

Incompatibilidad del capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVaugh) como portainjerto del cerezo dulce (*Prunus avium* L.)

Guzmán Félix¹
Magdiel Torres²
María del Carmen Herrera³
Raúl Nieto¹
Gustavo Almaguer¹
Javier López⁴
Sergio Segura^{3§}

¹Instituto de Horticultura-UACH. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, México. CP 56230. ²ITVM. Carretera Morelia-Salamanca km 6.5, Morelia, Michoacán. CP. 58100. ³CRUCO-Universidad Autónoma Chapingo. Perif. Ind. 1000, Morelia, Michoacán. CP. 58170. ⁴Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, México. CP. 56230.

§Autor para correspondencia: ssegura@correo.chapingo.mx.

Resumen

El capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVough 1951) es una subespecie de *P. serotina* Ehrh. de origen mesoamericano utilizada como frutal principalmente. Aunque desde los 80's se tenían reportes de una colecta de capulín del centro de México, llamada San Martín, que presentaba compatibilidad con el cerezo (*Prunus avium* L.) posiblemente porque fuera un capulín diploide, esta posible cualidad no había sido objeto de estudio dado que el cerezo es poco cultivado en el país. Esta situación está cambiando por la liberación de nuevas variedades de cerezo de bajo requerimiento de frío invernal. Retomamos la idea de probar a los materiales de capulines que habían sido descritos como posibles patrones del cerezo dada la cualidad del primero de adaptarse a los suelos en México y a la susceptibilidad de los portainjertos tradicionales del cerezo al cáncer (*Dibotryon* sp.) o tizón de fuego (*Phytophthora* sp.) principalmente. En esta investigación, no se localizó compatibilidad notable del capulín Chapingo con el cerezo y al buscar las causas analizando a ambas especies por medio de citometría de flujo encontramos que el capulín San Martín es tetraploide y no diploide como se suponía. Lo anterior, se agrega a la posible producción de compuestos fenólicos que es común en *Prunus* produciendo entonces una incompatibilidad traslocalizada que observamos en la mayoría de las plantas injertadas.

Palabras clave: *Prunus*, citometría, México, propagación.

Recibido: mayo de 2018

Aceptado: junio de 2018

Introducción

El capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) VcVaugh) ha sido utilizado en el país con múltiples propósitos, entre los cuales destacan: consumo de fruto en fresco, de sus semillas tostadas y forestería (Rzendowski y Calderón, 2005; Fresnedo *et al.*, 2011). McVaugh (1951), clasificó al capulín como una de las cinco subespecies de *Prunus serotina* Ehrh. con base en sus caracteres morfológicos y zonas de distribución. Avendaño-Gómez (2015); Rzendowski y Calderón (2005); Rohrer (2014) afirman que los capulines son la única subespecie realmente domesticada y que su rango de distribución se extendió por influencia humana a lo que comprende el territorio americano desde el sur de Canadá, hasta el sur de Bolivia entre los 1 200 y 3 200 msnm. Segun Halarewicz *et al.* (2017), esta especie es ahora una potente invasora en Europa. Fresnedo *et al.* (2011) estudio la morfología de los capulines del centro-occidente de México y encontró una estructuración de la variación donde los capulines del centro del país parecen ser domesticados como sugiere Avendaño-Gómez (2015).

Muratalla (1984) reportó nuevas perspectivas de uso del capulín al introducir algunas variedades de cerezo dulce injertándolas en colectas de capulín provenientes de Puebla, México. De sus ensayos solo una colecta presentó compatibilidad con el cv Cristobalina de cerezo y la nombró capulín San Martín. De esta experiencia también anoto que el tipo de injerto de hendidura le dio los mejores resultados, ya sea utilizando al capulín como patrón para cerezo o utilizando al capulín como interinjerto. Al buscar un uso de los capulines en Centroamérica, Navarro *et al.* (1996) en Honduras probó diferentes tipos de injerto y épocas en capulines y distinguió que el injerto tipo inglés simple en octubre le producía un éxito superior a 60% de plantas injertadas.

Como lo señaló Olmstead *et al.* (2006); Gainza *et al.* (2015), la producción moderna de cerezos necesita de plantaciones en alta densidad, uso de portainjertos que controlen el vigor y aumenten la precocidad con bajos costos de manejo y económicamente viables para los productores. En la busca de un portainjerto para las nuevas variedades de cerezo de bajo requerimiento de frío, el objetivo de nuestro estudio fué de probar al capulín San Martín como portainjerto del cerezo dada su adaptación a los suelos en México y a la susceptibilidad de los portainjertos tradicionales del cerezo al cáncer (*Dibotryon* sp.) o tizón de fuego (*Phytophthora* sp.) principalmente. Lo anterior en el interés de explorar el cultivo del cerezo en el país.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Regional Universitario Centro Occidente de la Universidad Autónoma Chapingo (CRUCO) en Morelia, Michoacán. El CRUCO se localiza en la latitud 19° 52' y la longitud 101° 02' con una altura de 1 920 msnm.

Material vegetal

Se multiplicaron vía semilla a individuos de una colecta identificada por Muratalla (1984) como San Martín de (*Prunus serotina* ssp. *capuli*). Se establecieron 160 árboles de capulín en el campo del CRUCO a una distancia de 1 m entre árboles y 2 m entre hileras. El Cuadro 1 da cuenta de las características del capulín tipo San Martín.

Cuadro 1. Origen, ambiente e identidad taxonómica reportadas para la colecta San Martín de *Prunus serotina* ssp. *capuli* que sirvió como portainjerto.

Clave	Población y estado	Ambiente		Identidad taxonómica reportada
		Ubicación geográfica	Condiciones	
Mex	Chapingo, México	19° 29' 58" N 98° 52' 44" W 2 270 msnm	C(w0) wb(i)g Colección en huerto frutícola experimental Encino	<i>Prunus serotina</i> ssp. <i>capuli</i> (Cav.) Mc Vaugh

Los árboles de capulín que fueron injertados con cerezo presentaban un año de edad desde su germinación, se seleccionaron plantas que presentaran características homogéneas en cuanto a altura y diámetro presentando aproximadamente 2.5 cm de diámetro y 120 cm de altura, las plantas estaban libres de enfermedades. Se utilizó el método de injertación de hendidura simple recomendado por Muratalla (1984) y se injertaron las variedades Stella, Van, Lapin, Brooks y Bourlat en número igual de repeticiones. Por último, se ató el injerto con una cinta plástica verde de 1 cm de ancho por 20 cm de largo dejando libre la yema para su libre crecimiento (Figura 1).



Figura 1. Injertación de cerezo (*Prunus avium* L. en Capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVaugh.

Variables evaluadas

A continuación, se anotan en el Cuadro 2 las variables que se evaluaron.

Cuadro 2. Variables evaluadas en los injertos *Prunus serotina capuli/Prunus avium*.

Órgano	Descriptor morfológico	Abreviación	Unidad de medición
Árbol completo	Altura de la planta	ADP	(m)
Tallos y ramas	Diámetro de tallo patrón	DDTP	(cm)
	Diámetro de tallo injerto 1	DDTI 1	(cm)
	Diámetro de tallo injerto 2	DDTI 2	(cm)
	Número de ramas	NDR	Número
Hojas	Número de hojas	NDH	Número
	Ancho de hoja	ADH	(cm)
	Longitud de la hoja	LDH	(cm)
Porcentaje de prendimiento		PDP	Número

Estimación de contenido de ADN nuclear por citometría de flujo

Aislamiento de núcleos celulares

El protocolo de aislamiento de núcleos celulares recomendado por Arumuganathan y Earle (1991) con modificaciones sirvió para analizar las hojas jóvenes de las plantas. En seguida el resumen del protocolo: colocar en una placa Petri una pequeña cantidad de tejido de la planta de estudio y del estándar de referencia empleado (aproximadamente 30 mg de cada tejido). Colocar ambos tejidos uno encima del otro para uniformizar un posible efecto de compuestos citosólicos. Anadir 1 mL del tampón (LB01, tris MgCl₂, etc.) a la placa Petri.

Cortar de inmediato ambos tejidos con una cuchilla o bisturí (usar en cada muestra analizada una cuchilla nueva) en rodajas muy finas en el tampón escogido e incubar en hielo durante al menos 15 minutos. Mezclar el homogeneizado pipeteando arriba y abajo varias veces (evitar la formación de burbujas de aire). Filtrar la suspensión a través de una malla de nailon de 42 µg en un tubo de microcentrífuga. Anadir el fluorocromo (en el caso de DAPI se usa normalmente una concentración de 4 µg mL⁻¹, mientras que en el caso de IP y EB es de 50 µg mL⁻¹ junto con 50 µg mL⁻¹ de RNasa), y agitar suavemente. Incubar la muestra en hielo y oscuridad antes de su análisis (de 15 min a 1 h), agitando ocasionalmente los tubos.

Análisis de citometría de flujo

Las muestras fueron analizadas en laboratorio en un citómetro de flujo acústico Attune[®] configuración de laser de argón azul/violeta a una intensidad de 50 mW a 450 nm/20 mW a 488 nm respectivamente (Life Technologies, San Diego CA, USA). Para esto se utilizó fluorocromo yoduro de propidio (PI Sigma - Aldrich) para teñir los núcleos vegetales aislados y se ocupó como especie de referencia tejido de *Hordeum vulgare* “Sultan” (5.19 pg de ADN) procedente del banco de germoplasma del Centro Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT)- México. Se realizaron las mediciones a cada individuo para hacer la representación de las *taxas* evaluadas. En cada análisis realizado se midió al menos 10 000 eventos y un volumen de muestra de 200-300 µL. El coeficiente de variación en cada análisis ha sido inferior a 5. El tamaño de genoma de cada muestra fue estimado de acuerdo con la fórmula:

ADN 2C (pg) = valor G1 muestra X = el tamaño genoma estándar (5.19 pg)/valor G1 del standard.

Resultados y discusión

El capulín *P. serotina* ssp. capuli y los cultivares de cerezo Stella, Van, Lapin, Brooks y Bourlat no desarrollaron una unión de injerto que pueda considerarse compatible. No existió diferencia notable entre los cultivares de cerezo, de los individuos con prendimiento, dos fueron de la variedad Stella, dos de Brooks y dos de la variedad Lapin. En la Figura 2, se verifica el porcentaje de prendimiento que se obtuvo en general para los injertos de cultivares de cerezo sobre capulín. El prendimiento fue 3.75% de la totalidad de individuos injertados.

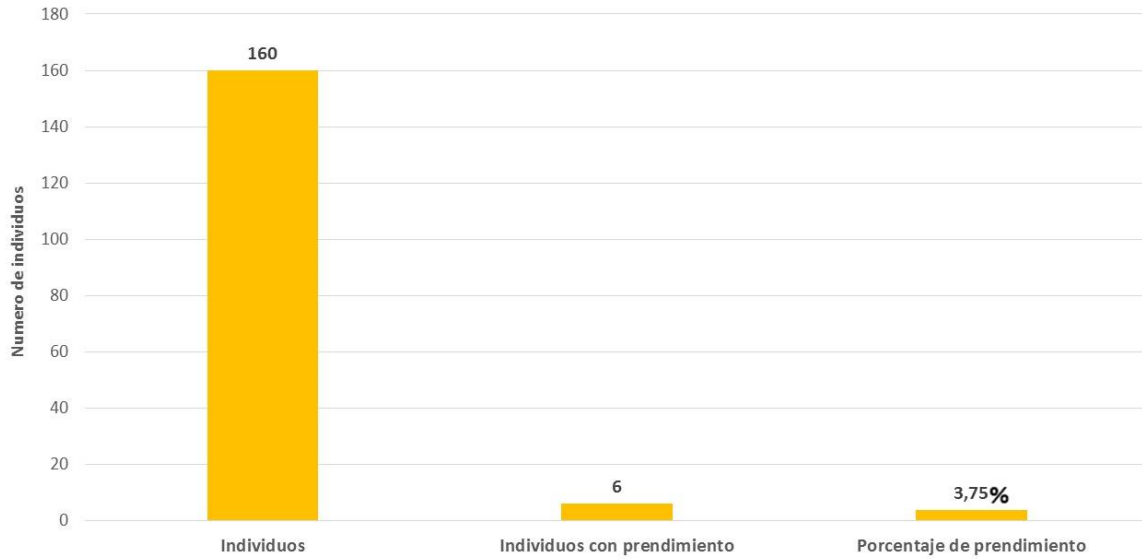


Figura 2. Porcentaje de prendimiento del cerezo injertado en capulín.

Registro del desarrollo de los individuos

En la Figura 3 se observa el desarrollo de los individuos injertados tomando en cuenta las medias de las ocho variables medidas.

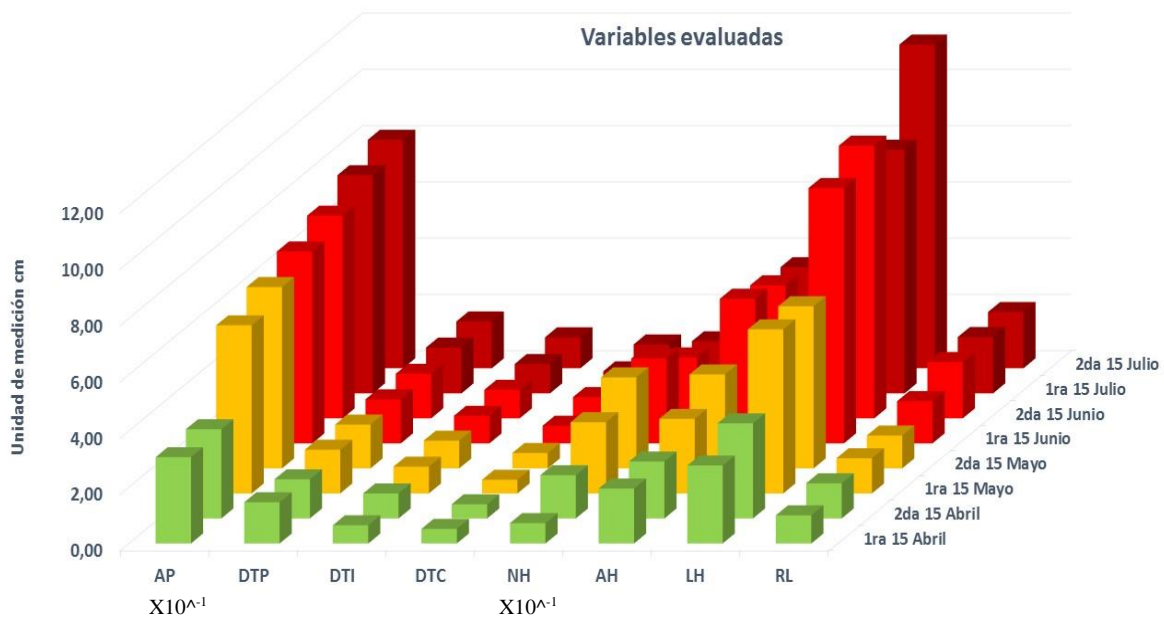


Figura 3. Desarrollo de los individuos injertados de cerezo sobre capulín.

La incompatibilidad entre el capulín y el cerezo quedo de manifiesto por el número de individuos con prendimiento (6 individuos que representan 3.75% del total de individuos injertados). Esto no permitió la aplicación de pruebas inferenciales y enseguida se describe el desarrollo de las plantas

sobrevivientes lo cual nos permite también tomar elementos para entender la incompatibilidad de la mayoría de plantas. Así, fue importante notar que la altura de planta (AP) presentó un desarrollo ascendente excepto en la segunda quincena de abril donde los individuos presentaron un menor crecimiento, el mismo se reanudó a partir de la primera quincena de mayo y se mantuvo hasta 5 cm por quincena. Al final el crecimiento llegó hasta 81 cm en promedio.

De igual manera el diámetro de tallo patrón(DT) presenta un desarrollo ascendente, pero en la segunda quincena de abril disminuyó. El diámetro de tallo del injerto(DTI) presentó un patrón similar llegando a un desarrollo final de 1.10 cm. En la variable número de hojas (NH) los individuos inicialmente presentaban en promedio alrededor de 7 hojas y al final del periodo llegaron a presentar en promedio 20 hojas. El ancho de hoja (AH) presentó un desarrollo generalmente en promedio de 0.5 cm en cada quincena llegando a un crecimiento final de 5.55 cm. La longitud de hoja (LH) presentó un desarrollo en sus medias generales de 2 cm cada quincena. Las ramas laterales (RL) de los individuos se podían observar a partir de la primera quincena de abril y al final del registro de los individuos, en promedio llegaron a presentar 2 ramas laterales en la segunda quincena de julio.

El registro de los diámetros de los individuos diámetro de tallo patrón (DTP) y diámetro de tallo del cerezo (DTC) en los individuos sobrevivientes describe una progresión modesta pero favorable.

En la Figura 4 se presentan las medias de las variables evaluadas de los individuos que sobrevivieron. La figura refiere a que las variables con mayor desarrollo fueron altura de planta (AP) se llega a obtener un desarrollo superior a $66 \text{ cm} \times 10^{-1}$ en su media general, número de hojas (NH) en el cual los individuos presentaron un máximo de 20 hojas en su registro $\times 10^{-1}$, ancho de hoja (ADH) variable en la cual los individuos sobrevivientes llegaron a observar un desarrollo en promedio de 3.80 cm y finalmente la variable longitud de hoja (LDH) la media general obtenida por los individuos sobrevivientes presento un desarrollo de 7.33 cm.

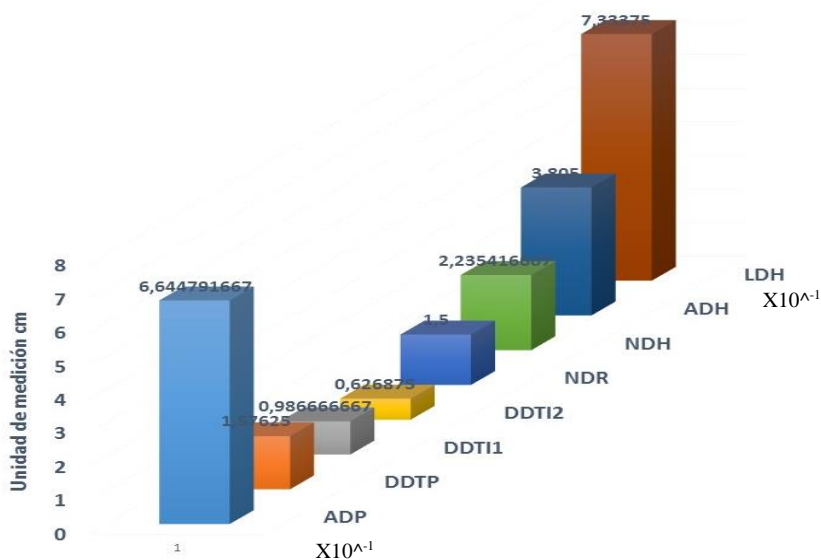


Figura 4. Promedio de las variables de individuos vivos.

Los resultados de este estudio coinciden con lo señalado por Gainza *et al.* (2015) quien reconoce a la incompatibilidad traslocalizada en *Prunus* como aquella que durante el primer año de injertación presenta una defoliación, decoloración de la hoja y un subsecuente no desarrollo asociada con un bloqueo de traslocación de carbohidratos principalmente.

En las diferentes especies cultivadas del género *Prunus*, existen escasos portainjertos de alta gama, esto debido a la incompatibilidad presente entre portainjerto e injerto impidiendo una unión funcional fuerte y duradera. La incompatibilidad en el género *Prunus* es muy presente en especies como la cereza, almendra, chabacano, durazno y ciruela (Gainza *et al.*, 2015).

Usenik (2006) mencionan que los datos recientes demuestran que varias vías bioquímicas se ven afectadas durante la formación de la unión de un injerto. En *Prunus* es común el metabolismo de los compuestos fenólicos. Según Olmstead (2006); Gainza *et al.* (2014), mencionan que pequeñas cantidades de fenoles pueden ser sumamente suficientes para producir disfunciones limitantes a nivel local en la interface entre dos o más células. Mientras tanto por otra parte, los estudios que utilizan cultivos de callos de *Prunus avium* L. han demostrado que la podaflavina (fenol típico de las especies de *Prunus*) interfiere con la permeabilidad de los tejidos, lo que resulta con el daño de la membrana. En uniones de injertos incompatibles, existe movilidad de fenoles de la vacuola en el citoplasma, causando estrés que resulta en la disfunción del crecimiento, lo cual probablemente es causada por la inhibición de la vía de lignina (Kueger *et al.*, 2012). Además, concentraciones de catequinas y proantocianidinas estos flavonoides, aumenta bajo estrés y el injerto no es excepción (Pina y Errea, 2005).

Sorce *et al.* (2002); Koepke y Dhingra (2013); Souza (2015) mencionan que en un trastorno complejo como la incompatibilidad existe un fondo bioquímico también complejo y dependiente de las interacciones genéticas específicas entre las células del patrón e injerto. El éxito de la unión depende primordialmente de la compatibilidad de la unión del injerto para permitir un rápido desarrollo de las conexiones vasculares entre el patrón y el injerto (Olmstead *et al.*, 2006) permitiendo esto a su vez la rápida reanudación patrón e injerto y la regeneración vascular de los tejidos del xilema y floema de ambas partes mediante una diferenciación celular (Gainza, 2014; Souza, 2015).

Tamaños de genoma

A continuación, se presentan los histogramas obtenidos de la estimación de contenido de ADN nuclear de nuestras especies evaluadas permitiéndonos determinar el tamaño de genoma de *P. avium* L. y *P. serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVaugh. Todos los cultivares de cerezo presentaron el mismo valor.

En el ámbito genético Dickson *et al.* (1992) indican variaciones de ploidía en el capulín que van desde diploides hasta hexaploides. Downey e Iezzoni (2000), mencionan, que *Prunus serotina* es una especie tetraploide y Pairon y Jacquemond (2005) con base en un análisis con marcadores de ADN tipo microsatelites la determinó como allotetraploide. Diversos autores como Beck *et al.*, (2014); Guzmán *et al.* (2018) y Pairon y Jacquemart (2005) han revelado una diversidad genética estrecha en la especie. Este es el primer estudio que determina el tamaño del genoma de *P. serotina* ssp. *capuli* que coincide con el valor de $1C = 0.5$ pg que Dickson *et al.* (1992) reportaron para la especie *P. serotina* Ehrn. y con el valor de $1C = 0.35$ pg que Arumuganathan y Earle (1991)

reportaron para *P. avium* L. En la Figura 5, se observan los resultados obtenidos del análisis de citometría de flujo donde se puede ver que el cerezo dulce (*P. avium* L.) presenta un tamaño de genoma menor capulín San Martín (*P. serotina* ssp. *capuli*) posiblemente esta diferencia está relacionada con el bajo prendimiento del injerto.

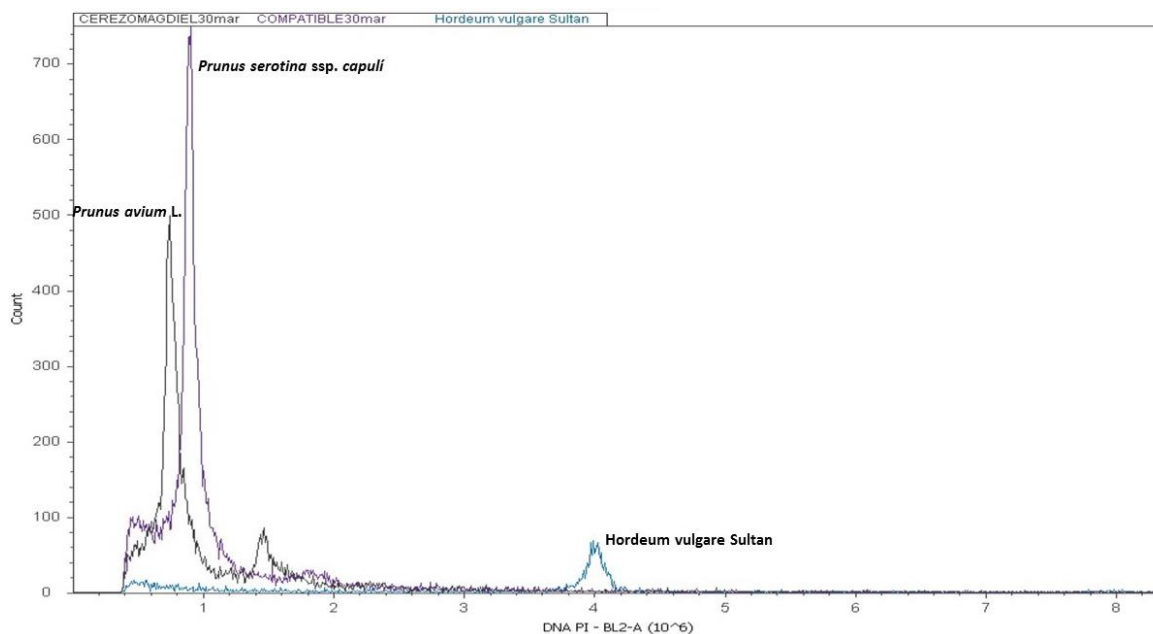


Figura 5. Histograma de la estimación del contenido de ADN por citometría de flujo del cerezo (cv Stella) y el capulín tipo San Martín.

Considerando los factores genéticos y anatómicos que afectan la compatibilidad del capulín y el cerezo, el análisis del tamaño del genoma puede ser importante para entender esta relación. Posiblemente una de las causas de la incompatibilidad del capulín como portainjerto del cerezo pueda estar asociada con los factores genéticos que se traducen en caracteres anatómicos como lo señala Souza *et al.* (2014) en un estudio similar en *Psidium*. En este estudio, las diferencias de los tamaños del genoma, puede ligarse a la dificultad de fusión e intercambio celular debido a que el tejido de cada especie continua a reproducirse por mitosis manteniendo su número propio de genoma y dosificaciones genéticas en las vías metabólicas y esto conduce a la no unión de los tejidos. Así, la técnica de citometría de flujo puede ayudar en las primeras etapas de la evaluación de la utilidad frutícola de las otras subespecies de *P. serotina* Ehrn.

Conclusión

Los cultivares Stella, Van, Lapin, Brooks y Bourlat de Cerezo (*Prunus avium* L.) presentan una incompatibilidad presumiblemente traslocalizada al ser injertados sobre el capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli* (Cav.) McVough) identificado como tipo San Martín. Posiblemente una de las causas de la incompatibilidad del capulín como portainjerto del cerezo pueda estar asociada con los factores genéticos que se traducen en una defoliación, decoloración de la hoja y un subsecuente no desarrollo asociada con un posible bloqueo de traslocación de carbohidratos principalmente. La determinación del tamaño de genoma por citometría de flujo puede ayudar en las primeras etapas de la evaluación de la utilidad frutícola de las otras subespecies de *P. serotina* Ehrn.

Agradecimientos

El primer autor recibió una beca del CONACYT, para estudios de doctorado en la UACH. El financiamiento estuvo provisto por el proyecto: CB 2011 169334 del CONACYT- México y por la DCRU de la UACH. Agradecemos las sugerencias del M.C. Alfonso Muratalla del CP y las facilidades del Dr. Peaubelle del HCU Lyon-Sud, Lyon Francia.

Literatura citada

- Arumuganathan, K. and Earle, E. D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 9(3):229-233.
- Avendaño-Gómez, A.; Lira-Saade, R.; Madrigal-Calle, B.; García-Moya, E.; Soto-Hernández, M. y Romo de Vivar- Romo, A. 2015. Manejo y síndromes de domesticación del capulín (*Prunus serotina* Ehrh ssp. *capuli* (Cav.) Mc Vaugh) en comunidades del estado de Tlaxcala. *Agrociencia*. 49(2):189-204.
- Beck, J. B.; Ferguson, C. J.; Mayfield, M. H. and Shaw, J. 2014. Reduced genetic variation in populations of black cherry (*Prunus serotina* subsp. *serotina*: Rosaceae) at its Western Range Limit in Kansas. *Northeastern Nat.* 21(3):472-478.
- Dickson, E. E.; Arumuganathan, K.; Kresovich, S. and Doyle, J. J. 1992. Nuclear DNA content variation within the Rosaceae. *Am. J. Bot.* 79(9):1081-1086.
- Fresnedo, J.; Segura, S. and Muratalla-Lúa, A. 2011. Morphovariability of capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Gen. Res. Crop Ev.* 58(4):481-495.
- Gainza, F.; Opazo, I. and Muñoz, C. 2015. Graft incompatibility in plants: metabolic changes during formation and establishment of the rootstock/scion union with emphasis on *Prunus* species. *Chilean J. Agric. Res.* 75(1):28-34.
- Guzmán, F.; Segura, S. Aradhya, M. and Potter, D. 2018. Evaluation of the genetic structure present in natural populations of four subspecies of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) from North America using SSR markers. *Sci. Hortic.* 232:206-215.
- Halarewicz, A.; Pruchniewicz, D. and Kawalko, D. 2017. Black Cherry (*Prunus serotina*) invasion in a scots pine forest: relationships between soil properties and vegetation. *Polish J. Ecol.* 65(2):295-302.
- Kueger, S.; Steinhäuser, D.; Willmitzer, L. and Giavalisco, P. 2012. High-resolution plant metabolomics: from mass, spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *The Plant J.* 70(1):39-50
- Muratalla, A. 1984. Factores limitantes en la producción de capulín (*Prunus serotina* ssp. *capuli*). Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México. 18 p.
- Olmstead, M. A.; Lang, N. S. Lang, F. G. A.; Ewers, W. and Owens, S. A. 2006. Examining the vascular pathway of sweet cherries grafted onto dwarfing rootstocks. *Am. Soc. Hortic. Sci.* 41(3):674-679.
- Pairon, C. M. and Jacquemart, L. 2005. Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (Rosaceae). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:729-734.
- Pairon, M.; Jacquemart, A-L. and Potter, D. 2008. Detection and characterization of genome-specific microsatellite markers in the allotetraploid *Prunus serotina*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 133(3):390-395.

- Pina, A. and Errea, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility-incompatibility. *Sci. Hortic.* 106(1):1-11.
- Popenoe, W. and Pachano, A. 1922. The capulín Cherry. *J. Heredity.* 13(2):51-62.
- Rohrer, J. R. 2014. *Prunus* (Rosaceae). In flora of North America. (Ed.). Committee Flora of North America North of Mexico. New York: Oxford. 9:363-365.
- Rzedowski, J. y Calderón, R. G. 2005. *Prunus serotina* Ehrh. In: flora del Bajío y regiones adyacentes. Rzedowski, J. y Calderón, de R. G. (Eds.). Instituto de Ecología AC. Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México. 101-111. pp.
- Sorce, C.; Massai, R.; Picciarelli, P. and Lorenzi, R. 2002. Hormonal relationships in xylem sap of grafted and ungrafted *Prunus* rootstocks. *Sci. Hortic.* 93(3-4):333-342
- Souza, A.; Das Graças, de L.; Vilela, R.; Pereira, de L. L.; Semen, M. S. and V. Techio, H. 2014. Chromosome number and nuclear DNA amount in *Psidium* spp. resistant and susceptible to *Meloidogyne enterolobii* and its relation with compatibility between rootstocks and commercial varieties of guava tree. *Plant Syst. Evol.* 301(1):231-237.
- Usenik, V.; Krska, B.; Vican, M. and Stampar, F. 2006. Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using phenol analyses. *Sci. Hortic.* 109(4):332-338.