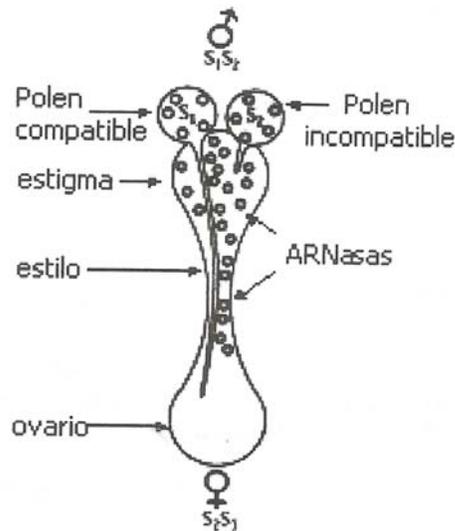


Figura 2. Representación de un pistilo de flor de almendro mostrando alternativas de compatibilidad según el origen del polen. En el estilo, las ribonucleasas aceptan o rechazan el desarrollo del tubo polínico, según sus alelos (S1 o S2) (Sotomayor, 2007).

La mayoría de las variedades de almendro de California están clasificadas en seis grupos de incompatibilidad cruzada (Anexo II), determinada por sus genotipos de alelos S. La identificación de los genotipos específicos S permiten una evaluación más exacta de las combinaciones genéticas y la eficiencia en la polinización. La identificación de estos grupos de incompatibilidad (CIGS) facilita la caracterización de nuevas variedades, y permite el establecimiento rápido de los requisitos de la polinización de la variedad y de la eficiencia de la polinización para las combinaciones genéticas, incluyendo las consecuencias cuando el polinizante tiene un alelo común con la variedad principal (Kester *et al.*, 1994a).

El alelo que proporciona la autocompatibilidad es Sf. Cuando dos variedades autoincompatibles tienen el mismo genotipo, son incompatibles entre sí. Las variedades autocompatibles son compatibles con cualquier otra variedad, además de con ellas mismas (López *et al.*, 2005; 2006).

También existe la incompatibilidad unilateral, esto fue descrito por Kester *et al.*, (1994b), donde se probó que Jeffries, una variedad que se originó como una mutación de Nonpareil, presentaba incompatibilidad unilateral con 'Carmel', obteniendo excelentes resultados de productividad en 'Jeffries', pero nefastos resultados en la producción de 'Carmel'. Se concluyó que el polen de 'Jeffries' tenía un genotipo con un solo alelo efectivo (S8); en estas condiciones, el polen de 'Jeffries' no funciona en un estilo de cualquier variedad con el alelo S8 en su genotipo.

Hipótesis

Las variedades de almendro presentan diferente compatibilidad de acuerdo a la variedad polinizante, y es determinada mediante la metodología de observación del crecimiento de tubos polínicos con microscopía de fluorescencia.

Objetivo

Determinar la compatibilidad entre variedades de almendro, mediante la técnica de observación del crecimiento de tubos polínicos con microscopio de luz fluorescente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El año 2005, se realizó un ensayo con las variedades Marcona, Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Ferragnès, Tuono, Supernova, Texas y Nonpareil, plantadas en una parcela experimental en la localidad de San Pedro, Comuna de Malloa, VI Región.

Un segundo estudio se llevó a cabo durante la floración del año 2011 en el arboreto de la empresa “The Andes Nursery Association” (A.N.A), ubicado en la Comuna de Paine, Región Metropolitana. El Huerto se estableció en el año 1997, con 18 variedades injertadas sobre Nemaguard, plantadas a 5 x 3,5 metros.

Las variedades evaluadas fueron Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Nonpareil, Fritz, Wood Colony, Carmel, Thompson, Sonora, Solano, Masbovera, Francolí, Price, Ne plus Ultra, Glorieta y Marcona. El material vegetal utilizado fue obtenido de A.N.A, exceptuando las variedades Fritz y Wood Colony, cuyas ramillas fueron recolectadas de un huerto de Ovalle y de la empresa Asesoría Inmobiliaria e Inversiones FBI Ltda., respectivamente.

Método

Caracterización de la floración (2011)

Se realizó un seguimiento de la floración de las 15 variedades durante el año 2011, utilizando los estados florales descritos por la Universidad de California (1985): a) yema dormida, b) puntas verdes, c) yema rosada, d) botón floral, e) abertura floral, f) floración, g) caída de pétalos, h) estado de “chaqueta” (Figura 3). Para ello, se observó periódicamente, en terreno, la floración de las variedades, considerando el estado dominante, en 4 árboles por variedad.



Figura 3. Estados fenológicos del almendro, según Universidad de California (1985).

Estudio de compatibilidad 2005 y 2011

En el año 2005, los cruzamientos se realizaron entre 8 variedades de almendro (Marcona, Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Ferragnès, Tuono, Supernova, Texas y Nonpareil), obteniendo un total de 64 combinaciones a analizar, pues todas las variedades fueron cruzadas entre sí, como dadores y receptores de polen. El método utilizado fue similar al descrito en el Anexo III. Sin embargo, no se logró determinar la compatibilidad entre las variedades, las posibles causas se discuten más adelante.

En el estudio del año 2011, las 14 variedades de almendro (Desmayo Largueta, Desmayo Rojo, Nonpareil, Fritz, Wood Colony, Carmel, Thompson, Sonora, Solano, Masbovera, Francolí, Price, Ne plus Ultra, Glorieta y Marcona) fueron cruzadas con Marcona, como dadores o receptores del polen, obteniendo un total de 29 combinaciones a analizar, incluyendo la autopolinización de Marcona.

Obtención del polen. Se extrajeron ramillas con yemas florales al estado de botón rosado, las que fueron llevadas al laboratorio, y colocadas en recipientes con agua y sacarosa al 5%, en una cámara a 24°C, luz y un 80% de humedad relativa (HR), para forzar la floración (Castro *et al.*, 1994). Cuando las flores abrieron, se emascularon, y las anteras fueron colocadas en placas Petri y secadas por 24 horas a una temperatura entre 18 a 20°C; luego las anteras fueron tamizadas utilizando una “media” fina y el polen obtenido fue almacenado en frascos a 4°C y 35% de humedad relativa, según lo descrito por Kester y Asay (1975).

En el ensayo del año 2005, el método utilizado para la obtención del polen fue similar, con la diferencia que las ramillas se colocaron en recipientes con agua sin sacarosa.

Viabilidad del polen. Se utilizó la tinción de Alexander, que se caracteriza por ser una tinción diferencial que permite determinar polen vivo de polen muerto.

Para sacar el polen seco adherido a la placa Petri, se utilizó 200 µL de agua destilada; luego, con la punta de la pipeta, se mezcló bien, y se traspasó a un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó por 5 minutos, con el objetivo de concentrar los granos de polen. Posteriormente, se extrajo el agua y se agregó 30 mL de solución Alexander (Anexo IV); esta solución se colocó en un portaobjeto y se dejó teñir durante 15 minutos. La observación se realizó con un microscopio de campo claro y se procedió a contar granos de polen vivos y muertos.

El año 2005 no se realizó evaluación de la viabilidad del polen.

Polinización manual. De cada variedad se extrajeron 3 ramillas con yemas florales al estado de botón floral y, para evitar la autopolinización, las flores se emascularon. Las ramillas se colocaron en recipientes con agua y sacarosa al 5%, en una cámara con luz, a 24°C y 80% humedad relativa (HR), por 24 horas; las ramillas se cubrieron con bolsas de papel para evitar la polinización cruzada. Luego, se polinizaron manualmente con un pincel, 5 flores abiertas de cada combinación. Después de la polinización manual, las flores fueron almacenadas a 24°C por 48 horas, temperatura óptima para el crecimiento de los tubos polínicos, y tiempo adecuado para que alcancen la base del estilo (Socias i Company *et al.*, 1976).

En el ensayo del año 2005, se polinizaron un total de 30 flores por combinación, las cuales fueron emasculadas y colocadas de manera individual en recipientes con mallas, con el objetivo de mantenerlas erguidas y con la base en contacto con el agua (Figura 4).



Figura 4. Flores de almendro emasculadas y polinizadas (ensayo 2005)

Fijación de las muestras. Después de la polinización manual, los pistilos fueron fijados en FAA: formalina, ácido acético y etanol (70%), en proporciones 1:1:18. (Ortega *et al.*, 2002).

En el ensayo del año 2005, la fijación de los pistilos se realizó con el mismo procedimiento.

Observación de tubos polínicos. La observación de los tubos polínicos se realizó con algunas modificaciones, según lo propuesto por Mori *et al.* (2006) del laboratorio Daphne Preuss, en “Protocolo para la tinción de los tubos polínicos”, que describe la técnica basada en la tinción de los depósitos de callosa con anilina azul, que presenta fluorescencia a la luz ultravioleta. El método con sus modificaciones quedó como sigue:

1. Extraer los pistilos de las flores y realizar 3 cortes (Figura 5). Se recomienda realizar los cortes bajo una lupa y con los pistilos sumergidos en etanol (70%).
2. Poner los pistilos 5 minutos en la mezcla de ablandamiento, de hidrato cloral. El hidrato cloral corresponde a: hidrato cloral: agua: glicerol, en proporción 8:2:1.
3. Lavar los pistilos muy bien, con agua destilada.
4. Teñir 25 minutos en solución de azul de anilina en oscuridad. La solución de azul de anilina corresponde a: 0,1% (p/v) azul de anilina en K_3PO_4 100 mM. Disolver y dejar en oscuridad a 4°C. Al día siguiente, filtrar a través de una capa de carbón activado (una cucharadita en un filtro de papel) y agregar glicerol 2% (v/v). Guardar en oscuridad a 4°C.
5. Montar en 15 μ L de buffer fosfato 50 mM: glicerol (1:1).
6. Mirar al microscopio de fluorescencia.

Para la observación de los pistilos, se utilizó un microscopio Olympus IX81, filtro DAPI (excitación 370-390 nm, emisión sobre 400 nm).

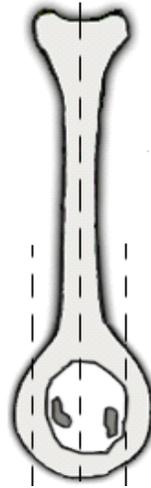


Figura 5. Cortes realizados al pistilo, previo a su observación (fuente: Alejandra Nuñez).

Al observar al microscopio la presencia de tubos polínicos en el estilo, se usó el siguiente criterio para determinar los cruzamientos compatibles o incompatibles: variedades compatibles se consideró cuando los tubos polínicos crecieron más abajo del tercio superior del pistilo; variedades incompatibles se consideró cuando los tubos polínicos detienen su crecimiento en el tercio superior del pistilo.

El año 2005, para la observación de los tubos polínicos, se utilizó el método descrito por Martin (1959), que se detalla a continuación:

1. Enjuagar los pistilos con agua corriente.
2. Colocar los pistilos en una solución de hidróxido de sodio (8 N), por 8 a 24 horas, para limpiar y suavizar el tejido, y permitir una adecuada penetración del colorante.
3. Lavado de los pistilos con agua, para remover completamente el hidróxido de sodio.
4. Tinción con una solución de anilina azul hidrosoluble al 0,1%, en K_3PO_4 , 0,1 N, por 4 horas.
5. Montaje de los pistilos sobre tinción en portaobjeto, con cubreobjeto.
6. Observación de las muestras al microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo año 2005

La observación de los tubos polínicos se realizó según lo propuesto por Martin (1959). Sin embargo, en ningún caso se logró observar tubos polínicos. La fluorescencia observada correspondía a vasos vasculares o pelos epidermales y, en otros casos, era en todo el pistilo. Sí se logró ver fluorescencia en el estigma, correspondiente a granos de polen (Figura 6). Las posibles causas de la falta de resultados pudo deberse a: condiciones inadecuadas para la germinación del polen y desarrollo del tubo polínico; inviabilidad del polen; receptividad del estigma o al procedimiento utilizado para la observación del tubo polínico.

Condiciones para la germinación del polen y desarrollo del tubo polínico

Para la germinación del grano de polen se requiere de cierta temperatura mínima, así como también para el desarrollo del tubo polínico, hasta alcanzar el saco embrionario. La temperatura óptima de germinación es de aproximadamente 25°C, lo que rara vez ocurre en el periodo de floración del almendro en Chile. En laboratorio, se ha determinado, en almendro, que se alcanza un 66% de germinación con temperaturas de 15°C (por periodos de hasta 24 horas), un 24% con 6°C y sólo 11,6% con 0°C (Sotomayor, 2007). Asimismo, López y Sotomayor (1992) indican que el clima con sol y una temperatura entre 15° a 25°C, e idealmente 20° C, favorece el crecimiento del tubo polínico.

En relación a las condiciones del ensayo, la cámara de crecimiento estuvo a 20°C, con una humedad relativa de 80%, aproximadamente, por lo que el rango de temperatura utilizado no se consideró un impedimento.

Viabilidad del polen

Extracción del polen. Este es un punto importante a considerar cuando se realiza polinización manual, debido a la disminución en la germinación del polen después de transcurridas 48 horas o más. El polen utilizado en este trabajo se extrajo de flores abiertas y, aunque no se determinó exactamente el tiempo transcurrido desde que la flor abrió hasta que se extrajo el polen, en todos los casos, no pasó más de 48 horas desde que la flor abrió, por lo que se estima que no debió haber sido un factor limitante para la no obtención de resultados. Además, si este problema se hubiera presentando, los tubos polínicos se habrían observado igualmente, en menor o mayor cantidad, porque el polen se extrajo de flores con edades diferentes.

Deshidratación del polen. Martínez-Gómez y Gradziel (2000) deshidrataron el polen durante 48 horas a 22°C en un desecador con cloruro de calcio, a una humedad relativa (HR) del 20 %, aproximadamente. En este caso, fue diferente, la temperatura fue de 20°C, por 24 horas, en una cámara a 60 % de HR, aproximadamente. Estas características pudieron haber afectado la viabilidad del polen, disminuyéndola, pero no en el 100% de los casos, descartándose este punto como el responsable.

Conservación del polen. Existe una fuerte influencia de la temperatura en la viabilidad del polen almacenado (Cobo, 1980); la calidad del polen de almendro se deteriora rápidamente a temperaturas moderadas y húmedas (Martínez-Gómez y Gradziel, 2000). La conservación del polen se realizó a 4°C; en estas condiciones el polen permaneció desde 2 horas hasta 32 días, como máximo, tiempo que dependió de cada cruzamiento. El tiempo máximo de 32 días transcurrió entre la recolección del polen de las primeras variedades en florecer (Desmayo Langueta y Desmayo Rojo) y la polinización manual de las últimas variedades en florecer (Ferragnés y Texas). Según Cobo (1980), una hidratación adecuada y bajas temperaturas de almacenamiento son cruciales para mantener la viabilidad del polen. Martínez-Gómez y Gradziel (2000) evaluaron la viabilidad del polen de almendro a diferentes temperaturas, concluyendo que a 4°C la viabilidad se mantuvo en 60%, o más, durante 2 semanas, y por encima del 50% desde 2 hasta 8 semanas. En otro ensayo, Martínez-Gómez y Gradziel (2002) mantuvieron el polen viable, de diferentes variedades de almendro, por sobre el 80% a los dos meses de almacenamiento, a diferentes temperaturas evaluadas (4; 0; -20 y -80 °C). Martínez-Gómez y Gradziel (2000) concluyen que 4° C es una temperatura adecuada para el almacenamiento de polen de almendro durante un máximo de dos meses, por lo que se descarta que el tiempo y la temperatura de conservación del polen hayan causado la falta de resultados.

Receptividad del estigma

Las flores fueron polinizadas después de 24 horas en la cámara de temperatura, sólo en flores recién abiertas, por lo que la hipótesis de que al momento de polinizar manualmente, el estigma no estaba receptivo, no tiene fundamento, pues la receptividad del estigma tiene su máximo al abrir las flores en el almendro. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser probada, debido a que no evaluó la receptividad del estigma al momento de la polinización. Con respecto al tiempo transcurrido desde la polinización manual hasta la recolección y fijación de las muestras, para posterior observación, fue de 3 días, tiempo considerado suficiente para que los tubos polínicos alcancen la base del estilo en aquellos cruzamientos compatibles; en el caso de aquellos incompatibles, se debió manifestar detención del crecimiento de los tubos polínicos. Al respecto, Dicenta *et al.* (2002) fijó los pistilos en FAA por 24; 48; 72 y 96 horas después de la polinización, observando que a las 72 horas los tubos polínicos llegaron a los ovarios, lo que no ocurrió antes de las 48 horas. En este ensayo se esperó 72 horas, lo que supone que el tiempo utilizado para que se desarrollaran los tubos polínicos fue apropiado, descartando este punto como la causa de la no visualización de los tubos polínicos.

Procedimiento utilizado para la observación de tubos polínicos

El procedimiento para la observación de las muestras fue el descrito por Martin (1959). Al respecto, existe una gran diferencia entre ésta y la metodología utilizada en el ensayo de 2011, donde el procedimiento no realizó cortes a los pistilos, razón por la cual se dificulta muchísimo la observación de los tubos polínicos al microscopio de fluorescencia, pudiendo ser ésta la razón única y principal de la no visualización de éstos. Además, la presencia de los pelos epidermales del estilo fue una de las razones que dificultó la observación de la fluorescencia de los tubos polínicos, que se encontraban internamente en el tejido (Figura 7). Al respecto, Martin (1959) describe que cantidades variables de callosa también existen en los tubos cribosos y en los pelos epidermales del estilo, por lo que la cantidad y distribución de la callosa es altamente variable, pudiendo verse en toda la longitud del tubo, solamente localizada, y a veces no visible al inicio del crecimiento. De esta manera, al no realizar los cortes longitudinales en el pistilo, se apreció fluorescencia a lo largo del pistilo en todos los cruzamientos (Figura 8), haciendo imposible distinguir los tubos polínicos del resto de los tejidos.

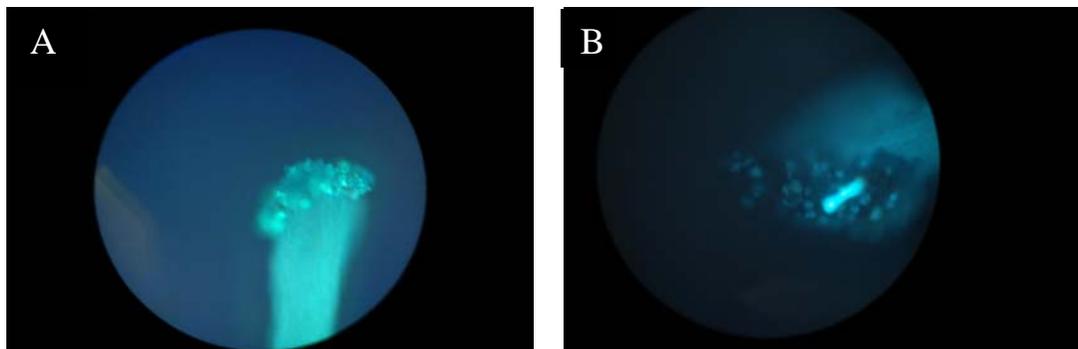


Figura 6. Granos de polen sobre el estigma de un pistilo de almendro (fuente: Alejandra Nuñez). A) Vista lateral; B) Vista Frontal.

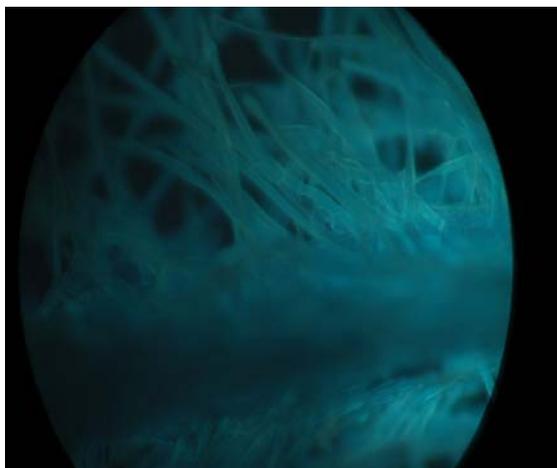


Figura 7. Pubescencia en pistilos de almendro al microscopio de fluorescencia (fuente: Alejandra Núñez).

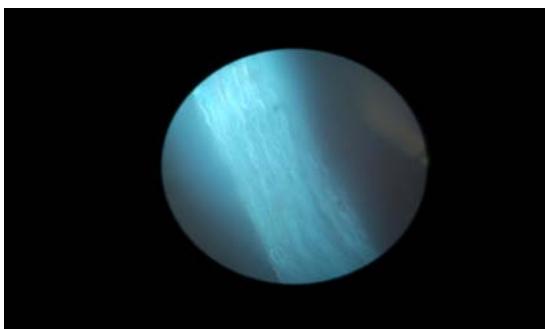


Figura 8. Fluorescencia del pistilo de almendro polinizado (Desmayo Largueta X Ferráignes) (Fuente: Alejandra Núñez).

Ensayo año 2011

Caracterización de la floración

En el invierno del año 2011, en la estación meteorológica de la Comuna de Buin, Región Metropolitana (Latitud 33° 42' 26.5"- Longitud 70° 42' 5.6"), se acumularon 1024 horas frío (base 7,2°C), contabilizadas desde el 1 de mayo hasta el 30 de julio (Agroclima, 2011), acumulación suficiente para romper el receso en el almendro, pues, dependiendo de la variedad, sus requerimientos de frío pueden ir desde las 150 hasta las 400 horas frío (Muncharaz, 2003). Al comparar el inicio de los primeros estados fenológicos con lo registrado por Ahumada (2007), se produjo un atraso aproximado de 5 días en la temporada 2011, lo que se explicaría por temperaturas medias desde julio en adelante más bajas.

En la Figura 9, se aprecia que las variedades Desmayo Rojo, Thompson, Glorieta, Masbovera y Francolí coinciden en menos de 5 días con la floración de Marcona.

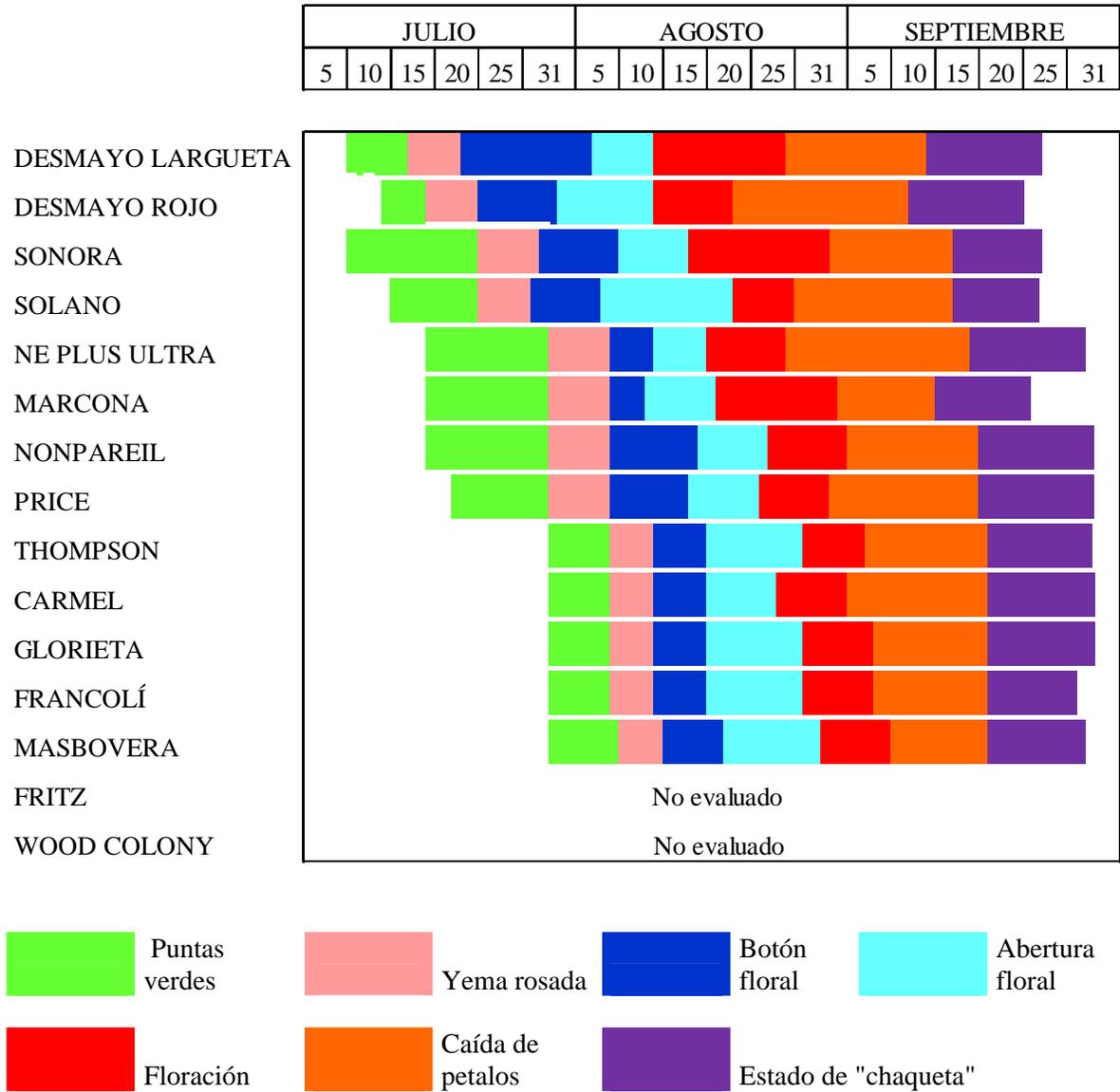


Figura 9. Evolución de la fenología floral en las distintas variedades de almendro estudiadas. Temporada 2011.

Según los resultados; las variedades Desmayo Rojo y Desmayo Largueta son de floración muy temprana; Sonora y Ne Plus Ultra, de floración temprana; Marcona, Price, Carmel y Nonpareil, de floración media; y Thompson, Glorieta, Francolí y Masbovera, de floración tardía.

Viabilidad del polen

La viabilidad de los granos de polen fue, en todas las variedades, cercano al 80%, exceptuando a Desmayo Largueta (53,72%) (Cuadro 1), lo que indica que la metodología utilizada en la recolección del polen, almacenamiento y polinización manual fue el apropiado para conservar su viabilidad.

La tinción de Alexander discrimina entre polen vivo y muerto. Este método diferencia el citoplasma, que se tiñe púrpura, de la pared celular, que se tiñe verde. Se produce autofagocitosis del citoplasma en la célula en el polen cuando este comienza a morir, lo que explica que los granos muertos sólo se vean de color verde. A su vez, los granos vivos, al ir hidratándose, comienzan a tomar una forma triangular, producto de la elongación de los núcleos del polen (Figura 10).

Cuadro 1. Viabilidad de los granos de polen, expresado en porcentaje, de las diferentes variedades de almendro, determinados por tinción de Alexander.

Variedad	Viabilidad de polen
	%
Desmayo Rojo	91,00
Sonora	88,00
Solano	84,07
Ne Plus Ultra	44,94
Marcona	84,62
Nonpareil	84,78
Price	74,07
Thompson	83,00
Carmel	77,78
Glorieta	74,14
Francolí	86,30
Masbovera	89,06
Fritz	95,61
Wood Colony	79,00

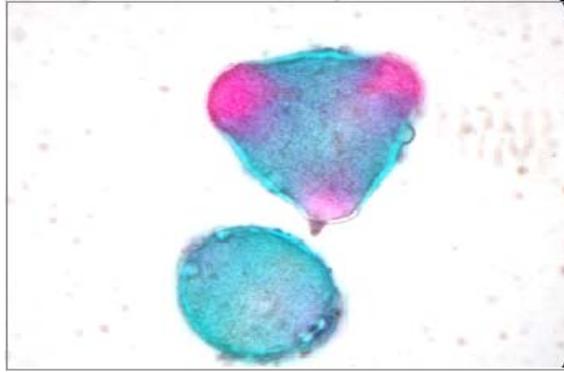


Figura 10. Polen de almendro, variedad Marcona, vivo (forma triangular) y muerto (redondeado). Teñidos por tinción de Alexander.

Observación de tubos polínicos

En todos los cruzamientos, de las diferentes variedades con la variedad Marcona, ya sea como receptor o donante de polen, se observaron tubos polínicos que crecieron más abajo del primer tercio del pistilo (Figura 11). Para validar el método, se autopolinizó 'Marcona', variedad autoincompatible, cuyo pistilo no mostró crecimiento de tubos polínicos más abajo del tercio superior; sí se observó polen germinado y algunos tubos polínicos que detuvieron su crecimiento antes del primer tercio superior del pistilo.

Así, todas las variedades resultaron ser compatible con Marcona (Anexo V), sin embargo, para decidir el polinizante más adecuado, hay que analizar las características comerciales y las coincidencias en la floración de cada variedad.

Los resultados concuerdan con lo descrito en la literatura para los análisis genéticos de los alelos S de algunas variedades (Anexo VI), lo que valida el método utilizado como una herramienta para poder determinar compatibilidad, sobre todo en variedades donde aún los alelos S no han sido identificados. 'Marcona', según lo descrito en el Anexo VI, no comparte ningún alelo S con las otras variedades estudiadas, por lo que todos los granos de polen son potencialmente compatibles y pueden crecer hasta el óvulo.

Además, en todos los cruzamientos se encontró que la compatibilidad es en ambos sentidos, indicando que ninguna de las variedades estudiadas presenta la incompatibilidad unilateral descrita para 'Jeffries'

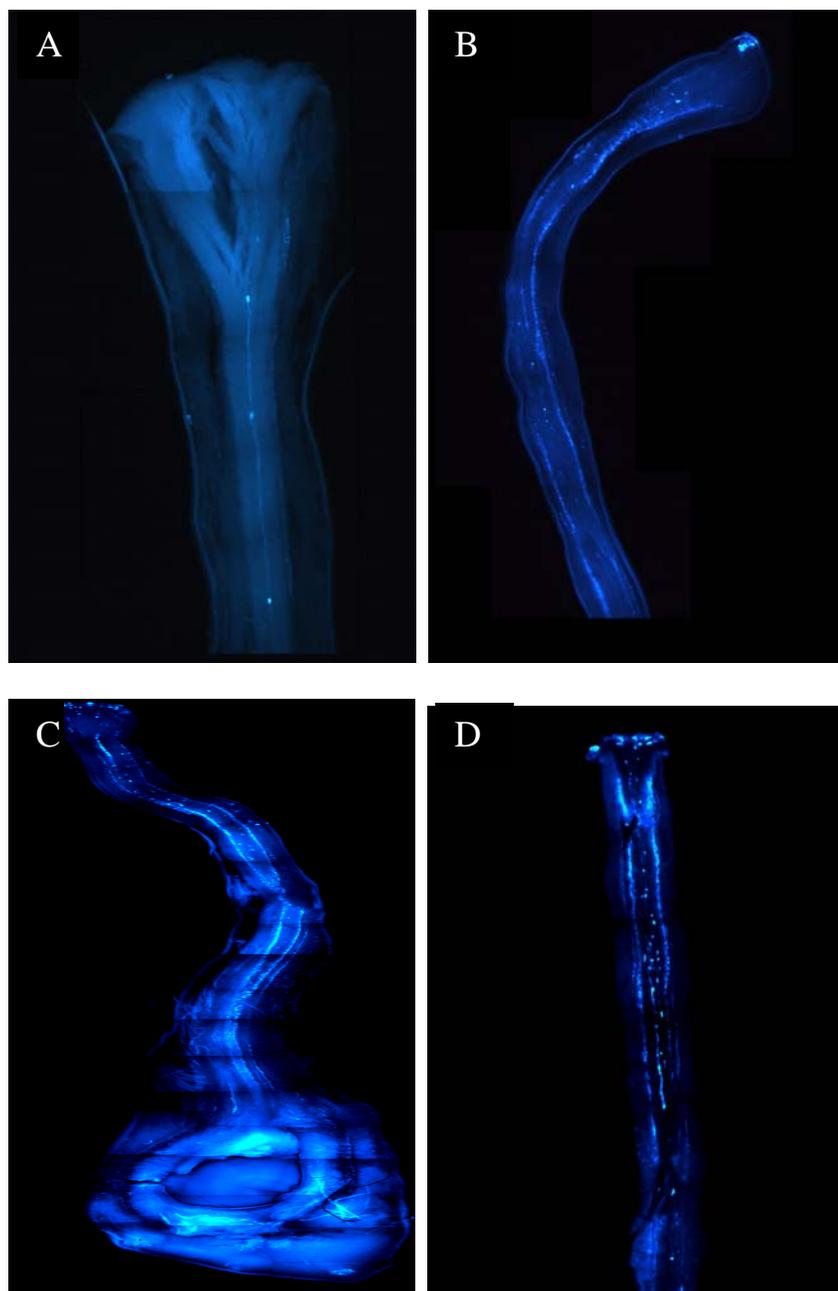


Figura 11. Pistilos de almendro con crecimiento de tubos polínicos en diferentes combinaciones de polinizantes. A) Carmel x Marcona; B) Desmayo Largueta x Marcona; C) Marcona x Glorieta; D) Nonpareil x Marcona.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este ensayo se puede concluir que:

La secuencia y duración de la floración de las diferentes variedades de almendro coinciden con lo descrito en la literatura.

Para la visualización de los tubos polínicos en almendro parece fundamental realizar cortes longitudinales al pistilo.

La viabilidad del polen, de todas las variedades evaluadas, se conserva por 42 días, con el método utilizado en este ensayo para la obtención y almacenamiento del polen.

Todas las variedades de almendro analizadas son compatibles genéticamente con Marcona.

La observación del crecimiento del tubo polínico in vitro es un método simple y útil para determinar compatibilidad o incompatibilidad gametofítica en almendro.

LITERATURA CITADA

AGROCLIMA 2011. Disponible en: <http://www.agroclima.cl/InformesAgroclima/InformesAgroclimaticos.aspx>. Leído el 12 de septiembre 2011.

Abascal, U. 1992. Almendro. pp. 10-16. En: Catálogo de variedades de especies frutales. Boletín Técnico N°193. Santiago, Chile. 290 p.

Ahumada, M. 2007. Descripción de la fenología y el desarrollo del fruto en dieciocho variedades de almendro. Memoria de título, Ingeniero agrónomo, mención fruticultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 47 p.

Alonso, J. M. 2004. Efecto de la consanguinidad sobre la expresión y la transmisión de la autocompatibilidad en el almendro (*Prunus amygdalus* Batsch). Tesis doctoral Departament d'Hortofruticultura Botànica i Jardineria, Universitat de Lleida, España. 227 p.

Asai, W., W. Micke, D. Kester, D. Rough, y J. Edstrom. 1998. Selección de variedades. pp. 84-91. En: Seminario Internacional. Situación actual y perspectivas tecnológicas del almendro. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 190 p.

Boskovic, R., K.R. Tobutt, I. Batlle and H. Duval. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.

Boskovic, R., K.R. Tobutt, I. Batlle, H. Duval, P. Martínez-Gómez and T.M. Gradziel. 2002. Styelar ribonucleases in almond: correlation with, and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding* 122(1): 70-76.

Castro J. 2007. El almendro en Chile. pp. 5-16. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

Castro, J., L. Barrales y I. Peña. 1994. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación en la germinación del polen in vitro, de cinco cultivares de almendro (*Prunus dulcis* (Mill) Webb). *Ciencia e Investigación Agraria* 26: 61:66.

CIREN, 2010. Catastro frutícola, principales resultados, Región Metropolitana. Chile. 56 p.

Cobo, A. 1980. El polen. Recogida, manejo y aplicaciones. Hoja Divulgadora 8/80. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España. 16 p.

CONSORCIO VIVEROS DE CHILE (C.V. Chile). 2000. Almendros. Disponible en: <http://www.cvchile.cl/CAT/catalogo/almendros/alm1.htm>. Leído el 20 de octubre 2011.

Dave Wilson Nursery. 2010. Disponible en: <http://www.davewilson.com/br10/catalog/almond.html>. Leído el 20 de octubre 2011.

Dicenta, F., E. Ortega, J.A. Cánovas and J. Egea. 2002. Self-pollination versus cross-pollination of six self-compatible almond cultivars: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding* 121: 163-167.

Egea, J., J.A. Cánovas, E. Ortega and F. Dicenta. 1999. Interference of the own pollen in self-incompatible almonds on later cross-compatible pollination: pollen tube growth and fruit set. Disponible en: <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c56/01600208.pdf>. Leído el 10 de agosto 2011.

Felipe, A. J. 2000. El almendro. *Integrum*. España. 461 p.

Felipe, A. y R. Socías. 1986. Características de algunas variedades interesantes de almendro. Diputación General de Aragón, España, Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes. *Información Técnica* N° 19. 10 p.

Fernández, A. 2010. La autocompatibilidad en el almendro (*Prunus amygdalus* Batsch): estructura genética del alelo Sf y modificaciones de su expresión. Tesis doctoral. Departament d'Hortofruticultura Botànica i Jardineria, Universitat de Lleida, España. 196 p.

Fichet, T. 2002. Incompatibilidad polínica: bases moleculares. *Aconex* (77): 5-9.

Godoy, J.D. 2007. Almendros, variedades, portainjertos e injertación. pp. 33-45. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

Grasselly, C. y P. Crossa Raynaud. 1984. El almendro. Ed. Mundi Prensa. Madrid 465 p.

Herrero, M. and A. Arbeloa. 1989. Influence of the pistil on pollen tube kinetics in peach (*Prunus persica*). *Amer. J. Bot.* 76:1441-1447.

Kester, D.E. and R.N. Asay. 1975. Almonds. pp. 387-419. In: *Advances in fruit breeding*, Janick, J. and Moore, J.N. (eds). Purdue University Press, West Lafayette, Indiana. 632 p.

Kester, D.E. and Gradziel, T.M. 1996. Almonds (*Prunus*). pp. 1-97. In: J.N. Moore and J. Janick (eds), *Fruit Breeding*. Vol 3, Wiley, New York. 223 p.

Kester, D., T. Gradziel and W. Micke. 1994a. Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(1): 106-109.

Kester, D., C. Micke, and M. Viveros. 1994b. A mutation in 'Nonpareil' almond conferring unilateral incompatibility. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(6):1289-1292.

Kodad O., A. Sánchez, N. Saibo, J.M. Alonso, M. Oliveira and R. Socías i Company. 2006. Short communication. Cloning and sequencing of partial genomic DNA fragments corresponding to the S11 and S12 alleles of the Spanish almond cultivar 'Marcona'. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 331-335.

Lavín, A. y R. Silva. 2001. Almendro. pp. 19-35. En: *Frutales para el secano interior: comportamiento de carozos y pomáceas*. Boletín INIA N° 30, Santiago, Chile. 275 p.

Lewis, D. and L.K. Crowe. 1954. Structure of the incompatibility gene. IV. Types of mutations in *Prunus avium* L. *Heredity* 8: 357-363.

López, E. y C. Sotomayor. 1992. Las abejas como polinizantes en frutales. *Chile Agrícola*. 17 (180): 270: 273.

López, M., J.M. Alonso, P. Martínez-Gómez, R. Socías i Company, T.M. Gradziel and I. Batlle. 2001. Biological and molecular assessment of self-incompatibility in almond. *FAO-CIHEAM-Nucis-Newsletter* 10: 8-11.

López, M., M.A. Romero, F.J. Vargas y I. Batlle. 2005. "Francoli", a late flowering almond cultivar re-classified as self-compatible. *Plant Breeding* 124(5): 502-506.

López, M., F. Vargas y I. Batlle. 2006. Self-incompatibility almond genotypes: a review. *Euphytica* 150(1): 1-16.

Martin, R.N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Tech.* 34: 125-128.

Martínez-Gómez. P. and T.M. Gradziel. 2000. Short-term storage of almond pollen. *HortScience* 35(6):1151-1152.

Martínez-Gómez, P. and T.M. Gradziel. 2002. Low temperature storage of almond pollen. *HortScience* 37(4): 691-692.

Martínez, P., A.M. Dandekar, T.M. Gradziel, M. López and I. Batlle. 2003. Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. *Acta Horticulturae* 622: 397-401.

Mori, T., H. Kuroiwa, T. Higashiyama and T. Kuroiwa. 2006. Generative cell specific 1 is essential for angiosperm fertilization. *Nature Cell Biology* 8(1): 64-71.

Muncharaz, M. 2003. El almendro, manual técnico. Ediciones Mundi-Prensa. España. 283 p.

Ortega, P.E. 2002. Mejora genética del almendro: Nuevas estrategias para la obtención de variedades autocompatibles. Tesis doctoral. Departamento de Genética y Microbiología, Universidad de Murcia, España. 156 p.

Ortega, E., P. Martínez-Gómez, F. Dicenta, R. Boskovic and R. Tobutt. 2002. Study of self-compatibility in almond progenies from self-fertilization by fluorescence microscopy and stylar ribonuclease assay. *Acta Horticulturae* 591: 229-232.

Pensa, D. 2001. Variedades de almendro y sus características. pp. 144-156. En: Seminario Internacional. Actualización tecnológica de la producción del almendro. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 201 p.

Reginato, G. y C. Mauro. 2007. Una experiencia de introducción del almendro como cultivo de secano. Proyecto Fia C01-1-A-042. pp. 67-84. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

Riera, F. y J. Ferrán. 1975. Cultivo del almendro. Aedos, Barcelona. 172 p.

Rovira, M., J. Clevé, J. Romero and F.J. Vargas. 1998. Selfcompatibility in almond progenies. *Acta Horticulturae* 470: 66-71.

Socias i Company, R. 1979. Aportación a las técnicas de observación de los tubos polínicos. Caso almendro. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Producción Vegetal* 10: 233-236.

Socias i Company, R., D.E. Kester, and M.V. Bradley. 1976. Effects of temperature and genotype on pollen tube growth of some self-compatible and self-incompatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101(5):490-493.

Sotomayor, C. 1990. Todo lo que usted desea saber sobre: almendro (III parte). *Chile Agrícola* 15 (159): 284-287.

Sotomayor, C. 2007. Polinización y cuaja frutal del almendro. pp. 47-59. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

Tamura, M., K. Ushijima, H. Sassa, H. Hirano, R. Tao, T.M. Grandziel and A.M. Dandekar. 2000. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theor. Appl. Genet.* 101:344-349.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 1985. Integrated pest management for almonds. UC/DANR, Publication N° 3308, Oakland, California, USA. 156 p.

Vargas, F.J., J. Clavé, M. Romero, I. Batlle and M. Rovira. 1998. Autogamy studies on almond progenies. *Acta Horticulturae* 470: 74-81.

Vargas, F., M. Romero, J. Clave, S. Alegre y X. Miarnau. 2009. Variedades de almendro IRTA. Disponible en: <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/02527.pdf>. Leído el 15 de agosto del 2011.

Viveros M. 2007a. Situación actual del almendro en California. pp. 17-22. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

Viveros M. 2007b. Evaluación de clones de Nonpareil y nuevos polinizantes. pp. 111-114. En: IV Seminario del almendro. Tecnologías de producción y perspectivas del almendro en Chile. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 208 p.

ANEXO

Anexo I

Características de las variedades de almendro utilizadas en el ensayo.

Marcona. Origen español. Autoestéril. Árbol de vigor mediano, ramificación muy densa. Época de floración media y maduración tardía. Almendra característica, por su forma redondeada; sin semillas dobles, con cáscara dura (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). De gran fertilidad, muy productiva, y es considerada como la variedad de mayor calidad a nivel mundial, es la variedad más cultivada en España (Felipe y Socías, 1986). Florece 3 días antes que Nonpareil y se cosecha 4 semanas después (Viveros, 2007b). En Chile, posee una buena producción, y la almendra es muy sana, pudiendo ser una interesante alternativa para el riego, pero es necesario detectarle un polinizante apropiado (Reginato y Mauro, 2007).

Nonpareil. Originaria de California (1879). Autoestéril. Árbol de vigor alto y hábito de crecimiento medianamente erecto. Época de floración media y maduración temprana. Almendra de tamaño grande, de forma ovalada, de cáscara muy delgada, algunas veces no bien cerrada; semilla relativamente aplastada y ovalada, con pocas dobles (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Es la más utilizada en California y es de alta productividad. Variedad más importante del mundo (Lavín y Silva, 2001).

Carmel. Originaria de California (1966). Fue producto de una mutación de Nonpareil (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Árbol de vigor medio, semi-erecto. Época de floración media y maduración media-tardía (Pensa, 2001). Almendra con semilla de tamaño medio y forma alargada, con pocas dobles. Se poliniza con Fritz, Nonpareil, Price, Solano y Merced (C.V. Chile, 2000). En Chile es la segunda variedad más plantada, siendo muy utilizada como polinizante de Nonpareil (Castro, 2007). Cáscara semi-dura y resistente a *Amyelois transitella* (Viveros, 2007a).

Thompson. Originaria de California. Autoestéril. Árbol vigoroso, algo erecto; mediano a grande, productivo. Época de floración y maduración tardía. Almendra de cáscara blanda (Lavín y Silva, 2001). Sensible a déficit hídrico. Excelente polinizador de Nonpareil (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984) y de Texas (Sotomayor, 1990).

Ne plus Ultra. Originaria de California. Autoestéril. Árbol de forma abierta y productivo. Hasta 1960 fue considerada uno de los mejores polinizantes de Nonpareil. Floración temprana y maduración media y escalonada. Almendra grande, elíptica y alargada

(Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984) y de cáscara blanda, bien sellada, con alto porcentaje de dobles (Abascal, 1992; Sotomayor, 1990).

Price. Originaria de California. Autoestéril. Árbol de vigor alto y hábito de crecimiento abierto (C.V. Chile, 2000). Época de floración media y maduración medianamente precoz (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Fruto grande y almendra de forma ovalada; con frutos dobles los primeros años. Se poliniza con Carmel, Merced y Nonpareil (C.V. Chile, 2000).

Solano: Originaria de California. Autoestéril; árbol de vigor medio, semierecto. Época de floración media y maduración media-temprana. Almendra grande, de cáscara blanda, de forma oblongo-ovada; pocos frutos dobles. Se poliniza con Carmel, Merced y Nonpareil (C.V. Chile, 2000). Pobre productividad, ha mostrado tendencia a la alternancia (Viveros, 2007b).

Sonora. Originaria de California. Autoestéril. Árbol de tamaño medio, de copa semiesférica y produce en ramillas largas. Época de floración y maduración media-temprana. Almendra de cáscara delgada, tipo “papel”, no bien sellada, con semillas de tamaño medianamente grande y alargada. Presenta tendencia a floración alternada. Se poliniza bien con Nonpareil, Ne Plus Ultra, Peerless, Texas, Merced y Thompson (Abascal, 1992; Asai *et al.*, 1998). Variedad de floración temprana, es un gran polinizante de Nonpareil (Viveros, 2007b).

Desmayo Largueta. Origen español. Autoestéril. Árbol de vigor medio, de forma abierta, con ramas descendentes. Floración precoz, fruto de cáscara dura y maduración muy tardía. Almendra es alargada, y semilla elíptica, puntiaguda y lisa. Variedad productiva. (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Se poliniza con Desmayo Rojo y con otras variedades precoces (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984; Riera y Ferrán, 1975). La productividad es alta, aunque cuenta con floración temprana, más expuesta a las heladas. (Vargas *et al.*, 2009).

Fritz. Originaria de California. Variedad de alta producción durante los primeros diez años y luego disminuye, por falta de vigor vegetativo. Época de floración media, gran cantidad de frutos dobles (Grasselly y Crossa-Raynaud, 1984). Cáscara semi-dura y puede ser susceptible a *Amyelois transitella*. La cosecha es tardía. Polinizante de Nonpareil (Viveros, 2007a).

Wood Colony. Originaria de California. Es una variedad exclusiva. Árbol de tamaño pequeño y compacto, permite plantaciones en alta densidad. La floración coincide con Nonpareil y Carmel y se cosecha 10 días después de Nonpareil. Almendra es de forma alargada, con una cáscara semi-suave y bien cerrada (Dave Wilson Nursery, 2011). En Chile ha presentado un comportamiento muy interesante, con rendimientos de 3000 kg de pepa por ha.

Masbovera. Origen español. El árbol es vigoroso, de tamaño medio-erecto y con una intensidad de ramificación media, fácil de formar y podar, con un buen nivel de tolerancia a *Fusicoccum* y con frutos de calidad, sin almendras dobles, buen aspecto del grano y cáscara

dura. La capacidad de producción es alta a muy alta y el fruto se produce en dardos. La época de cosecha es media a tardía (Godoy, 2007; Vargas *et al.*, 2009).

Glorieta. Origen español. El árbol es vigoroso, de tamaño medio-erecto e intensa ramificación, fácil de formar y podar. La capacidad de producción es alta a muy alta y el fruto se produce en dardos. La pepa es larga, elíptica y puntiaguda, sin almendras dobles, buen aspecto del grano y cáscara dura. La época de cosecha es media a tardía (Godoy, 2007; Vargas *et al.*, 2009).

Francolí. Origen español. El árbol es vigoroso, de tamaño medio y un poco abierto, su intensidad de ramificación es buena, fácil de formar y podar. Floración tardía, elevada capacidad productiva, con un buen nivel de tolerancia a *Fusicoccum* y con frutos de calidad (Godoy, 2007; Vargas *et al.*, 2009).

Anexo II

Grupos de incompatibilidad cruzada (CIGs), en variedades californianas de almendro (adaptado de Kester *et al.*, 1994a, Sotomayor, 2007).

CIG	Variedades	Alelos S
I	Nonpareil, I.X.L., Long I.X.L., Profuse, Tardy Nonpareil	ScSd (S3S4)
II	Mission, Ballico, Languedoc, Texas	SaSb(S1S2)
III	Thompson, Robson, Harvey, Granada, Sauret 2, Mono, Wood Colony	SaSc
IV	Merced, Ne Plus Ultra, Price, Cluster, Norman, Ripon, Rosseta	SbSc
V	Carmel, Carrion, Sauret 1, Livingston, Monarch	SaSd
VI	Monterey, Seedling 1-98	SbSd
VII	Sonora, Vesta, Solano, Kapareil	S?Sd
Identificación parcial	Butte, Grace	S?Sd
Aún no identificados	Fritz, Aldrich, Ruby, Padre	S?S?
Autofértiles	Lauranne, Guara, Tuono, Genco, Steliette, Antoñeta, Marta	SfS?

Anexo III

Procedimiento para la preparación de las muestras (Martin, 1959).

1. Extracción de los pistilos de las flores.
2. Fijar en FAA (formalina 1: alcohol (80%)8: ácido acético 1), por 24 horas o más.
3. Enjuagar los pistilos con agua corriente.
4. Colocar los pistilos en una solución de hidróxido de sodio (8 N), por 8 a 24 horas, para limpiar y suavizar el tejido, y permitir una adecuada penetración del colorante.
5. Lavado de los pistilos con agua, para remover completamente el hidróxido de sodio.
6. Tinción con una solución de anilina azul hidrosoluble al 0,1%, en K_3PO_4 , 0,1 N, por 4 horas.
7. Montaje de los pistilos sobre tinción en portaobjeto, con cubreobjeto.
8. Observación de las muestras al microscopio de fluorescencia.

Anexo IV**Solución de Alexander**

Etanol 95%	10 mL
Verde malaquita 1% (p/v) en etanol 95%	1 mL
Fenol	5 g
Fucsina ácida 1%(p/v) en agua	5 mL
Anaranjado G 1%(p/v) en agua	0,5 mL
Ácido acético	2 mL
Glicerol	25 mL
Agua destilada	50 mL
Hidrato cloral	5 g

Anexo VI

Alelos S de variedades de almendro (adaptado de Kester y Gradziel, 1996; Boskovic *et al.*, 1997; Boskovic *et al.*, 2002; Kodad *et al.*, 2006).

Variedad	Alelos S	Origen
Desmayo Langueta	S ₁ S ₅	España
Glorieta	S ₁ S ₅	España
Francolí	S ₁ S ₅	España
Nompareil	S ₇ S ₈	EE.UU.
Carmel	S ₅ S ₈	EE.UU.
Masbovera	S ₁ S ₉	España
Ne Plus Ultra	S ₁ S ₇	EE.UU.
Price	S ₁ S ₇	EE.UU.
Thompson	S ₅ S ₇	EE.UU.
Marcona	S ₁₁ S ₁₂	España
Wood Colony	S ₅ S ₇	EE.UU.
Fritz	S ₁ S ₆	EE.UU.
Sonora	S ₈ S ₁₃	EE.UU.
Solano	S ₈ S ₁₃	EE.UU.

Anexo V

Intercompatibilidad entre Marcona y 14 variedades de almendro, evaluada mediante la observación del grado de crecimiento del tubo polínico.

Cruzamientos (♀ x ♂)	Compatibilidad / incompatibilidad	Alcance o desarrollo del tubo polínico (48 horas después de la polinización a 25 °C)
Marcona x Desmayo Langueta	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Desmayo Rojo	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Carmel	Compatible	Hasta 1/2 del pistilo
Marcona x Ne Plus Ultra	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Price	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Glorieta	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Wood Colony	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Fritz	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Sonora	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Solano	Compatible	Hasta 2/3 del pistilo
Marcona x Thompson	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Masbovera	Compatible	Hasta el ovario
Marcona x Francolí	Compatible	Hasta 1/2 del pistilo
Marcona x Nonpareil	Compatible	Hasta 2/3 del pistilo
Marcona x Marcona	Incompatible	Pocos, y detienen crecimiento 1/3
Desmayo Langueta x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Desmayo Rojo x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Carmel x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Ne Plus Ultra x Marcona	Compatible	Muchos hasta 1/2 del pistilo
Price x Marcona	Compatible	Pocos hasta el ovario, muchos hasta 1/3
Glorieta x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Wood Colony x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Fritz x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Sonora x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Solano x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Thompson x Marcona	Compatible	Hasta el ovario
Masbovera x Marcona	Compatible	Hasta 2/3 del pistilo
Francolí x Marcona	Compatible	Hasta 1/2 del pistilo
Nonpareil x Marcona	Compatible	Hasta el ovario

