

Brenda Ivette Guerrero Camacho

Necesidades de polinización,
necesidades agroclimáticas y
diversidad genética en ciruelo de
tipo japonés

Director/es

Rodrigo García, Francisco Javier
Guerra Velo, María Engracia

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

NECESIDADES DE POLINIZACIÓN, NECESIDADES
AGROCLIMÁTICAS Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN
CIRUELO DE TIPO JAPONÉS

Autor

Brenda Ivette Guerrero Camacho

Director/es

Rodrigo García, Francisco Javier
Guerra Velo, María Engracia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021

TESIS DOCTORAL



Necesidades de polinización,
necesidades agroclimáticas y
diversidad genética en
ciruelo de tipo japonés

BRENDA IVETTE GUERRERO CAMACHO

Noviembre 2021



Universidad
Zaragoza



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA



TESIS DOCTORAL

NECESIDADES DE POLINIZACIÓN, NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS Y DIVERSIDAD GENÉTICA EN CIRUELO DE TIPO JAPONÉS.

Presentada por Brenda Ivette Guerrero Camacho
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y del Medio Natural

Dirigida por:

Javier Rodrigo García
María Engracia Guerra Velo

Zaragoza, octubre 2021

María Engracia Guerra Velo, Investigadora del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura y



CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA

Javier Rodrigo García, Investigador del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón,



CERTIFICAN

Que la Memoria titulada “Necesidades de polinización, necesidades agroclimáticas y diversidad genética en ciruelo de tipo japonés”, ha sido realizada por Brenda Ivette Guerrero Camacho, Química Bacterióloga Parasitóloga, bajo su dirección y reúne las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor.

En Zaragoza, 23 de noviembre de 2021

Fdo: Javier Rodrigo García

Fdo: María Engracia Guerra Velo

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RTA2017-00003-00); Agencia Estatal de Investigación (PID2020-115473RR-I00/AEI 436/10.13039/501100011033); Gobierno de Aragón—European Social Fund, European Union (Grupo Consolidado A12_17R), y Junta de Extremadura—Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan Regional de Investigación (IB16181), Grupo de Investigación (AGA001, GR18196).

Brenda I. Guerrero Camacho ha disfrutado de una beca predoctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT, 471839).

Estos últimos cuatro años han sido la experiencia más desafiante y enriquecedora de mi vida, quiero agradecer cada aportación a las diferentes personas que han hecho posible llegar al final de esta tesis.

Agradezco al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura – La Orden, y al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, por la cesión del material vegetal y por permitirme el uso de sus instalaciones para desarrollar el trabajo que hay en esta tesis.

También agradezco la cesión del material vegetal y la disposición para acceder en sus instalaciones a:

- Tulare Creek (Caspe, Zaragoza)
- Viveros Mariano Soria, (La Almunia de Doña Godina, Zaragoza)
- Asociación de Fruticultores de la Comarca de Caspe (Caspe, Zaragoza)

A Pilar Catalán y a Gemma Sausán de la Escuela Politécnica Superior de Huesca, sede del PD en CAMN por auxiliarme en los innumerables trámites con amabilidad, eficiencia y disposición durante estos cuatro años.

A Javier Rodrigo, por transmitirme todos sus conocimientos desde mi primera estancia en el CITA y después de ello por darme la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección, por su apoyo incondicional en todos los trámites que he necesitado desde el primer intento para conseguir esta beca y hasta el día de hoy. Gracias por tu profesionalidad, tus consejos y sabiduría. Tu forma de trabajar me ha hecho disfrutar de cada etapa de la tesis.

A Engracia Guerra, por codirigir esta tesis y porque su pasión por el ‘reborujado’ mundo del ciruelo japonés ha sido fuente de inspiración durante estos cuatro años. Gracias por todo tu apoyo en lo académico y en lo personal durante mis estancias en Badajoz. He sido muy afortunada de coincidir contigo.

Gracias a los dos por ser los mejores directores de tesis que se pueden tener, he aprendido muchísimo de ambos. Lo repito de nuevo, han sido un gran apoyo profesional y personal.

A Ana Pina, investigadora del CITA, por su disposición, asesoramiento y darme acceso al laboratorio de biología molecular para el desarrollo del trabajo con microsátélites. Y por la alegría que contagia dentro y fuera del CITA.

A Afif Hedhli, investigador del CITA, por su asesoramiento en la estadística, espero tener la oportunidad de seguir aprendiendo más de tus conocimientos.

A Érica Fadón, investigadora del CITA, por planear, ejecutar, coordinar y hacer posible la revisión de necesidades de temperatura en frutales de zona templada (Anexo III). Y por el asesoramiento al iniciar el trabajo de los capítulos que recogen este tema.

Al departamento de Hortofruticultura de La Orden-CICYTEX, en especial a todos los que hicieron posible los muestreos en invierno y primavera, y por todo el trabajo que esto implicó.

A todo el personal de Hortofruticultura del CITA que de alguna forma han contribuido al desarrollo de esta tesis y por las buenas mesas de desayuno que armábamos en tiempos pre-pandemia, pero en especial a Pilar Tomey, Nuria, Quique Gaudó, Lourdes y Arantxa por el apoyo en varias etapas de este trabajo.

A Patri y a Sara, por todos los kilómetros que hemos recorrido en los repetidos muestreos de invierno y primavera, que, con todo y los dedos congelados, nos han dado para tratar de solucionar el mundo. Por toda la asistencia técnica que he recibido de las dos. Por escucharme, por los ánimos que siempre me han dado, por todo lo que he aprendido de ellas personal y profesionalmente. Las extrañaré.

A Claudia por ser mi amiga y una excelente compañera de laboratorio, por lo bien que lo hemos pasado dentro y fuera de La Orden, destacando los buenos ratos en el chino-fusión.

A Rosa Fustero. Rosa, has sido una pieza clave en mi estancia aquí en Zaragoza. Gracias por ser una compañera excepcional, por todo tu apoyo en los viajes a campo, en todos los muestreos y en el trabajo de laboratorio. Gracias porque has sido la mejor casera que existe, porque siempre llevaré este rincón de Zaragoza en mi corazón. Pero sobre todo gracias por tu amistad y por ser, junto con David y Jorge, la familia que uno elige. Porque no hay palabras para expresar lo que significan para mi tu compañía y tus cuidados. Te quiero.

A mis compañeros de la sala de predocs, Alejandro, Álvaro, Inés, Irene V., Daniel y Octavio, por todos los momentos divertidos que hemos compartido en el CITA, en las excursiones y en las cenas.

A Fran y a Irene M., por ser el mejor grupo burbuja (incluyo a Nero), que Jorge y yo pudimos tener. Gracias por tantos momentos, por las pijamadas y las tostadas de resaca, por ese viaje a La Ametlla que siempre recordaré, por los eternos debates sobre el origen de las berenjenas con miel, pero, sobre todo, gracias por la amistad. Los quiero.

A la Dra. Layla Muñoz, a la Dra. Ana Cecilia y al Dr. Loreto por haberme transmitido su amor por la ciencia y por estar pendiente de mis pasos durante estos años.

A mis amigas de toda la vida, Marce, Cyn, Nao, Leyla, Sol, Yani y Karen, gracias por los ánimos a distancia. Las quiero a montones.

A mi abue, tíos y primos que me han demostrado su cariño con mensajes y llamadas.

Quiero agradecer a Marisela, Nieves, Hache, Lluvia, Alva y Ana, por hacerme sentir parte de esta bonita familia a través del apoyo y la cercanía aun estando tan lejos. Hache, gracias por compartir con nosotros la experiencia y el significado de tus viajes por el norte de España.

Por último, quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida:

A mis padres, Alma Leticia y José Luis, por su amor incondicional, por haberme dado alas y la libertad de volar, son el hogar al que siempre volveré. A mis hermanos, Ale, Mario y René, por ser mi alegría y mi inspiración. Los cinco son la fuerza que necesito para cumplir metas. Sin duda, el estar lejos ha sido la parte más difícil de esta tesis, pero los mensajes y videollamadas han hecho desaparecer la barrera de la distancia durante estos años, haciéndome sentirlos cerca. ¡Los amo con toda mi vida!

A mi compañero de vida, Jorge. Al comenzar este reto, sabíamos que no iba ser fácil, pero teníamos claro que estando juntos sería más llevadero, y así ha sido. Siempre estaré agradecida con la vida por permitirnos compartir amor, espacio y tiempo, y contigo por hacer del día a día lo mejor de esta vida. ¡Contigo esta y mil metas más, te amo!

*A Jorge, Ale, Mario, René, papá y mamá por el amor que nos compartimos y
a Paula, por ser la luz al final del túnel durante
estos últimos meses.*

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
El ciruelo de tipo japonés	5
<i>Origen del cultivo</i>	5
<i>Situación actual del cultivo</i>	6
Biología reproductiva	8
<i>Floración y polinización</i>	8
<i>Auto- e inter-incompatibilidad floral</i>	9
El reposo invernal	11
<i>Importancia del reposo en la floración</i>	11
<i>Determinación del fin de la endodormancia</i>	12
<i>La cuantificación de frío y calor</i>	12
La complejidad genética del cultivo	14
<i>Variabilidad fenotípica</i>	14
<i>La caracterización molecular</i>	15
<i>La estructura poblacional</i>	16
OBJETIVOS	18
Capítulo 1. ESTABLISHING POLLINATION REQUIREMENTS IN JAPANESE PLUM BY PHENOLOGICAL MONITORING, HAND POLLINATIONS, FLUORESCENCE MICROSCOPY AND MOLECULAR GENOTYPING	
RESUMEN	21
INTRODUCTION	23
MATERIALS AND METHODS	24
<i>Hand-pollination in the field</i>	24
<i>Hand-pollinations in the laboratory</i>	25
<i>Microscopic observations</i>	25
<i>Determinining incompatibility relationships</i>	26
<i>Monitoring flower dates</i>	27
RESULTS	27
DISCUSSION	38
Capítulo 2. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN EN VARIEDADES COMERCIALES Y SELECCIONES AVANZADAS DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS: AUTO- E INTER-INCOMPATIBILIDAD	
RESUMEN	45
INTRODUCCIÓN	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
<i>Material vegetal</i>	49

<i>Caracterización de la época de floración</i>	51
<i>Polinizaciones semi-in vivo en laboratorio</i>	51
<i>Identificación de alelos S</i>	53
<i>Estadística</i>	54
RESULTADOS	55
<i>Épocas de floración</i>	55
<i>Determinación de la auto(in)-compatibilidad</i>	59
<i>Identificación de alelos S y relaciones de incompatibilidad</i>	64
DISCUSIÓN	71
Capítulo 3. NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS DE ACCESIONES DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS	
RESUMEN	81
INTRODUCCIÓN	83
MATERIALES Y MÉTODOS	86
<i>Material vegetal</i>	86
<i>Época de floración</i>	87
<i>Determinación del fin de la endodormancia</i>	87
<i>Estimación de las necesidades de frío</i>	89
<i>Estimación de las necesidades de calor</i>	89
<i>Estadística</i>	90
RESULTADOS	91
<i>Acumulación de frío</i>	91
<i>Fin de la endodormancia</i>	94
<i>Necesidades de frío</i>	96
<i>Fechas de floración</i>	109
<i>Necesidades de calor</i>	109
<i>Correlaciones entre variables</i>	117
DISCUSIÓN	120
Capítulo 4. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN Y NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS EN NUEVOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CIRUELO × ALBARICOQUERO	
RESUMEN	125
INTRODUCCIÓN	127
MATERIALES Y MÉTODOS	130
<i>Material vegetal</i>	130
<i>Época de floración</i>	130
<i>Determinación del carácter de auto(in)compatibilidad</i>	130
<i>Identificación del genotipo S</i>	131
<i>Determinación de las necesidades agroclimáticas</i>	132
<i>Estadística</i>	133
RESULTADOS	135
<i>Determinación de las relaciones de auto- e inter-compatibilidad</i>	135

<i>Determinación de las necesidades agroclimáticas</i>	143
DISCUSIÓN	152
Capítulo 5. GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF JAPANESE PLUM-TYPE (HYBRIDS OF <i>P. salicina</i>) ACCESIONS ASSESSED BY SSR MARKERS	
RESUMEN	159
INTRODUCTION	161
MATERIALS AND METHODS	162
<i>Plant material</i>	162
<i>DNA extraction and SSR analysis</i>	164
<i>Genetic diversity analysis and genetic relationships among accessions</i>	166
RESULTS	166
<i>SSR genotyping</i>	166
<i>Genetic relationships among accessions</i>	167
<i>Analysis of genetic structure</i>	169
<i>Genetic diversity among groups</i>	170
DISCUSSION	171
Capítulo 6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE NUEVAS VARIEDADES Y SELECCIONES AVANZADAS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE CIRUELO × ALBARICOQUERO	
RESUMEN	179
INTRODUCCIÓN	181
MATERIALES Y MÉTODOS	185
<i>Material vegetal</i>	185
<i>Extracción y amplificación de ADN</i>	187
<i>Análisis de la diversidad genética</i>	190
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	192
<i>Diversidad genética</i>	192
<i>Relaciones genéticas entre accesiones y genotipos de referencia</i>	193
<i>Estructura genética</i>	198
<i>Diversidad genética entre grupos poblacionales</i>	201
DISCUSIÓN GENERAL	209
Necesidades de polinización	209
<i>En busca de la autocompatibilidad</i>	209
<i>Selección de variedades polinizadoras</i>	210
Impacto del cambio climático en la floración y el cuajado	212
<i>Disminución de frío invernal</i>	212
<i>Adaptación de la fenología a las nuevas condiciones</i>	213
Limitaciones metodológicas en el estudio del reposo	214
<i>La transición de ecodormancia a endodormancia</i>	214
<i>Biomarcadores de las fases de reposo</i>	215

Diversidad genética	217
<i>Muchas especies, pero poca diversidad</i>	217
<i>El futuro de los híbridos interespecíficos</i>	218
CONCLUSIONES	221
REFERENCIAS	225
ANEXO 1	249
ANEXO 2	261
ANEXO 3	269
ANEXO 4	303

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1. ESTABLISHING POLLINATION REQUIREMENTS IN JAPANESE PLUM BY PHENOLOGICAL MONITORING, HAND POLLINATIONS, FLUORESCENCE MICROSCOPY AND MOLECULAR GENOTYPING

Figure 1. Pollen extraction in Japanese plum.....	30
Figure 2. Hand-pollination experiments to determine sel-(in)compatibility in Japanese plum.....	31
Figure 3. Fruit drop in Japanese plum as affected by different pollination treatments.....	58
Figure 4. Pollen germination and pollen tube growth in self-pollinated flowers in Japanese plum.....	33
Figure 5. PCR amplification using primer set PruC2-PCER on nine Japanese plum cultivars.....	34
Figure 6. Monitoring of phenology of Japanese plum.....	35
Figure 7. Flowering time in four Japanese plum cultivars over 4 years.....	35

Capítulo 2. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN EN VARIEDADES COMERCIALES Y SELECCIONES AVANZADAS DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS: AUTO- E INTER-INCOMPATIBILIDAD

Figura 1. Época de floración en 11 variedades de ciruelo de tipo japonés de la colección de Ibergen en Caspe (Zaragoza) en 2020 y 2021.....	56
Figura 2. Época de floración en 17 accesiones de ciruelo de tipo japonés de la colección de AFRUCCAS en Caspe (Zaragoza) en 2018, 2019 y 2020.	57
Figura 3. Época de floración en 18 variedades de ciruelo de tipo japonés de la colección del CICYTEX-La Orden en Guadajira (Badajoz) en cuatro años consecutivos (2018-2021).....	58
Figura 4. Germinación de los granos de polen y crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas de ciruelo de tipo japonés.....	60
Figura 5. Electroferogramas de la amplificación de fragmentos del gen <i>S-RNasa</i> por PCR con los pares de primers PaConsI-F/PaConsI-R2 y Pru-T2/SI-32 de la variedad Red Beaut (<i>SaSb</i>).....	65
Figura 6. Frecuencia de los alelos <i>S</i> amplificados en las variedades comerciales y selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés analizadas.....	70

Capítulo 3. NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS DE ACCESIONES DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS

Figura 1. Situación de las colecciones de ciruelo japonés utilizadas en el estudio en las provincias de Badajoz (Guadajira) y Zaragoza (Caspe, La Almunia de Doña Godina y Zaragoza).....	87
Figura 2. Determinación del fin de la endodormancia en ciruelo de tipo japonés.....	88

Figura 3. Acumulación de frío en el invierno 2019-2020.....	92
Figura 4. Acumulación de frío según el modelo Dinámico (porciones de frío) en cuatro localidades durante dos inviernos.....	93
Figura 5. Crecimiento de las yemas florales en cuatro variedades de ciruelo de tipo japonés de noviembre a enero.....	94
Figura 6. Crecimiento de las yemas florales en cuatro variedades de ciruelo japonés de noviembre a enero.....	95
Figura 7. Red de correlaciones de Pearson entre necesidades de frío, necesidades de calor, fecha de fin de endodormancia y fecha de plena floración de accesiones de ciruelo de tipo japonés analizados en tres localizaciones.....	
	119

Capítulo 4. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN Y NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS EN NUEVOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CIRUELO × ALBARICOQUERO

Figura 1. Crecimiento de tubos polínicos en pistilos de flores autopolinizadas de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero.....	136
Figura 2. Gel de agarosa de la amplificación de fragmentos del gen <i>S-RNasa</i> por PCR con el par de <i>primers</i> Pru-T2/SI-32.....	139
Figura 3. Electroferogramas de la amplificación de fragmentos del gen <i>S-RNasa</i> por PCR con los pares de primers PaConsI-F/PaConsI-R2 y Pru-T2/SI-32.....	139
Figura 4. Frecuencia de los alelos <i>S</i> amplificados en 93 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen.....	143
Figura 5. Acumulación de frío en Caspe, Zaragoza, según tres modelos (HF, UF y PF) durante dos años.....	144
Figura 6. Red de correlaciones de Pearson entre: horas frío, unidades frío y porciones frío, <i>growing degree hours</i> , fecha de fin de endodormancia y fecha de plena floración de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza).....	151

Capítulo 5. GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF JAPANESE PLUM-TYPE (HYBRIDS OF *P. salicina*) ACCESIONS ASSESED BY SSR MARKERS

Figure 1. Genetic relationships and genetic structure from 161 Japanese plum-type accesions by DAPC.....	168
Figure 2. Scatterplot of DAPC of population structure of 161 Japanese plum-type accesions, showing the first two principal linear discriminants of the DAPC according to the optimal <i>K</i> value.	169

Figure 3. Weighted pairwise F_{ST} values estimated from the seven inferred groups.....	171
--	-----

Capítulo 6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE NUEVAS VARIEDADES Y SELECCIONES AVANZADAS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE CIRUELO × ALBARICOQUERO

Figura 1. Relaciones genéticas y estructura genética inferida por DAPC de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia (ciruelos diploides y albaricoqueros).....	197
Figura 2. Criterios de agrupamiento y validación del DAPC.....	198
Figura 3. Gráfico de dispersión del DAPC definiendo la estructura genética de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia.....	200
Figura 4. Correlaciones de los valores F_{ST} estimados entre los cinco grupos..	203

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 1. ESTABLISHING POLLINATION REQUIREMENTS IN JAPANESE PLUM BY PHENOLOGICAL MONITORING, HAND POLLINATIONS, FLUORESCENCE MICROSCOPY AND MOLECULAR GENOTYPING

Table 1. Reaction conditions	36
Table 2. Pollen germination and pollen tube growth through the style for two Japanese plum cultivars after self- and cross-pollinations.....	37
Table 3. Percentage of in vitro pollen germination of 15 Japanese plum cultivars	38

Capítulo 2. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN EN VARIEDADES COMERCIALES Y SELECCIONES AVANZADAS DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS: AUTO- E INTER-INCOMPATIBILIDAD

Tabla 1. Acciones de ciruelo de tipo japonés analizadas.....	49
Tabla 2. Comportamiento de los tubos polínicos en flores autopollinizadas de 56 variedades y 73 selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés.....	61
Tabla 3. Tamaños (pb) de los fragmentos del gen <i>S-RNasa</i> amplificados por PCR separados por electroforesis capilar identificados en las variedades de referencia.....	65
Tabla 4. Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo <i>S</i> de 43 variedades y 41 selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés analizadas en este trabajo y 60 variedades analizadas en trabajos previos.	67

Capítulo 3. NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS DE ACCESIONES DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS

Tabla 1. Necesidades de frío de 95 acciones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Guadajira (Badajoz) y Caspe, La Almunia y Zaragoza (Zaragoza) expresadas en horas frío, unidades frío y porciones frío....	97
Tabla 2. Clasificación de 95 acciones de ciruelo japonés según sus necesidades de frío en porciones frío (PF), horas frío (HF) y unidades frío (UF)..	108
Tabla 3 Necesidades de calor de 95 acciones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Guadajira(Badajoz) y Caspe, La Almunia y Zaragoza (Zaragoza) en <i>Growing degree hours</i>	110
Tabla 4. Clasificación de 95 acciones de ciruelo japonés según sus necesidades de calor en <i>growing degree hours</i> (GDH).	116
Tabla 5. Coeficientes de correlación de Pearson entre necesidades de frío para salir de la endodormancia, necesidades de calor para la floración; fechas de fin de endodormancia y fechas de plena floración de las acciones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Caspe, Guadajira y Zaragoza en dos años.	118

Capítulo 4. NECESIDADES DE POLINIZACIÓN Y NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS EN NUEVOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CIRUELO × ALBARICOQUERO

Tabla 1. Comportamiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas de 34 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen	137
Tabla 2. Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo <i>S</i> de 90 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen.	141
Tabla 3. Necesidades agroclimáticas para la salida de la endodormancia en 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza) y expresadas en horas frío, unidades frío, porciones frío y <i>growing degree hours</i> (GDH). Se muestran los valores anuales, la media y el coeficiente de variación (CV) (%) entre años (2018-2019).	146
Tabla 4. Clasificación de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen según sus necesidades de frío expresadas en porciones frío (PF), horas frío (HF) y unidades frío (UF).....	148
Tabla 5. Clasificación 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen según sus necesidades de calor expresadas en <i>growing degree hours</i> (GDH).....	149
Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson e intervalos de confianza entre las necesidades de frío para salir de endodormancia, necesidades de calor para la floración, fechas de fin de endodormancia y fechas de plena floración de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora de ciruelo japonés Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza).....	150

Capítulo 5. GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF JAPANESE PLUM-TYPE (HYBRIDS OF *P. salicina*) ACCESIONS ASSESSED BY SSR MARKERS

Table 1. Japanese plum-type accessions analyzed in this study.....	185
Table 2. Multiplex (Mp) design, SSR loci, linkage group (LG), fluorescent dyes, primer concentration (PC), PCR details, and characteristics of the 13 SSR markers analyzed in this study	186
Table 3. Number of alleles and allele size range in base pairs amplified by eight polymorphic SSR in Japanese plum-type accessions	187
Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 161 Japanese plum-type accessions clustered in seven groups.	189
Table 5. Statistics of genetic variation for 161 Japanese plum-type accessions clustered in seven groups.	193

Capítulo 6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE NUEVAS VARIETADES Y SELECCIONES AVANZADAS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE CIRUELO × ALBARICOQUERO

Tabla 1. Nombre y origen de 27 genotipos de referencia. 185

Tabla 2. Nombre, programa de mejora y ancestros de 47 variedades de híbridos interespecíficos. 186

Tabla 3. Nombre y programa de mejora de 68 selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos. 187

Tabla 4. Diseño multiplex (Mp), SSR loci (Locus), Grupo de Ligamiento (GL), fluorocromos, concentración de los *primers* y características de los marcadores SSR analizados en este trabajo. 189

Tabla 5. Número de alelos (N_A), rango de tamaño de los alelos amplificados, Contenido de Información Polimórfica (*PIC*), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e índice de fijación de Wright (F_{ST}) por locus en la población entera. . 193

Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia estructurados en los 5 grupos inferidos según el DAPC. 201

Tabla 7. Estadísticos de diversidad genética en la estructura genética inferida para las 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia. Número de accesiones en cada grupo (n), número de alelos por locus (N_A POR LOCUS), número de alelos totales (N_A TOTAL), riqueza alélica (A_R), número de alelos privados (P_A), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). 202

Tabla 8. Límite inferior (debajo de la diagonal) y superior (sobre la diagonal) del intervalo de confianza del 99 % calculado con un bootstrap de 1.000 repeticiones para las correlaciones de los valores de F_{ST} estimados en los cinco grupos inferidos. 203

RESUMEN

En el ciruelo de tipo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.) se está produciendo una intensa renovación varietal, con la introducción de un gran número de nuevas variedades en los últimos años. En la mayoría de las variedades se desconocen las necesidades de polinización y sus requerimientos agroclimáticos. En este trabajo se ha puesto a punto una metodología para determinar las necesidades de polinización a través del seguimiento de la fenología en campo, polinizaciones controladas, observación del crecimiento de tubos polínicos al microscopio de fluorescencia y genotipado molecular de los alelos *S* (Capítulo 1). Utilizando esta metodología, se han determinado las necesidades de polinización de un grupo de accesiones, de las que 12 fueron autocompatibles, 91 autoincompatibles y 5 androestériles. Las accesiones autoincompatibles se asignaron a los correspondientes grupos de incompatibilidad. Se han identificado tres nuevos grupos [XXVII (*ScSo*), XXVIII (*ScSk*) y XXIX (*ShSo*)] y cuatro nuevos alelos (*S α* , *S β* , *S γ* , *S δ*). Se observó gran variabilidad en la época de floración entre localizaciones y años, mostrando la necesidad de combinar las relaciones de incompatibilidad entre variedades con las épocas de floración en cada zona para la selección de variedades polinizadoras (Capítulo 2). Se han establecido las necesidades agroclimáticas de 95 accesiones a través de ensayos experimentales en diferentes zonas de Aragón y Extremadura. Se encontró gran variabilidad en las necesidades de frío y calor, pero todas las accesiones completaron sus necesidades en todas las localizaciones y años, mostrando la buena adaptación del cultivo en las zonas de estudio (Capítulo 3). Con la metodología de los capítulos anteriores se ha estudiado un grupo de híbridos interespecíficos de ciruelo \times albaricoquero, determinando la autocompatibilidad (3 accesiones), autoincompatibilidad (31 accesiones), el genotipo *S* (59 selecciones) y las necesidades agroclimáticas (23 accesiones). La mayoría de los alelos identificados en los híbridos se correspondieron con alelos descritos en ciruelo japonés, con excepción de dos nuevos alelos (*S ϵ* y *S θ*) (Capítulo 4). Para determinar las relaciones genéticas entre 161 accesiones de ciruelo de tipo japonés, se caracterizaron molecularmente mediante ocho marcadores microsátélites. Las accesiones se agruparon en función de su origen genealógico, que se correspondió con la estructura poblacional de siete grupos moderadamente diferenciados (Capítulo 5). Con la misma metodología se establecieron las relaciones genéticas entre 115 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo \times albaricoquero y 27 genotipos de referencia de ciruelos y albaricoqueros. Se encontró una mayor proximidad genética entre los híbridos interespecíficos y los genotipos de ciruelo que con los de albaricoquero. La estructura poblacional también se correspondió con el origen genealógico de las accesiones (Capítulo 6). El cultivo de ciruelo de tipo japonés y de híbridos específicos ciruelo \times albaricoquero presenta gran potencial por el interés de consumidores y productores. Aunque el manejo de su cultivo es más complicado que en otros frutales de hueso, la información disponible permite dar respuesta a la necesidad de polinización cruzada y a la adaptación a condiciones de poco frío invernal, dos de los principales condicionantes del cultivo.

SUMMARY

An important renewal of plant material of Japanese plum-type cultivars (hybrids of *Prunus salicina* Lindl.) is taking place in the last years, with the introduction of a number of new cultivars. However, the pollination and agroclimatic requirements of many of these new cultivars are unknown. In this work, a methodology for the determination of pollination requirements is described. Self-(in)compatibility was determined by hand-pollinations in laboratory, followed by monitoring of pollen tube growth under the fluorescence microscopy. Selection of pollinizer cultivars was assessed by combining the identification of *S*-genotypes by PCR analysis with the monitoring of flowering time in the field (Chapter 1). This approach allowed determining the pollination requirements of a set of Japanese plum-type accessions, 12 of these were self-compatible, 91 self-incompatible and 5 male-sterile. The self-incompatible accessions were assigned to their corresponding incompatibility groups. Three new groups [XXVII (*ScSo*), XXVIII (*ScSk*) and XXIX (*ShSo*)] and four new alleles (*S α* , *S β* , *S γ* , *S δ*) were identified. High variability in the flowering time was observed between locations and years, highlighting the need to combine the incompatibility relationships between cultivars with the flowering times in each area for correct selection of pollinizer cultivars (Chapter 2). The agroclimatic requirements of 95 accessions were experimentally determined in different areas from Aragon and Extremadura. High variability of chilling and heat requirements between years was observed in all locations. However, the agroclimatic requirements of all cultivars were fulfilled all years, showing the good adaptation of the crop in the areas (Chapter 3). A set of interspecific hybrids of plum \times apricot was analyzed according to the methodology described in the previous chapters, determining the self-compatibility (3 accessions), self-incompatibility (31 accessions), the *S* genotype (59 selections) and the agroclimatic requirements (23 accessions). Most of the *S* alleles identified in the interspecific hybrids corresponded to *S* alleles described in Japanese plum, except for two new alleles (*S ϵ* and *S θ*) (Chapter 4). To determine the genetic diversity of 161 Japanese plum-type accessions, their molecular characterization was assessed using a set of eight microsatellite markers. The accessions were clustered according to their genealogical origin, which corresponded to the population structure organized into seven groups (Chapter 5). Following the same methodology, the genetic relationships between 115 accessions of interspecific hybrids (plum \times apricot) and 27 reference genotypes of plum and apricot were established. The interspecific hybrids showed higher proximity to the plum genotypes than to apricot genotypes. The population structure also corresponded with the genealogical origin of the accessions (Chapter 6). Japanese plum-type and interspecific hybrids (plum \times apricot) present high potential due to the interest of consumers and producers. Although the management of these crops is more complicated than in other stone fruit trees, the available information allows facing the need of cross-pollination and the adaptation to low winter chilling conditions, two of the main limiting factors of the crop.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El ciruelo de tipo japonés ¹

Origen del cultivo

El ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) es un frutal de hueso perteneciente al género *Prunus*, que incluye cerca de 400 especies y forma parte de la familia Rosaceae (Faust & Surányi, 2011). La mayoría de las variedades de ciruelo cultivadas por su fruto pertenecen al ciruelo japonés (híbridos de *P. salicina*, $2n = 2x = 16$), que incluye variedades precoces adaptadas a zonas templadas, y al ciruelo europeo (*Prunus domestica* L., $2n = 6x = 48$), más extendido en zonas más frías (Okie & Hancock, 2008; Guerra & Rodrigo, 2015).

El cultivo de ciruelo japonés se originó en las orillas del río Yangtze alrededor del año 300 a.C. (Yoshida, 1987). El cultivo se llevó de China a Japón hace más de 2.000 años. A finales del siglo XIX, se introdujo en California (Estados Unidos) desde Japón, por lo que se denominó “ciruelo japonés” (Faust & Surányi, 2011; Topp et al., 2012). La mejora genética del cultivo la inició Luther Burbank (1849-1926). Por su interés en las ciruelas de pulpa roja japonesas, introdujo árboles de *P. salicina* y *Prunus simonii* Carr. desde Japón en California en 1885, donde los hibridó con otras especies americanas de ciruelos diploides, con el objetivo de introducir nuevas características a la especie y mejorar su adaptación a las condiciones locales (Howard, 1945). Dentro de las 113 obtenciones de híbridos de ciruelo de Burbank (Howard, 1945), *P. salicina* contribuyó a la mejora del tamaño, sabor y color; *P. simonii* aportó firmeza y acidez, y las especies

¹ Parte de la información incluida en este apartado se encuentra publicada en:

Guerrero, B., Rodrigo, J., Guerra, M.E. (2018). Situación y perspectivas del cultivo del ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.). La marca de calidad CiEx® en Extremadura. *Revista de Fruticultura*, 65:82-91. (Anexo I).

Introducción general

americanas *Prunus americana* Marsh. y *Prunus besseyi* Bailey contribuyeron a la resistencia a estreses bióticos y abióticos. La utilización de tantas especies permitió ampliar la diversidad de colores de piel y pulpa de los frutos, así como ampliar los periodos de floración y recolección (Karp, 2015). De estas hibridaciones se obtuvieron variedades muy cultivadas en California en la primera mitad del siglo XX, incluyendo algunas que se siguen cultivando en la actualidad como Beauty, Burbank, Duarte, Eldorado, Formosa, Santa Rosa y Wickson (Faust & Surányi, 2011; Topp et al., 2012; Milošević & Milošević, 2018). En el sureste de Estados Unidos, se realizaron hibridaciones entre algunas de estas variedades y otras especies diploides de ciruelo, como *Prunus angustifolia* Marsh., seleccionando variedades como Bruce y Six Weeks. En otros países se utilizó como parental *Prunus cerasifera* Ehrh., con el objetivo de obtener variedades precoces y resistentes al frío, como Methley en Sudáfrica o Wilson en Australia (Okie & Ramming, 1999). La gran mayoría de las variedades cultivadas en la actualidad provienen de las hibridaciones interespecíficas, haciendo más adecuado denominar este cultivo como “ciruelo de tipo japonés”, ya que las variedades no pertenecen a una sola especie como en otros frutales del género *Prunus* sino que son híbridos que pueden incluir en su genealogía hasta 15 especies de ciruelos (Okie & Weinberger, 1996; Okie, 2006).

Situación actual del cultivo

El ciruelo es el frutal de hueso más cultivado a nivel mundial, con una producción de unas 12.000.000 t, por delante del grupo melocotonero–nectarino, albaricoquero y cerezo. Los principales países productores son China, con un 55,4% de la producción mundial, seguida de Rumanía (4,3%), Serbia (3,8%), Estados Unidos (3,3%), Turquía (2,5%), Chile (2,4%), Irán, India (ambos con 2,2%), España, Francia e Italia (1,8%, cada

uno) (FAOSTAT, 2021). A nivel mundial, las estadísticas oficiales no diferencian entre ciruelo de tipo europeo y de tipo japonés, por lo que los datos incluyen ambos cultivos.

A nivel nacional, la superficie cultivada del ciruelo se sitúa en torno a 14.400 hectáreas, siendo el 4º frutal de hueso más cultivado en España, con una producción anual de 155.000 toneladas (MAPA, 2021). La superficie de ciruelo tipo japonés representa el 59 % y el ciruelo europeo 24 %, el resto pertenece a ciruelos sin clasificar y patrones (MAPA, 2021). Las principales comunidades autónomas productoras de ciruelo son Extremadura (77.600 t en 6.764 ha), Andalucía (19.600 t en 1.500 ha), Región de Murcia (14.300 t con 700 ha) y Comunidad Valenciana (12.700 t en 1.500 ha), donde se cultivan principalmente variedades de tipo japonés, y Aragón (8.100 t en 1.100 ha), donde también se cultivan ciruelas europeas (MAPA, 2021).

En el ciruelo de tipo japonés se está produciendo una intensa renovación varietal (Guerrero et al., 2018), como muestra el registro de 149 nuevas variedades en el periodo 1995-2020 en la CPVO (Community Plant Variety Office) (CPVO, 2021). Para el cultivo de las nuevas obtenciones, es importante conocer sus necesidades de polinización, para la elección de variedades polinizadoras, y sus necesidades agroclimáticas, para determinar su adaptación a cada zona de cultivo.

Biología reproductiva

Floración y polinización

El desarrollo floral en las especies de *Prunus* se inicia en el verano anterior a la floración. El ciruelo, al igual que otras especies como el cerezo (*Prunus avium* L.) (Guimond et al., 1998) y el guindo (*Prunus cerasus* L.) (Díaz et al., 1981), presenta yemas fructíferas con varias flores, mientras que otras especies presentan una sola flor por yema, como el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) (Julian et al., 2010), almendro (*Prunus dulcis* Mill.) (Lamp et al., 2001) y melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batsch) (Penso et al., 2020). Las flores de *Prunus* están formadas por cuatro verticilos: carpelo, estambres, pétalos y sépalos, que se fusionan formando una copa en la base de la flor (Fadón et al., 2015). Las flores del ciruelo japonés son más pequeñas que en otras especies de *Prunus*, entre 2-3 cm de diámetro, con un pequeño pistilo rodeado de estambres compuestos por filamentos y anteras, que contienen los granos de polen (Guerra & Rodrigo, 2015).

En los frutales de hueso, la polinización la realizan los insectos, que son imprescindibles para asegurar la polinización en la mayoría de variedades (Griggs, 1953). El estigma es de tipo húmedo, y cuando está receptivo produce una secreción estigmática que ayuda a los granos de polen a adherirse a su superficie y a comenzar su germinación (Rodrigo & Herrero, 2002; Lora et al., 2016). Una vez germinados en el estigma, cada grano de polen emite un tubo polínico que puede crecer a lo largo del estilo y alcanzar el ovario. La doble fecundación se produce cuando un tubo polínico atraviesa uno de los dos primordios seminales y llega al saco embrionario (Herrero & Hormaza, 1996).

*Auto- e inter-incompatibilidad floral*¹

El ciruelo japonés, como otros frutales de hueso del género *Prunus*, presenta un sistema de incompatibilidad polen-pistilo de tipo gametofítico (GSI), que previene la autofecundación y promueve la polinización cruzada (de Nettancourt, 2001). En la familia Rosaceae, este sistema está determinado por dos genes localizados en un único locus (*S*). Uno de los genes codifica glicoproteínas con actividad ribonucleasa (*S-RNasas*) en el pistilo y el otro es un gen F-box que se expresa en el polen (*SFB*), jugando los dos un papel decisivo en la fecundación de la flor y el cuajado del fruto (McCubbin & Kao, 2000). En este mecanismo de incompatibilidad, cuando el alelo *S* del grano de polen (haploide), es diferente de los dos alelos *S* del tejido del estilo (diploide), el grano de polen emite un tubo polínico que crece a través del estilo y fecunda el primordio seminal. Por otra parte, cuando el alelo *S* expresado en el polen es igual a alguno de los expresados en el pistilo, las *S-RNasas* que se encargan de degradar el ARN del tubo polínico, deteniendo su crecimiento en el estilo e impidiendo la fecundación (Akagi et al., 2016).

Desde finales del siglo XX, la identificación de las proteínas asociadas a los alelos *S* en el pistilo y en el polen ha permitido la determinación de los genotipos *S* en algunas especies de *Prunus* por métodos enzimáticos (Bošković & Tobutt, 1996) y moleculares (Tao et al., 1997, 1999; Yamane et al., 2001, 2003; Matsumoto & Tao, 2016). En los últimos 20 años, el desarrollo de técnicas moleculares basadas en PCR han acelerado los avances en la identificación de los alelos *S* en especies autoincompatibles como albaricoquero, almendro, cerezo, ciruelo europeo y ciruelo japonés (Herrera et al., 2021b). Hasta el momento, en ciruelo japonés se han identificado 42 alelos *S-RNasa*

¹Parte de la información incluida en este apartado se encuentra publicada en:

Guerrero, B.I., Guerra, M.E., Rodrigo, J. (2018). El ciruelo japonés, estructura varietal, y necesidades de polinización. *Vida Rural*, 50-54. (Anexo II).

(Yamane et al., 1999; Beppu et al., 2002, 2003; Zhang et al., 2007, 2008; Guerra et al., 2009; Beppu et al., 2012b; Guerra & Rodrigo, 2015) y 15 alelos *SFB* (Zhang et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Guerra et al., 2012), lo que ha permitido la determinación del genotipo *S* de 249 variedades, que se han clasificado en 26 grupos de incompatibilidad (Guerra & Rodrigo, 2015). Las variedades autoincompatibles pertenecientes al mismo grupo son incompatibles entre sí, pero son compatibles con cualquier variedad de otro grupo diferente, siempre que coincidan en floración (Herrera et al., 2021b).

Aunque la mayoría de las variedades de ciruelo japonés son autoincompatibles, existe un reducido número de autocompatibles (Ramming & Cociu, 1991; Beppu et al., 2005, 2010; Guerra et al., 2009, 2020; Abdallah et al., 2019). Las primeras variedades determinadas como autocompatibles fueron Santa Rosa, Late Santa Rosa y Beauty, que comparten el mismo genotipo *S* (*ScSe*). Inicialmente se concluyó que el alelo *Se* era el responsable de conferir autocompatibilidad en ciruelo japonés (Beppu et al., 2003). Sin embargo, en trabajos posteriores se han encontrado variedades autocompatibles sin el alelo *Se*, como Nubiana (*SbSh*) y Zanzi Sun (*SbSc*) (Guerra et al., 2009), y variedades autoincompatibles con el alelo *Se*, como African Delight, African Pride y Ruby Star (Guerra et al., 2020), por lo que con la información disponible en la actualidad no existe ningún alelo *S* asociado a la autocompatibilidad en el ciruelo de tipo japonés.

La determinación del carácter de auto(in)compatibilidad a través de la observación de tubos polínicos de flores autopolinizadas y el uso de marcadores moleculares en la determinación de las relaciones de inter-compatibilidad permite establecer las necesidades de polinización de cada variedad, que es una información muy valiosa para la elección de variedades polinizadoras en el establecimiento de nuevas plantaciones así como para solucionar problemas de producción causados por falta de polinización en plantaciones ya establecidas.

El reposo invernal¹

Importancia del reposo en la floración

El ciruelo de tipo japonés, como otras especies leñosas de clima templado, entra en un periodo de reposo a finales del otoño para sobrevivir a las bajas temperaturas del invierno (Lang et al., 1985). Se ha definido el reposo como “la ausencia de signos de crecimiento visible en cualquier estructura de la planta que contenga un meristemo” y se han diferenciado tres fases: (1) endodormancia, regulada por factores fisiológicos internos de la estructura afectada, (2) paradormancia, regulada por factores fisiológicos externos a la estructura, y (3) ecodormancia, regulada por factores ambientales (Lang et al., 1987). La exposición al frío es necesaria para superar el estado de endodormancia, y posteriormente los árboles necesitan acumular temperaturas cálidas durante la ecodormancia (Lang et al., 1987), para que se produzca el desborre y la floración (Brown & Kotob, 1956). Estas necesidades agroclimáticas están determinadas genéticamente (Vimont et al., 2019) y varían entre especies y variedades (Perry, 1971).

El reposo ha adquirido una gran importancia en la fruticultura dentro del contexto del cambio climático, ya que los cambios de temperaturas pueden poner en riesgo la adaptación de los frutales en zonas cálidas o en años de inviernos menos fríos (Campoy et al., 2011). La caracterización de las necesidades agroclimáticas de variedades es cada vez más importante para el diseño y manejo de plantaciones, ya que condicionan la adaptación a la zona de cultivo y la época de floración (Alonso et al., 2005; Ruiz et al., 2007, 2018; Viti et al., 2010; Campoy et al., 2012; Fadón et al., 2021b, 2021c; Luedeling

¹ Parte de la información incluida en este apartado se encuentra publicada en:

Fadón, E., Herrera, S., **Guerrero, B.I.**, Guerra, M.E., Rodrigo, J. (2020). Chilling and Heat Requirements of Temperate Stone Fruits Trees (*Prunus* sp.). *Agronomy*, 10,409. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030409>. (Anexo III).

et al., 2021). El solapamiento de las épocas de floración de las variedades intercompatibles es necesario para realizar la polinización cruzada en variedades autoincompatibles (Guerra et al., 2020).

Determinación del fin de la endodormancia

Para la determinación de las necesidades de frío y calor es necesario establecer cuándo se produce de la transición de la endodormancia a la ecodormancia, que se puede realizar mediante métodos empíricos (Brown & Kotob, 1956) o estadísticos (Alonso et al., 2005; Luedeling et al., 2013b).

La determinación experimental se realiza mediante la introducción de varetas muestreadas secuencialmente durante el invierno en cámaras de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, temperatura y fotoperiodo, en donde permanecen durante un tiempo determinado con temperaturas cálidas para evaluar su crecimiento. Esta técnica se ha utilizado para determinar las necesidades agroclimáticas de diferentes especies de *Prunus* desde hace más de 50 años (Brown & Kotob, 1956) hasta los trabajos más recientes (Ruiz et al., 2007, 2018; Viti et al., 2010; Gao et al., 2012; Zhuang et al., 2016; Fadón et al., 2019b; Quesada-Traver et al., 2020). Por otro lado, los métodos estadísticos estiman la fecha de salida de la endodormancia mediante la correlación entre largas series anuales de observaciones fenológicas y los correspondientes registros de temperatura (Tabuenca et al., 1972; Alonso et al., 2005; Luedeling et al., 2013b, 2013a; Benmoussa et al., 2017b; Fadón et al., 2021b).

La cuantificación de frío y calor

Una vez establecida la fecha de salida de endodormancia, es necesario cuantificar el frío acumulado hasta entonces para estimar las necesidades de frío, y el calor acumulado desde entonces hasta la floración –durante la ecodormancia- para estimar las

necesidades de calor. Para determinar qué temperaturas son efectivas en cada fase, se han propuesto diferentes modelos para cuantificar el frío durante la endodormancia y el calor durante la ecodormancia (Fadón & Rodrigo, 2018). Los tres más utilizados se desarrollaron en melocotonero y miden la acumulación de frío en diferentes unidades según cada aproximación. El modelo de Weinberger establece que una hora frío (HF) corresponde a una hora entre 0 y 7,2 °C (Weinberger, 1950). El modelo Utah establece que una unidad de frío (UF) corresponde a una hora entre 2,5 y 9,1 °C, 0,5 UF corresponden a una hora en dos rangos: de 1,5 a 2,4 °C y de 9,2 a 12,4 °C, mientras que la acumulación de UF es nula a temperaturas menores que 1,4 °C y entre 12,5-15,9 °C, y negativa para temperaturas iguales o mayores a 16 °C (Richardson et al., 1974). El modelo dinámico propone que la acumulación de frío ocurre en un proceso de dos fases, en el que temperaturas cálidas pueden anular el efecto de temperaturas frías previas, y se expresa en porciones frío (PF) (Fishman et al., 1987). Por otro lado, para la cuantificación de las temperaturas cálidas el modelo más usado son las *Growing Degree Hours* (GDH). Una GDH se define como 1 hora a 1 °C por encima de la temperatura base de 4,5 °C, por lo que se calculan restando 4,5 °C a cada temperatura horaria entre 4,5 °C y 25°C. Todas las temperaturas superiores a 25°C se consideran de efecto igual a 25 °C (Richardson et al., 1974). El modelo de horas frío es el más utilizado por los agricultores debido a que es fácil de aplicar, pero tiene muchas limitaciones y no se ajusta bien en zonas templadas o cálidas (Ruiz et al., 2007, 2018; Campoy et al., 2010, 2012; Viti et al., 2010), siendo más apropiado su uso en zonas más frías (Luedeling et al., 2013b). El modelo dinámico se ha propuesto como el de mejor ajuste en zonas templadas, aunque presenta algunas limitaciones en zonas más frías (Luedeling & Brown, 2011).

Las necesidades agroclimáticas, de frío durante la endodormancia y de calor durante la ecodormancia, condicionan la distribución y capacidad de adaptación de las

diferentes especies y variedades a cada región (Fadón et al., 2020). Los agricultores conocen su importancia y a menudo consultan el frío acumulado en su zona, aunque desconozcan las necesidades de sus variedades. La situación se agrava con el cambio climático, ya que buenos comportamientos pueden variar con la reducción del frío invernal en algunos años (Luedeling et al., 2011). En ciruelo japonés se conocen las necesidades agroclimáticas de muy pocas variedades (Tabuenca, 1967; Ruiz et al., 2018).

La complejidad genética del cultivo

Variabilidad fenotípica

El ciruelo de tipo japonés proviene de las distintas hibridaciones con otras especies de ciruelos diploides que se han realizado a lo largo de más de 100 años de mejora genética (Okie & Ramming, 1999; Okie, 2006). Esto ha provocado que haya mucha variabilidad en las características fenotípicas (Hedrick, 1911; Karp, 2015; Okie, 2019b, 2019a) y que el comportamiento agronómico sea muy diferente entre variedades (Guerra et al., 2010, 2011; Ruiz et al., 2010, 2018; Milošević et al., 2013; Ruml et al., 2021).

Las ciruelas de tipo japonés presentan unas características propias de tamaño, apariencia y sabor que las diferencian de otras frutas de hueso. En general, son frutos redondeados, grandes y firmes, con el hueso pequeño en relación al tamaño del fruto, y buena aptitud para la conservación postcosecha y el transporte (Okie & Weinberger, 1996). Presentan gran diversidad en el color de la piel y la pulpa (Okie & Ramming, 1999), aunque tradicionalmente se han valorado más las ciruelas de piel negra o muy oscura y pulpa amarilla (Okie & Hancock, 2008). La piel oscura facilita que no se aprecien magulladuras ni imperfecciones y hace que las ciruelas sean muy atractivas. Sin embargo, el exceso de producción en algunas campañas de las variedades de piel negra

ha provocado un aumento del interés en otros colores de piel, como el amarillo o verde-amarillo, así como en piel negra y pulpa roja (Guerrero et al., 2018b).

La apariencia y sabor de los frutos condicionan la elección varietal, aunque cada vez hay más interés por los aspectos nutricionales (Fiol et al., 2021). En los últimos años, con la introducción de un gran número de nuevas variedades se ha ampliado el periodo de recolección, que comienza en mayo, con las variedades más tempranas, y termina en septiembre, con las variedades de maduración tardía (Guerra & Rodrigo, 2017).

La caracterización molecular

Los marcadores moleculares más utilizados para la caracterización varietal son RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPDs (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), SSRs (*Simple Sequence Repets*) y SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (Pereira-Lorenzo et al. 2009). En los últimos 20 años, los SSRs han sido los más utilizados debido a que son muy informativos, codominantes, reproducibles y transferibles entre especies relacionadas (Mason, 2015; Lucia et al., 2016).

Los SSRs o microsatélites se han utilizado para el análisis de la diversidad genética y el establecimiento de relaciones genéticas en albaricoquero (Hormaza, 2002; Bourguiba et al., 2020; Herrera et al., 2021a), almendro (Aranzana et al., 2003; Sánchez-Pérez et al., 2006; Mnejja et al., 2010; Halász et al., 2019), cerezo (Wünsch & Hormaza, 2002; Wünsch, 2009; Öz et al., 2013), ciruelo europeo (Gharbi et al., 2014; Urrestarazu et al., 2018) y melocotonero (Wünsch, 2009; Mnejja et al., 2010; Sitther et al., 2012; Pérez et al., 2020).

Existen pocos trabajos de caracterización molecular en ciruelo japonés. El primer estudio se realizó usando isoenzimas (Byrne & Littleton, 1988), y los posteriores con

RAPDs (Boonprakob et al., 2001; Qiao et al., 2007) y SSRs (Ahmad et al., 2004; Mnejja et al., 2004; Carrasco et al., 2012; Öz et al., 2013; Ferrero Klabunde et al., 2014; Abdallah et al., 2019) para determinar la relación genética entre diferentes variedades de ciruelo de tipo japonés con otros ciruelos diploides y hexaploides.

La estructura poblacional

La mayoría de los modelos y parámetros que se emplean habitualmente en la descripción de la diversidad genética de colecciones de germoplasma proceden de la genética de poblaciones y de estudios evolutivos y filogenéticos (González, 2003). La genética poblacional es el estudio de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, así como de los factores evolutivos que explican esta variación (Johnston et al., 2019).

Con los marcadores genéticos adecuados, esta caracterización se hace en función de la variabilidad alélica. Existen varios parámetros que han sido propuestos para cuantificar y comprender esta variabilidad: (1) la riqueza alélica (A_R), que expresa el número medio de alelos por locus (N_A) y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los loci de una población; (2) la frecuencia alélica, que establece la proporción de un alelo específico de un determinado locus en un grupo de genotipos o población, información que es útil para determinar la presencia de alelos privados (P_A) (Kalinowski, 2004); (3) el polimorfismo, que expresa la ocurrencia en la misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con frecuencia apreciable (Hughes et al., 2008; Greenbaum et al., 2014); y, por último, (4) la heterocigosidad observada (H_o), que se corresponde con el número de heterocigotos en un locus entre el número total de individuos muestreados, y la heterocigosidad esperada (H_e), que representa la probabilidad de que dos alelos elegidos al azar en un individuo para un determinado locus sean diferentes entre sí (Hughes et al., 2008).

Las heterocigosidades son altamente sensibles a las frecuencias alélicas de una población, lo que puede afectar negativamente al análisis de la población (Greenbaum et al. 2014). Con el fin de minimizar este impacto, se crearon los índices *Estadísticos F de Wright*, que estiman las diferencias entre la H_e y H_o bajo el principio de equilibrio de Hardy-Weinberg (Wright, 1951). El F_{IS} (coeficiente de endogamia) estima la reducción en la heterocigosidad de un individuo debido al cruzamiento no aleatorio dentro de su subpoblación, y el F_{ST} (coeficiente de diferenciación genética) mide el grado de diferenciación genética entre poblaciones (Wright, 1951). Una vez estimados los parámetros de variabilidad genética, es importante realizar los análisis de agrupamiento, que clasifican los individuos en diferentes categorías o clases en función de la similitud que presenten entre sí, con el objetivo de encontrar grupos homogéneos de genotipos similares, revelar patrones de diversidad e identificar duplicados (Urrestarazu, 2012). Estos análisis pueden basarse en las distancias genéticas, como el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*) (Sneath & Sokal, 1973) y el método *Neighbour Joining* (Saitou & Nei, 1987); en la inferencia bayesiana, como STRUCTURE (Falush et al., 2003); o basarse en análisis multivariados como el Análisis Discriminatorio de Componentes Principales (DAPC) (Jombart et al., 2010).

Los trabajos previos sobre diversidad genética en ciruelo japonés se limitan al establecimiento de las relaciones genéticas entre variedades (Ahmad et al., 2004; Mnejja et al., 2004; Öz et al., 2013; Ferrero Klabunde et al., 2014; Abdallah et al., 2019) y a estudios preliminares de estructura poblacional en un grupo reducido de variedades (Carrasco et al., 2012). Determinar cómo están estructuradas genéticamente las variedades tradicionales y recientes obtenciones de ciruelo de tipo japonés y de híbridos interespecíficos (ciruelo × albaricoquero) sería una herramienta útil para mejoradores y para la conservación de bancos de germoplasma.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es el estudio de las necesidades de polinización, las necesidades agroclimáticas y la diversidad genética de variedades comerciales y selecciones avanzadas de mejora de ciruelo de tipo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.) e híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero. El trabajo se ha estructurado en tres objetivos específicos:

Objetivo 1. Determinación de las necesidades de polinización

Caracterización de la auto(in)compatibilidad de accesiones mediante la observación al microscopio de fluorescencia del crecimiento de tubos polínicos en flores autopolinizadas, determinación de las relaciones de incompatibilidad entre variedades a través de la identificación de los alelos *S* mediante PCR y seguimiento de la fenología durante el periodo de floración (Capítulos 1 y 2).

Objetivo 2. Determinación de las necesidades agroclimáticas

Estimación de las necesidades de frío para la salida de la endodormancia y necesidades de calor durante la ecodormancia en accesiones de ciruelo de tipo japonés (Capítulo 3) y en accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero, en los que también se han determinado sus necesidades de polinización (Capítulo 4).

Objetivo 3. Diversidad genética

Análisis de la diversidad genética y la estructura poblacional mediante SSR en variedades tradicionales, nuevas obtenciones y selecciones avanzadas de ciruelo tipo japonés (Capítulo 5) y de variedades y selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero (Capítulo 6).



Objetivo 1. Necesidades de polinización.

CAPÍTULO 1

ESTABLISHING POLLINATION REQUIREMENTS IN JAPANESE PLUM BY PHENOLOGICAL MONITORING, HAND POLLINATIONS, FLUORESCENCE MICROSCOPY AND MOLECULAR GENOTYPING

Establecimiento de las necesidades de polinización en ciruelo japonés mediante seguimiento fenológico, polinizaciones controladas, microscopía de fluorescencia y genotipado molecular

Publicado en *Journal of Visualizing Experiments (JoVE)*¹

RESUMEN

Las variedades de ciruelo japonés que se cultivan en la actualidad son híbridos derivados de cruzamientos entre *Prunus salicina* Lindl. y otras especies de *Prunus*. Estos híbridos presentan autoincompatibilidad gametofítica que está controlada por un locus *S* muy polimórfico que contiene múltiples alelos. La mayoría de variedades son autoincompatibles, por lo que necesitan polen de otra variedad intercompatible para fecundar sus flores. La determinación de las necesidades de polinización en ciruelo japonés está ganando importancia debido al alto número de nuevas variedades de las que se desconoce esta información. En este trabajo, se ha puesto a punto la metodología para determinar las necesidades de polinización de variedades de ciruelo de tipo japonés. La auto(in)compatibilidad se determinó mediante polinizaciones controladas en campo y en laboratorio, la observación al microscopio de fluorescencia del crecimiento de los tubos polínicos en las flores polinizadas y el seguimiento del cuajado y la maduración de los frutos en campo. La selección de polinizadores se realizó combinando la identificación de los genotipos *S* mediante PCR con el seguimiento del periodo de floración en campo. El conocimiento de las necesidades de polinización de las variedades es una herramienta útil en la selección de variedades para el diseño de nuevas plantaciones y facilita la detección de problemas de producción relacionados con la deficiencia de polinización en plantaciones establecidas.

¹Este capítulo está publicado en:

Guerrero, B.I., Guerra, M.E., Rodrigo, J. (2020). Establishing Pollination Requirements in Japanese Plum by Phenological Monitoring, Hand Pollinations, Fluorescence Microscopy and Molecular genotyping. *J. Vis. Exp.* (165), e61897, doi:10.3791/61897.

Establishing Pollination Requirements in Japanese Plum by Phenological Monitoring, Hand Pollinations, Fluorescence Microscopy and Molecular Genotyping

Brenda I. Guerrero^{1,2}, Ma. Engracia Guerra³, Javier Rodrigo^{1,2}

¹Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) ²(CITA-Universidad de Zaragoza), Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 ³Departamento de Hortofruticultura, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX), Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden

Corresponding Author

Brenda I. Guerrero
773401@unizar.es

Citation

Guerrero, B.I., Guerra, M.E., Rodrigo, J. Establishing Pollination Requirements in Japanese Plum by Phenological Monitoring, Hand Pollinations, Fluorescence Microscopy and Molecular Genotyping. *J. Vis. Exp.* (165), e61897, doi:10.3791/61897 (2020).

Date Published

November 9, 2020

DOI

10.3791/61897

URL

jove.com/video/61897

Abstract

The Japanese plum cultivars commonly grown are interspecific hybrids derived from crosses between the original *Prunus salicina* with other *Prunus* species. Most hybrids exhibit gametophytic self-incompatibility, which is controlled by a single and highly polymorphic S-locus that contains multiple alleles. Most cultivated hybrids are self-incompatible and need pollen from a compatible donor to fertilize their flowers. Establishing pollination requirements in Japanese plum is becoming increasingly important due to the high number of new cultivars with unknown pollination requirements. In this work, a methodology for the determination of pollination requirements in Japanese plum-type hybrids is described. Self-(in)compatibility is determined by hand-pollinations in both the field and in the laboratory, followed by monitoring pollen tube elongation with fluorescence microscopy, and also monitoring fruit maturation in the field. Selection of pollinizer cultivars is assessed by combining the identification of S-genotypes by PCR analysis with the monitoring of flowering time in the field. Knowing the pollination requirements of cultivars facilitates the selection of cultivars for the design of new orchards and allows the early detection of productivity problems related with pollination deficiency in established orchards.

Introduction

Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) is native to China¹. In the 19th century, this crop was introduced from Japan to the United States, where it was intercrossed with other North American diploid plums². In the 20th century, some of these hybrids were spread to temperate regions around the

world. Nowadays, the term “Japanese plum” refers to a wide range of interspecific hybrids derived from crosses between

the original *P. salicina* with up to 15 other diploid *Prunus* spp.^{3,4,5}.

Japanese plum, like other species of the *Rosaceae* family, exhibits Gametophytic Self-Incompatibility (GSI), which is controlled by a single and highly polymorphic *S*-locus containing multiple alleles⁶. The *S*-locus contains two genes that encode a ribonuclease (*S-RNase*) expressed in the pistil, and an F-box protein (SFB) expressed in the pollen grain⁷. In the self-incompatibility reaction, when the *S*-allele expressed in the pollen grain (haploid) is the same as one of the two expressed in the pistil (diploid), the growth of the pollen tube across the style is arrested due to the degradation of the pollen tube RNA by the action of the *S-RNase*⁸. Since this process prevents fertilization of the female gametophyte in the ovule, GSI promotes the outcrossing between cultivars.

Although some Japanese plum cultivars are self-compatible, most cultivars currently grown are self-incompatible, and need pollen from inter-compatible donors to fertilize their flowers³. In stone fruit species of genus *Prunus* such as almond⁹, apricot^{10,11,12} and sweet cherry¹³, pollination requirements of cultivars can be established by different approaches. Self-(in)compatibility can be determined by self-pollination of flowers in the field and subsequent monitoring of fruit set, or by semi-in vivo self-pollinations at controlled conditions in a laboratory and the observation of pollen tubes under the microscope^{14,15,16,17,18}. Incompatibility relationships among cultivars can be determined by cross pollinations in the field or the laboratory using pollen of the potential pollinizer cultivar, and by the identification of *S*-alleles of each cultivar by PCR analysis^{14,15,16,19,20,21,22}. In species such as sweet cherry or almond, self-(in)compatibility can be also assessed by the identification of

particular *S* alleles associated to self-compatibility, as *S*₄' in sweet cherry¹³ or *S*_f in almond²³.

Several plum breeding programs from the main producing countries are releasing a number of new cultivars^{2,14}, many of them with unknown pollination requirements. In this work, a methodology for the determination of pollination requirements in Japanese plum-type hybrids is described. Self-(in)compatibility is determined by self-pollinations in both the field and the laboratory, followed by observations of pollen tubes under the fluorescence microscopy. Selection of pollinizer cultivars combines the identification of *S*-genotypes by PCR analysis with the monitoring of flowering time in the field.

Protocol

1. Hand-pollination in the field

1. Pollen extraction

1. To obtain pollen, collect flower buds at stage D²⁴, according to stage 57 on the BBCH scale^{25,26}.
NOTE: More flower buds are necessary in Japanese plum than in other *Prunus* species because their anthers produce less pollen.
2. Remove the anthers using a plastic mesh (2 mm x 2 mm pore size) and place them on paper at room temperature for 24 h until anther dehiscence.
3. Sieve the pollen grains through a fine mesh (0.26 mm x 0.26 mm pore size), and conserve them in a 10 mL glass tube with a cap at 4 °C until use.

2. Pollination of emasculated flowers

1. When between 10%–20% of flowers are open, select and label several branches. Remove open flowers

and young buds, leaving only flower buds at stage D²⁴, according to stage 57 on the BBCH scale^{25,26}.

2. Remove the petals, sepals, and stamens of between 800 and 1,000 flower buds per treatment with either fingernails or tweezers.
3. Hand pollinate the pistils with the help of a fine paintbrush 24 h after emasculation. Some branches containing half of the pistils with pollen of the same cultivar, and the other half with compatible pollen from other cultivar as a control. Be careful not to contaminate the fingertip or paintbrush with pollen grains from other cultivars.
4. Record weekly counts of flowers and developing fruits to characterize fruit drop pattern and quantify the final fruit set in each pollination treatment.

3. Supplementary pollination in the field

1. A few days before the first flowers open, enclose selected trees in a 0.8 mm mesh cage to avoid the arrival of pollinating insects.
2. When 10%–20% flowers are open, select and label several branches per pollination treatment, leaving 1,000–1,500 flowers per treatment.
3. On the next day, when flowers are open, pollinate each flower with the help of a paintbrush with the corresponding pollen (pollen from the same cultivar for self-pollination, and from other compatible cultivars as cross-pollination control).
4. Pollinate every other day until all flowers open.
5. Record weekly counts of flowers and developing fruits from anthesis to harvest to characterize fruit drop pattern and quantify final fruit set in each pollination treatment.

2. Hand-pollinations in the laboratory

1. Collect 50–100 flowers at stage D²⁴, according to stage 57 on the BBCH scale^{25,26}.
2. In the laboratory, emasculate 30 flowers per treatment (self- and cross-pollination).
NOTE: Emasculation should be proceeded carefully to avoid any damage on the pistils.
3. Make a fresh cut on the base of each flower pedicel underwater before placing it on a piece of wet florist foam (one piece of foam for each pollination treatment).
4. Hand pollinate each pistil 24 h later using a fine paintbrush with pollen collected previously (see section 1.1). Pollinate one set of pistils with pollen from the same cultivar, and the other set with pollen from a compatible cultivar as control.
5. Leave the pollinated pistils 72 h after pollination at room temperature. The floral foam should be continuously wet with water.
6. Fix the pistils in a fixative solution of ethanol/acetic acid (3:1) for at least 24 h at 4 °C. Replace the fixative with 75% ethanol. Samples can be conserved in this solution at 4 °C until use²⁷.

NOTE: Ensure that the samples are completely submerged in the solution.

3. Microscopic observations

1. Evaluation of in vitro pollen germination

1. To elaborate pollen germination medium, dissolve 25 g of sucrose on 250 mL of distilled water, then add 0.075 g of calcium nitrate [Ca(NO₃)₂] and 0.075 g of boric acid (H₃BO₃).

2. Add 2 g of agar to the solution and mix until completely dissolved²⁸.
3. To sterilize the medium, autoclave it at 120 °C for 20 min. Cool the medium and, before it solidifies, distribute 3 mL per sterile Petri dish (55 mm x 12 mm) in a sterile laminar flow hood. After medium solidification, conserve the Petri dishes wrapped in aluminum foil at 4 °C until use.
4. Spread the pollen of each cultivar previously used as pollen donor in the controlled pollinations in two Petri dishes and incubate them at 25 °C for 24 h.
NOTE: The inoculated culture media can be observed with microscopy immediately after or stored at -20 °C until use. For this purpose, the Petri dishes should be changed from the freezer to the fridge 24 h before microscopy observations.
5. To observe the pollen grains, prepare 1% (v/v) aniline blue solution that stains callose. First, prepare a 0.1 N potassium phosphate tribasic (K₃PO₄) solution by dissolving 7.97 g of K₃PO₄ in 1,000 mL of distilled water. To elaborate the 1% (v/v) aniline blue solution, dissolve 1 mL of aniline blue in 100 mL of 0.1 N K₃PO₄.
6. Add 2–3 drops of aniline blue solution to each Petri dish plate and observe after 5 min under a UV epifluorescence microscope using exciter filter BP340-390 and barrier filter LP425. Count viable and non-viable pollen grains in three fields per plate, each field containing 100-200 pollen grains, in two Petri dishes for each cultivar.

2. Pollen tube growth

1. Rinse the fixed pistils with distilled water three times (1 h each, 3 h in total) and transfer to 5% (w/v) sodium sulphite (Na₂SO₃) at 4 °C for 24 h. To prepare this solution, dissolve 5 g of sodium sulphite in 100 mL of distilled water.
2. Autoclave the pistils at 120 °C for 8 min in 5% (w/v) sodium sulphite to soften the tissues.
3. Squash softened pistils in a drop of 1% (v/v) aniline blue solution under a cover glass on a slide to stain callose.
4. Observe pollen tube growth along the style under a microscope with UV epifluorescence using exciter filter BP340-390 and barrier filter LP425.

4. Determining incompatibility relationships

1. DNA extraction from leaves
 1. To extract DNA, collect 3–4 young leaves of each cultivar in the field, preferably in spring.
NOTE: DNA can also be extracted from mature leaves, but DNA from young leaves has less phenolic compounds.
 2. Isolate DNA using a commercial kit and follow the provided protocol kit (see **Table of Materials**).
 3. Quantify the DNA concentration and evaluate the quality of the DNA of each sample at 260 nm in an UV-Vis microvolume spectrophotometer. Adjust the DNA concentration to 10 ng/μL.
2. PCR conditions for fragment amplification
 1. Label 0.2 mL PCR tubes and caps.
 2. Prepare the PCR reagents according to **Table 1** and let them thaw on ice.

3. Set up a volume of master mix of each pair of primers in a 1.5 mL microtube according to the number of reactions plus 10% of excess, considering a volume of 16 μ L per reaction. Add the reagents following the order in **Table 1** and mix thoroughly.
4. Aliquot 16 μ L of master mix into each 0.2 mL PCR tube containing 4 μ L of DNA template or 4 μ L of sterilized distilled water as negative control (C-). Use DNA of cultivars with known genotype as positive controls. Mix gently, close the reaction tubes with the caps, and centrifugate at 2,000 \times *g* for 30 s to collect the entire volume at the bottom of the reaction tube.
5. Place the reaction tubes in the thermocycler and set up the PCR program using the following temperature profile: an initial step of 3 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 3 min at 72 °C, and a final step of 7 min at 72 °C²⁰.

3. Electrophoresis and estimation of fragment size

1. To prepare a 1.7% (w/v) agarose mini gel, dissolve 0.68 g of agarose and 40 mL of 1x TBE buffer into a 100 mL Erlenmeyer flask. Melt the solution by heating in a microwave at 600 W at 30 s intervals to avoid boiling.
2. Let the solution stay on the bench to cool down, and then add 3.5 μ L of nucleic acid staining solution.
3. Place the gel tray into the casting stand and put the selected comb into the gel mold. Be sure to have enough wells for each PCR product and DNA ladder.
4. Pour the agarose solution into the gel mold and let it cool down until polymerization. Remove the comb of the polymerized gel. Place the gel in the horizontal

electrophoresis system containing enough 1x TBE buffer to cover the surface of the gel.

5. Load the first and last wells with 2 μ L of the DNA molecular weight ladder (1 kb DNA Ladder). Load 3 μ L of each product of the PCR in the other wells. Close the chamber, turn on the power, and run the gel at 100 V for 30 min.
6. Observe the gel under UV light using a gel documentation system. Use the DNA molecular weight ladder to determine the size of the amplified fragment and compare it with the positive controls in order to identify the corresponding alleles.

5. Monitoring flower dates

1. Monitor the phenology of different trees of each cultivar at flowering over different years. Establish the length of the flowering period from the first (about 5%) to the last open flowers (about 95%). Full bloom is considered when at least 50% of flowers are at stage F²⁴, according to stage 65 on the BBCH scale^{25,26}.
2. To compare the flowering dates of inter-compatible cultivars and determine those that coincide at flowering time every year, elaborate a calendar of flowering times with data from several years.

Representative Results

Each Japanese plum flower bud contains an inflorescence with 1–3 flowers. As in other stone fruit species, each flower is made up of four whorls: carpel, stamens, petals, and sepals, which are fused forming a cup at the base of the flower. Flower structures are smaller than other stone fruits, with a short and fragile pistil surrounded by the stamens that contain a small amount of pollen grains. At full bloom, the flowers of each

inflorescence appear separated on short stalks, showing the white petals forming a balloon surrounded by the green sepals (stage D, 57 BBCH) (**Figure 1A**) in the days before anthesis. The flower is fully open at anthesis, showing the anthers and the pistil (stage F, 65 BBCH) (**Figure 2A**). Like other temperate *Prunus* spp., the flower buds open first, and the leaf buds sprout several days later. This makes blooming trees look spectacular showing a great number of flowers but no leaves.

Hand-pollinations in Japanese plum required the collection of flowers at the balloon stage previous to anthesis (**Figure 1A**), in which the pistil and stamens are nearly mature, but the anthers are still undehisced. This stage prevents the arrival of insects carrying external pollen because the petals are still closed. Although the number of flowers is much higher than in other *Prunus* species, most of them (85%–95%) are not able to set fruit. As a result, using a high number of flowers for pollination experiments is mandatory. The undehisced anthers could be easily separated from the flower in the laboratory and extended on a piece of paper (**Figure 1B**), where the anthers are dehisced after 24 h at room temperature, showing the pollen grains (**Figure 1C**). Then, the pollen grains were easily sieved through a fine mesh (**Figure 1D**), and could be used immediately or stored until use, both for field (**Figure 2A–D**) and/or laboratory pollinations (**Figure 2E,F**).

The monitoring of fruit drop of hand-pollinated flowers after emasculation (**Figure 2A,B**) or supplementary pollination of non-emasculated flowers (**Figure 2C,D**) showed clear differences between treatments. Most flowers dropped 2–3 weeks after pollination in both treatments. All self-pollinated flowers dropped. However, 4% of self-pollinated flowers from the supplementary pollination treatment remained in

the tree until harvest, indicating that this cultivar (Rubirosa) behaves as self-compatible (**Figure 3**). The behavior of cross-pollinated flowers used as control also varied between treatments. Cross-pollinated flowers with supplementary pollination dropped until 3 weeks after pollination, resulting in 7% of fruit set. However, all emasculated cross-pollinated flowers dropped coinciding with the drop of all self-pollinated flowers.

For hand pollinations in the laboratory, the pistils were placed in wet florist foam after a fresh cut on the base of each flower pedicel underwater (**Figure 2E**) and pollinated 24 h later with the help of a fine brush (**Figure 2F**). In self-pollinated flowers, self-compatible cultivars showed at least one pollen tube reaching the base of the style in most of the pistils examined, while in self-incompatible cultivars, pollen tube growth was arrested in the upper style (**Table 2**).

In vitro pollen germination differed significantly between cultivars (**Table 3**). Good pollen viability was considered when more than 20% of pollen grains showed a pollen tube longer than its length after 24 h in the culture medium (**Figure 4A**). However, when most of pollen grains did not germinate (**Figure 4B**), the cultivar was considered male sterile and not suitable as a pollinator.

Like in other *Prunus*, the pistil is made up of three structures: stigma, style, and ovary. The ovary has two ovules, and at least one of them should be fertilized for fruiting. During pollination, pollen grains are transferred to the stigma, where germination occurred within 24 h (**Figure 4C**). Each germinating pollen grain produced a pollen tube, which grew through the pistil structures. In self-incompatible cultivars in which the pollen grains have an S allele that coincides with one of the two S alleles of the pistil, the pollen tube stopped growing in the upper third of the style (**Figure 4D**), preventing

the arrival to the ovary and the subsequent fertilization. However, when *S* allele of the pollen grain is different with that of the pistil, the pollen tube could grow through the style (**Figure 4E**), reach the ovary (**Figure 4F**) and fertilize an ovule.

PCR analysis (**Table 1**) was carried out using primers from conserved regions of *S-RNase* of sweet cherry and Japanese plum (**Figure 5**). The primer set used, PruC2-PCER and PruT2-PCER (See **Table of Materials**), allowed to determine the size of both *S*-alleles in each cultivar. The amplified fragments were run in agarose gel by electrophoresis, and seven different *S*-alleles (*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Se*, *Sf*, *Sh*, *Sk*) were

identified in the cultivars analyzed. The fragment sizes ranged between 393 and 1,580 bp using PruC2-PCER (**Figure 5**) and between 820 and 1,993 bp using PruT2-PCER. Six *S*-genotypes were identified (*SaSb*, *SbSc*, *SbSf*, *ScSh*, *SeSh*, *SfSk*).

The phenology of each cultivar allowed to calculate the length of the flowering period for a total period of four years, considering full bloom when most flowers were at stage F, stage 65 BBCH. Flowering in orchard conditions (**Figure 6**) allowed the comparison of flowering times between cultivars and years, and the determination of which cultivars are coincident at flowering time in each year (**Figure 7**).

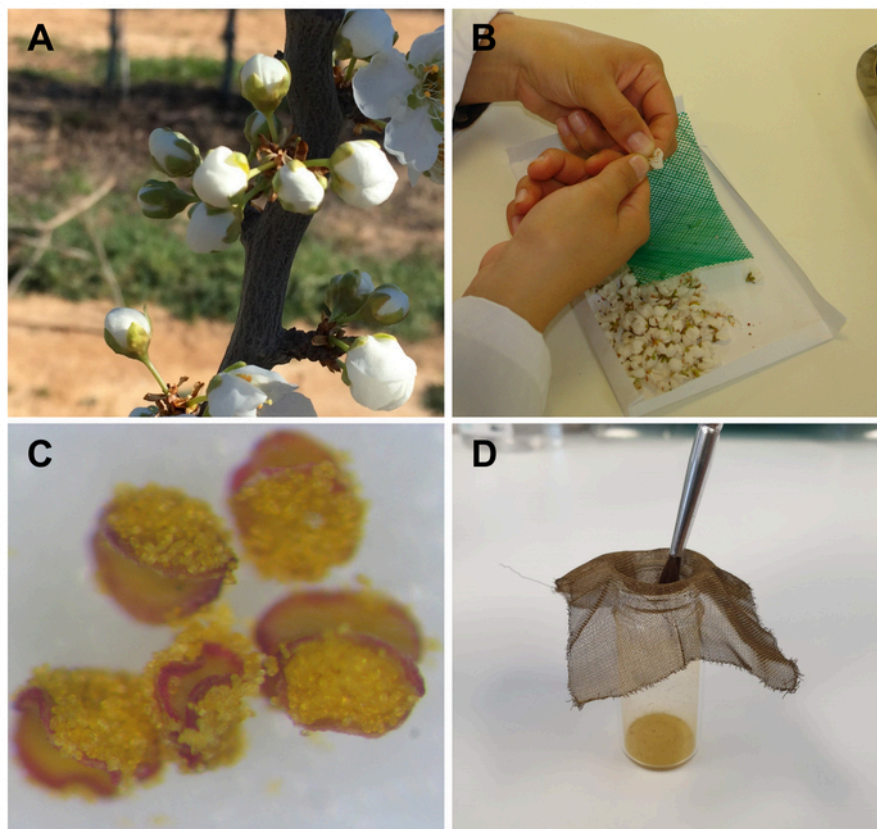


Figure 1: Pollen extraction in Japanese plum. (A) Flower buds at balloon stage D, according to Baggiolini²⁴, stage 57 of the BBCH scale. (B) Removal of undeveloped anthers from the flower. (C) Dehiscent anthers showing the pollen grains. (D) Sieve of pollen grains from anthers using a fine mesh. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

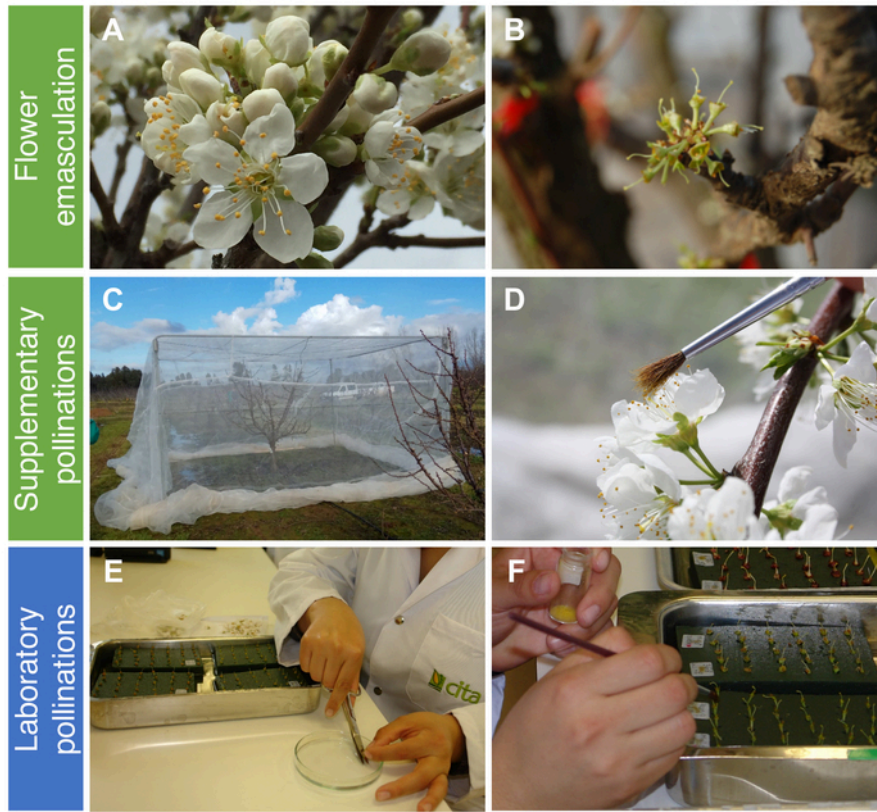


Figure 2: Hand-pollination experiments to determine self-(in)compatibility in Japanese plum. Field pollinations: (A) Flowering in Japanese plum, with flowers at anthesis and at balloon stage. (B) Flowers at balloon stage D, according to Baggiolini²⁴, stage 57 of the BBCH scale after emasculation. (C) Caged tree to avoid the arrival of insects. (D) Supplementary hand-pollination of non-emasculated flowers. Laboratory pollinations: (E) Cut on the base of pedicel underwater and emasculated flowers placed on soaked foam. (F) Hand-pollination of the pistils with a fine paintbrush. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

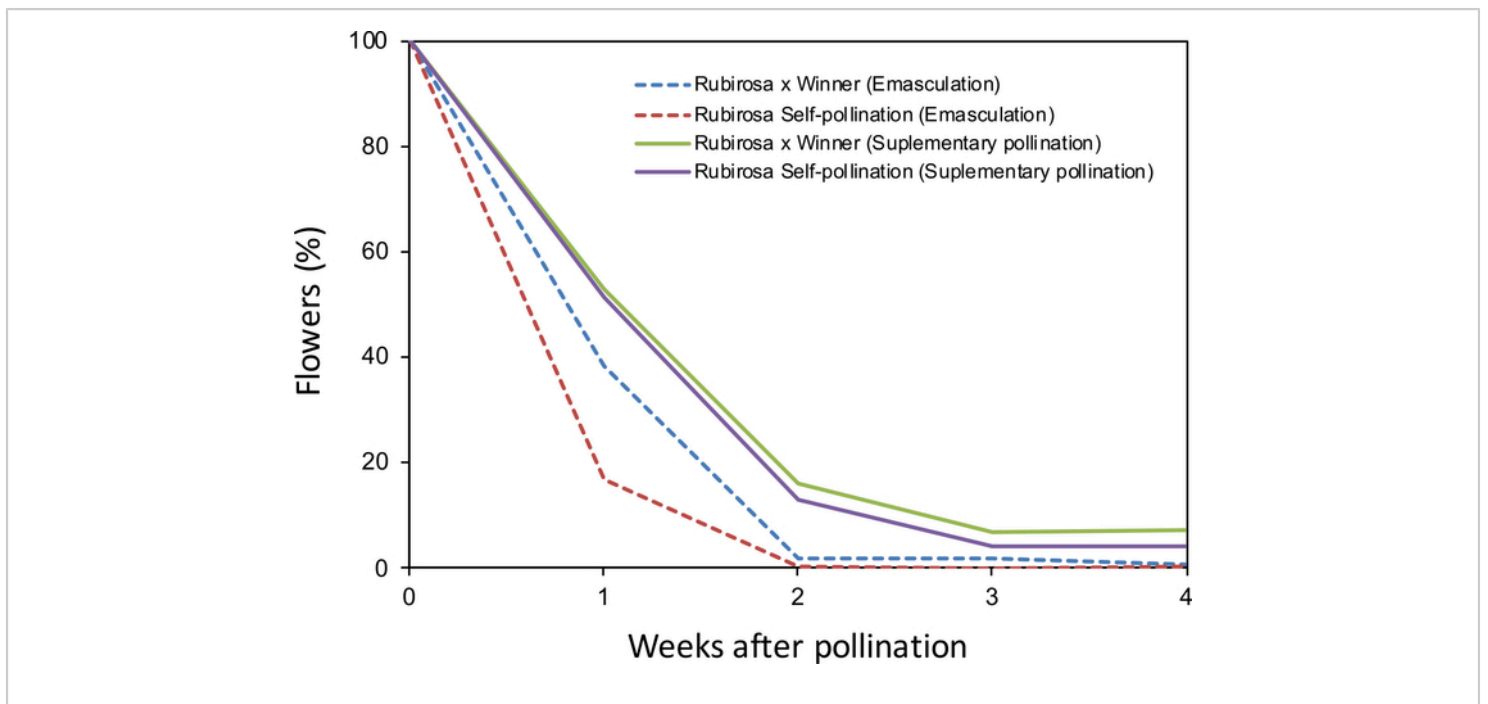


Figure 3: Fruit drop in Japanese plum as affected by different pollination treatments. Self- and cross-pollination in emasculated and non-emasculated flowers. Percentage of flowers and developing fruits from the original number of remaining flowers in the tree during the 4 weeks after pollination in 'Rubirosa'. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

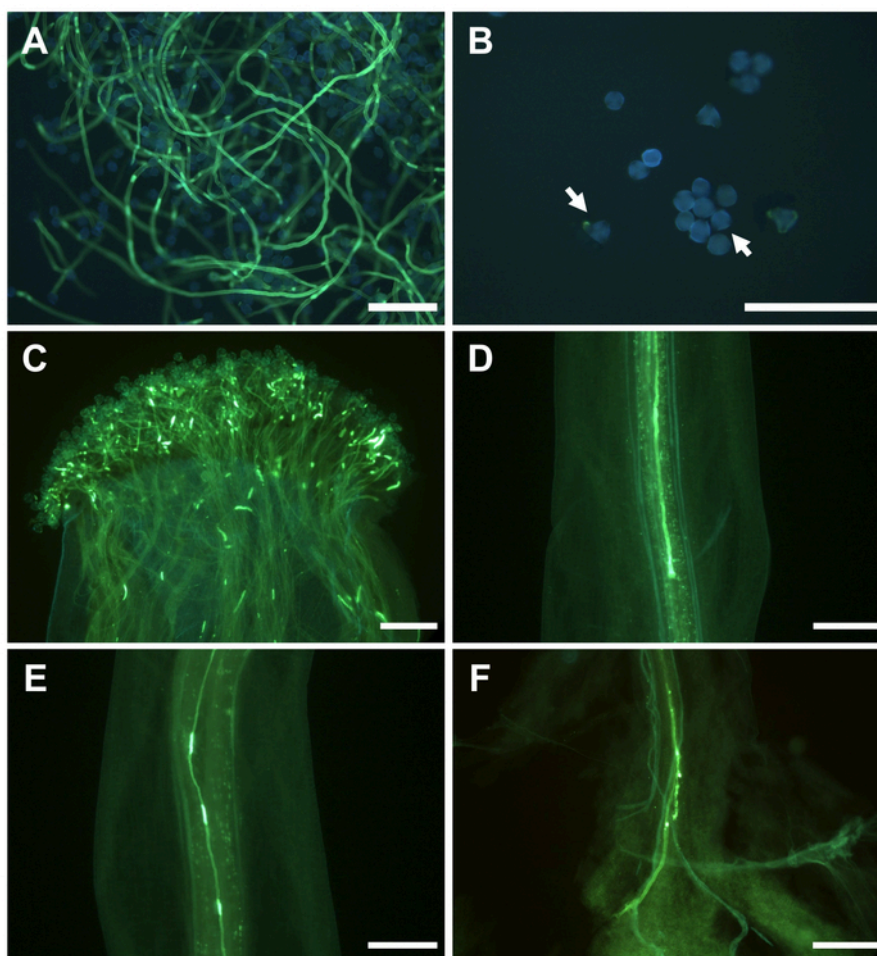


Figure 4: Pollen germination and pollen tube growth in self-pollinated flowers in Japanese plum. (A) In vitro pollen germination. (B) Non-germinated pollen grains (arrows) in vitro. (C) Pollen grain germination on the stigma surface. (D) Pollen tube arrested in the upper third of the style. (E) Pollen tube growing along the style. (F) Pollen tubes at the base of the style. Scale bars, 200 μ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

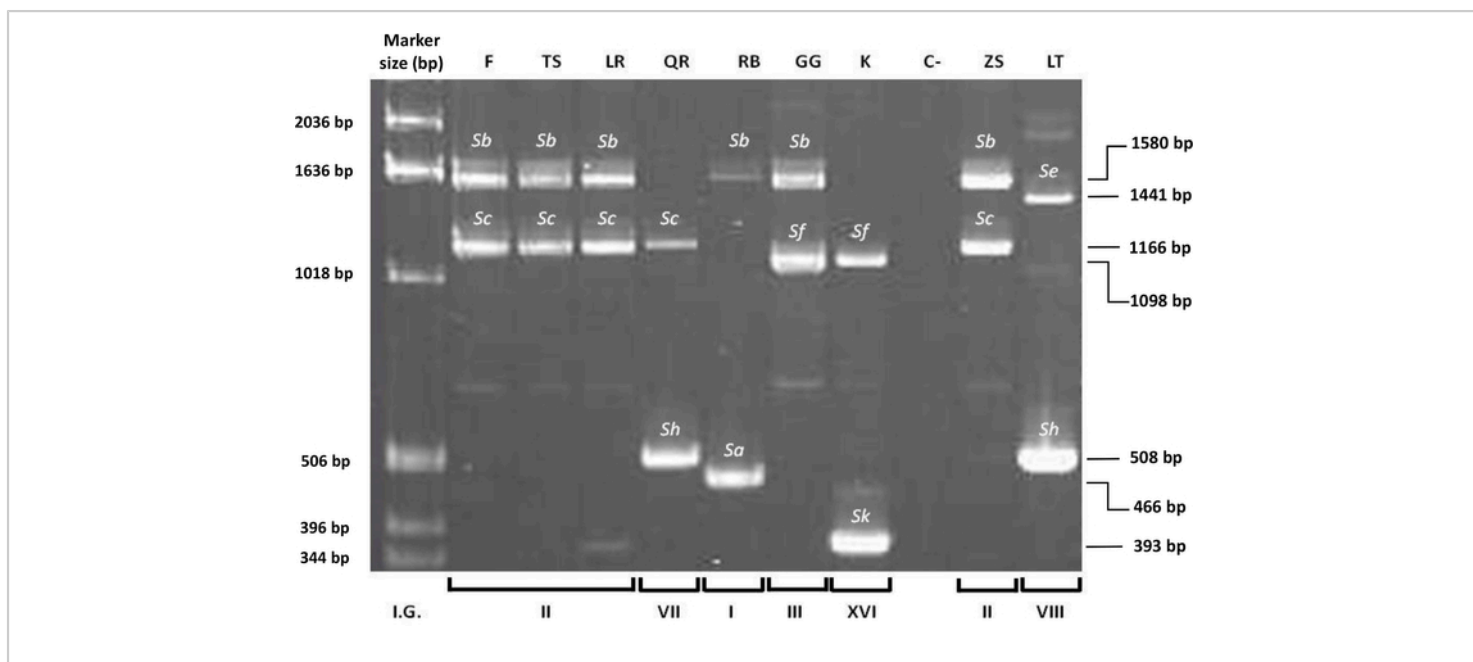


Figure 5: PCR amplification using primer set PruC2-PCER of nine Japanese plum cultivars. Identification of seven *S*-alleles (*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Se*, *Sf*, *Sh*, *Sk*) and six *S*-genotypes (*SaSb*, *SbSc*, *SbSf*, *ScSh*, *SeSh*, *SfSk*). Incompatibility Group (I.G.³), 'Fortune' (F), 'TC Sun' (TS), 'Laroda' (LR), 'Queen Rosa' (QR), 'Red Beaut' (RB), 'Golden Globe' (GG), 'Kelsey' (K), Negative control (distilled water) (C-), 'Zanzi Sun' (ZS), 'Laetitia' (LT). 1 kb: Size standard. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



Figure 6: Monitoring of phenology of Japanese plum. Two Japanese plum cultivars with flowers in different phenological stage. Stage C²⁴, stage 55 of BBCH scale (left) and Stage F²⁴, stage 65 of BBCH scale (right). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

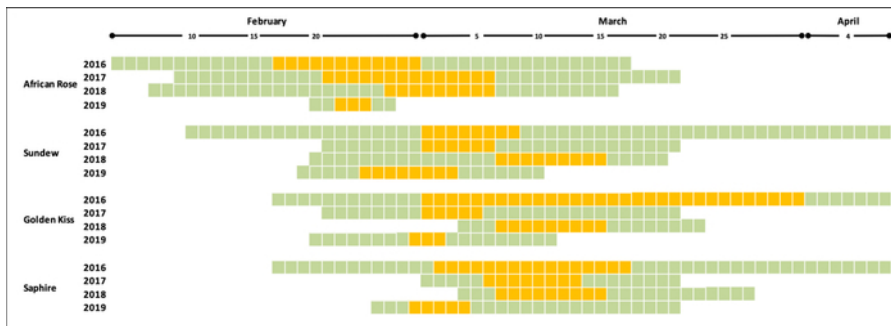


Figure 7: Flowering time in four Japanese plum cultivars over 4 years. Period from the first to the last open flowers. Yellow cells indicate the days of full bloom in which most flowers were open. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Reagents	Volume per one reaction (μL)
H ₂ O	11.50
10X Buffer with 20 mM MgCl ₂	2.80
dNTP mix , 10 mM each	0.80
Primer forward	0.40
PruC2 (5'-CTATGGCCAAGTAATTATTCAAACC-3') ⁴⁰ or	
PruT2 (5'- TSTTSTTGSTTTTGCTTTCTT-3') ⁴⁰	
Primer reverse	0.40
PCER (5'-TGTTTGTTCATTCGCCTTCCC-3') ⁴¹	
DNA template	4.00
Taq DNA polymerase, 500 U	0.09
Final volume	20.0

Table 1: Reaction conditions used in this protocol.

Cultivars (S-genotype)	Number of pistils examined	Germinated pollen grains on stigma (%)	Pistils with pollen tubes at the base of style (%)	Pollen tubes at the base of style (mean number)	Self/cross - compatibility reaction
TC Sun (<i>SbSc</i>) × Larry Ann (<i>SbSh</i>)	22	92.3	27	1.2	+
TC Sun (<i>SbSc</i>) × Blackamber (<i>SbSc</i>)	10	74.8	0	0.0	-
TC Sun (<i>SbSc</i>) self-pollination	44	78.3	7	1.0	+
Golden Plum (<i>SbSc</i>) × Black Star (<i>SeSf</i>)	11	64.7	36	1.5	+
Golden Plum (<i>SbSc</i>) × TC sun (<i>SbSc</i>)	11	98.4	0	0.0	-
Golden Plum (<i>ShSk</i>) self-pollination	38	85.2	0	0.0	-

Table 2: Pollen germination and pollen tube growth through the style for two Japanese plum cultivars after self- and cross-pollinations. Number of hand-pollinated pistils examined, percentage of germinated pollen grains on stigma, percentage of pistils with pollen tubes at the base of the style, mean number of pollen tubes at the base of the style, Self- or cross-incompatible (-) and self- or cross-compatible (+).

Cultivar	Germination (%)	SD*
Earlemoon	50	3.3
Earliqueen	30	4.2
Eldorado	10	1.3
Friar	52	2.0
Golden Japan	17	3.8
Golden Plumza	18	3.3
Laroda	46	3.6
Larry Ann	20	5.8
Methley	2	0.8
Owen T	16	0.3
Primetime	20	3.3
Queen Rosa	42	3.9
Royal Diamond	19	2.2
Santa Rosa	36	2.0
TC Sun	49	3.1
*SD = Standard deviation		

Table 3: Percentage of in vitro pollen germination of 15 Japanese plum cultivars. Mean \pm SD of six replicates.

Discussion

The methodology described herein for pollination requirements of Japanese plum cultivars requires determining the self-(in)compatibility of each cultivar by controlled pollinations in the field or the laboratory, and the subsequent observation of pollen tube growth with fluorescence microscopy. The incompatibility relationships are established by the characterization of the S-alleles by molecular genotyping. Finally, the selection of pollinizers

is performed by the monitoring phenology to detect those cultivars that coincide at flowering every year.

Establishing pollination requirements in new Japanese plum-type cultivars is becoming increasingly important due to the high number of new cultivars with unknown pollination requirements and that most of them are self-incompatible³. The approach described herein, combining phenological monitoring, controlled pollinations, fluorescence microscopy, and molecular genotyping, has proven to be useful in determining the pollination requirements of cultivars¹⁴.

Japanese plum hybrids show a number of peculiarities that hinder the use of a single approach for determining pollination requirements as used in other *Prunus* species. First, the flowers are smaller and more fragile³. Pollen extraction and handling is similar to that of other *Prunus* spp.¹², although it is necessary to collect a higher number of flowers because the anthers have less amount of pollen grains³. In some cultivars such as Rubirosa, the emasculation of the flowers cannot be used because this technique causes ovule degeneration²² and the subsequent drop of the flower²¹, which can result in false diagnosis of self-incompatibility. For breeding purposes, flower emasculation in sensitive cultivars used as female parental can lead to a lack of offsprings³.

The number of flowers is much higher than in other species of fruit trees, but the percentage of fruit set is very low³. This makes it necessary to use a higher number of flowers for both field and laboratory pollinations^{21,22}. Laboratory pollinations and subsequent microscopic observations of pollen tube growth allow the assessment of self-(in)compatibility more accurately than by monitoring hand-pollinated flowers in the field until harvest, since this technique avoids environmental influence and allows the analysis of a higher number of cultivars than in field experiments. However, flower handling is more toilsome than in other *Prunus* species such as apricot¹², since it is necessary to cut the pedicel underwater before placing the pistils in the foam. Furthermore, a higher number of pistils must be analyzed under the microscope than in other species, because in the compatible pollen-pistil relationships between Japanese plum hybrids, the pollen tubes reach the ovary in a reduced percentage of flowers³. In addition, pollen tubes are more difficult to detect under the microscope, and the number of tubes reaching the base of the style is lower^{15,18,20,28,29,30,31,32,33,34}. In those cultivars whose flowers are especially fragile and degenerate under

laboratory conditions before the pollen tubes reach the base of the style, the self-(in)compatibility should be evaluated by field pollinations.

The evaluation of pollen viability allows to know whether the pollen used in the hand-pollinations is adequate and thus to discard possible false diagnoses of self-incompatibility in those cases of low or null germination percentage. The use of this technique has reported considerable differences in pollen germination between Japanese plum cultivars^{21,22,35}. Furthermore, this approach is also useful in detecting male sterility^{22,36,37}, which is of great importance for discarding male-sterile cultivars as pollen donors in commercial orchards and in crosses for breeding purposes.

Although the incompatibility relationships among cultivars can be determined using the same approach used for self-(in)compatibility assessment by laboratory pollinations, that technique has some disadvantages for this purpose. Pollinations can only be performed during the flowering season, and collections or orchards with adult trees placed near the laboratory are needed for the collection of flowers, whose lifespan is very short^{3,38}. Furthermore, the number of relationships analyzed each year is low, because each pair of cultivars require a particular cross-pollination. As an alternative, the identification of the *S*-alleles by PCR does not require flowers, since DNA can be extracted from any plant tissue; therefore, the period during which the samples can be collected is longer. Furthermore, unlike flowers that need to be used immediately, the leaves or other plant tissues can be stored, so the analysis is not limited to a few days in spring, but can be done throughout the year³⁹. The identification of the two *S*-alleles for each cultivar by the amplification of the second *S-RNase* intron using the primer set PruC2-PCER and PruT2-PCER^{40,41} and the subsequent

analysis of the size of the amplified fragments agarose gel electrophoresis^{20,21} allow assigning the cultivars to their corresponding incompatibility group (I.G.³). Each I.G. includes those self-incompatible cultivars with the same two S-alleles, which are therefore inter-incompatible. Cultivars from different groups, carrying at least one different S-allele, are inter-compatible.

This technique has the limitation that it does not allow the determination of the self-(in)compatibility for Japanese plum cultivars as it occurs in other *Prunus* species, in which self-compatibility has been associated with a particular S-allele, such as S_f in almond⁴² and S_4' in sweet cherry⁴³. Some S-alleles were initially associated with self-compatibility in Japanese plum, such as S_b ^{20,44}, S_e ^{19,20,44}, S_g ⁴⁵, and S_t ⁴⁶. However, subsequent works have reported self-incompatible cultivars that carry these S-alleles^{14,20,21,22,47}. Therefore, further work of S-allele sequencing is required in Japanese plum to clarify whether different alleles of the same size or mutations have been erroneously identified as alleles S_b , S_e , S_g , or S_t ³. Meanwhile, the assessment of self-(in)compatibility in Japanese plum should be analyzed by field- or laboratory-pollinations and the subsequent monitoring of fruit drop in the field or the behavior of pollen tubes under the microscope.

The identification of S-alleles by PCR analysis has been shown to be adequate to establish incompatibility relationships between cultivars³. However, to choose adequate pollinizers, it is necessary to combine this information with the data on the flowering times of each cultivar in each area for several years, since the mismatch in the flowering period, even if it only occurs in some years, may cause lack of fruit set with significant reduction in harvest¹⁴.

Many of the differences observed in floral biology and agronomic behavior between cultivars may be related to their origin, since all the cultivars currently grown are hybrids derived from crosses between the original species *P. salicina* with other species of the same genus but with different characteristics^{5,48}. This may be the main reason why it is necessary to combine different techniques to determine pollination requirements, unlike other fruit species. Knowing the pollination requirements of each cultivar facilitates the adequate selection of cultivars for the design of new orchards and allows the detection and resolution of production problems related to the lack of pollination in established orchards.

Disclosures

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments

This research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RFP2015-00015-00 and RTA2017-00003-00); Gobierno de Aragón—European Social Fund, European Union (Grupo Consolidado A12-17R), and Junta de Extremadura —Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan Regional de Investigación (IB16181), Grupo de Investigación (AGA001, GR18196). B.I. Guerrero was supported by a fellowship of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México (CONACYT, 471839).

References

1. Hendrick, U. P. *The Plums of New York*. J. B. Lyon Co., State Printers (1911).

2. Okie, W. R., Hancock, J. F. Plums. *Temperate Fruit Crop Breeding*. Edited by Hancock, J. F., Springer. Dordrecht. 337-357 (2008).
3. Guerra, M. E., Rodrigo, J. Japanese plum pollination: a review. *Scientia Horticulturae*. **197**, 674-686 (2015).
4. Okie, W. R. Introgression of *Prunus* species in plum. *New York Fruit Quarterly*. **14** (1), 29-37 (2006).
5. Okie, W. R., Weinberger, J. H. Plums. *Fruit Breeding, vol. 1. Tree and tropical fruits*. Edited by Janick, J., Moore, J. John Wiley and Sons Inc., New York. 559-608 (1996).
6. Mccubbin, A. G., Kao, T. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **16**, 333-364 (2000).
7. Hegedűs, A., Halász, J. Recent findings of the tree fruit self-incompatibility studies. *International Journal of Horticultural Science*. **13** (2), 7-15 (2007).
8. de Nettancourt, D. *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. Springer-Verlag. Berlin (2001).
9. Tao, R. *et al.* Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant and Cell Physiology*. **38** (3), 304-311 (1997).
10. Halász, J., Pedryc, A., Ercisli, S., Yilmaz, K., Hegedűs, A. S-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **135** (5), 410-417 (2010).
11. Lora, J., Hormaza, J. I., Herrero, M., Rodrigo, J. Self-incompatibility and S-allele identification in new apricot cultivars. *Acta Horticulturae*. (1231), 171-176 (2019).
12. Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J. I., Rodrigo, J. Determination of self- and inter-(in)compatibility relationships in apricot combining hand-pollination, microscopy and genetic analyses. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (160), 1-12 (2020).
13. Cachi, A. M., Wunsch, A. Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis. *Tree Genetics & Genomes*. **10**, 1205-1212 (2014).
14. Guerra, M. E., Guerrero, B. I., Casadomet, C., Rodrigo, J. Self-(in)compatibility, S-RNase allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Scientia Horticulturae*. **261**, 109022 (2020).
15. Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J. I., Herrero, M., Rodrigo, J. Optimizing production in the new generation of apricot cultivars: self-incompatibility, S-RNase allele identification, and incompatibility group assignment. *Frontiers in Plant Science*. **9** (April), 1-12 (2018).
16. Herrera, S., Rodrigo, J., Hormaza, J. I., Lora, J. Identification of self-incompatibility alleles by specific PCR analysis and S-RNase sequencing in apricot. *International Journal of Molecular Sciences*. **19** (11), 3612 (2018).
17. Socias i Company, R., Kodad, O., Fernández i Martí, A., Alonso, J. M. Mutations conferring self-compatibility in *Prunus* species: from deletions and insertions to epigenetic alterations. *Scientia Horticulturae*. **192**, 125-131 (2015).
18. Rodrigo, J., Herrero, M. Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Moniqui'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **71** (5), 801-805 (1996).
19. Beppu, K. *et al.* Se-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **80** (6), 760-764 (2005).

20. Guerra, M. E., Rodrigo, J., López-Corrales, M., Wunsch, A. *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding*. **128** (3), 304-311 (2009).
21. Guerra, M. E., Wunsch, A., López-Corrales, M., Rodrigo, J. Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **135** (6), 556-562 (2010).
22. Guerra, M. E., Wunsch, A., López-Corrales, M., Rodrigo, J. Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **136** (6), 375-381 (2011).
23. Fernández i Martí, A., Gradziel, T. M., Socias i Company, R. Methylation of the *Sf* locus in almond is associated with *S-RNase* loss of function. *Plant Molecular Biology*. **86**, 681-689 (2014).
24. Baggiolini, M. Les stades repérés des arbres fruitiers à noyau. *Revue romande d'Agriculture et d'Arboriculture*. **8**, 3-4 (1952).
25. Meier, U. *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph*. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (2001).
26. Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J. Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*. **192**, 141-147 (2015).
27. Fadon, E., Rodrigo, J. Combining histochemical staining and image analysis to quantify starch in the ovary primordia of sweet cherry during winter dormancy. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. **145** (2019).
28. Hormaza, J. I., Pinney, K., Polito, V. S. Correlation in the tolerance to ozone between sporophytes and male gametophytes of several fruit and nut tree species (*Rosaceae*). *Sexual Plant Reproduction*. **9**, 44-48 (1996).
29. Burgos, L. *et al.* The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **72** (1), 147-154 (1997).
30. Dicenta, F., Ortega, E., Cánovas, J. A., Egea, J. Self-pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*. **121**, 163-167 (2002).
31. Alonso, J. M., Socias i Company, R. Differential pollen tube growth in inbred self-compatible almond genotypes. *Euphytica*. **144**, 207-213 (2005).
32. Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. *Plant Biology*. **7**, 476-483 (2005).
33. Hedhly, A., Hormaza, J. I., Herrero, M. Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany*. **81**, 158-164 (2007).
34. Milatović, D., Nikolić, D. Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **82**, 170-174 (2007).
35. Jia, H. J., He, F. J., Xiong, C. Z., Zhu, F. R., Okamoto, G. Influences of cross pollination on pollen tube growth and fruit set in Zuili plums (*Prunus salicina*). *Journal of Integrative Plant Biology*. **50**, 203-209 (2008).
36. Herrero, M., Salvador, J. La polinización del ciruelo Red Beaut. *Información Técnica Económica Agraria*. **41**, 3-7 (1980).

37. Ramming, D. W. Plum. Register of new fruit and nut varieties: Brooks and Olmo, List 37. *HortScience*. **30** (6), 1142-1144 (1995).
38. Hartmann, W., Neümüller, M. Plum breeding. *Breeding plantation tree crops: Temperate species.*, Springer, New York, NY. 161-231 (2009).
39. Guerra, M. E., López-Corrales, M., Wunsch, A. Improved S-genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum. *Euphytica*. **186** (2), 445-452 (2012).
40. Tao, R. et al. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **124** (3), 224-233 (1999).
41. Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A., Hauck, N. R., Lezzoni, A. F. Identification and characterization of S-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **126**, 661-667 (2001).
42. López, M., Jose, F., Vargas, F. J., Battle, I. Self-(in)compatibility almond genotypes: a review. *Euphytica*. **150**, 1-16 (2006).
43. Bošković, R., Tobutt, K. R. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*. **90**, 245-250 (1996).
44. Beppu, K., Syogase, K., Yamane, H., Tao, R., Kataoka, I. Inheritance of self-compatibility conferred by the S_e-haplotype of Japanese plum and development of S_e-RNase gene-specific PCR primers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **85**, 215-218 (2010).
45. Beppu, K., Kumai, M., Yamane, H., Tao, R., Kataoka, I. Molecular and genetic analyses of the S-haplotype of the self-compatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) "Methley." *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. **87** (5), 493-498 (2012).
46. Beppu, K., Konishi, K., Kataoka, I. S-haplotypes and self-compatibility of the Japanese plum cultivar 'Karari.' *Acta Horticulturae*. **929**, 261-266 (2012).
47. Sapir, G., Stern, R. A., Shafir, S., Goldway, M. S-RNase based S-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. *Scientia Horticulturae*. **118**, 8-13 (2008).
48. Karp, D. Luther Burbank's plums. *HortScience*. **50** (2), 189-194 (2015).

CAPÍTULO 2

NECESIDADES DE POLINIZACIÓN EN VARIEDADES COMERCIALES Y SELECCIONES AVANZADAS DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS: AUTO- E INTER-INCOMPATIBILIDAD¹

RESUMEN

En el ciruelo de tipo japonés se está produciendo una intensa renovación varietal como resultado de la gran actividad de los programas de mejora. En muchas de las nuevas variedades se desconocen sus necesidades de polinización. En este capítulo se ha determinado la auto(in)compatibilidad de 129 accesiones de ciruelo de tipo japonés, y en 85 de ellas se determinó el genotipo *S* para establecer las relaciones de incompatibilidad. La determinación de las necesidades de polinización se ha realizado siguiendo la metodología puesta a punto en el capítulo anterior, mediante autopolinizaciones semi-*in vivo* en laboratorio y la posterior observación al microscopio de fluorescencia del crecimiento de los tubos polínicos en el pistilo de las flores polinizadas. Las relaciones de intercompatibilidad se determinaron identificando el genotipo *S* de cada accesión mediante PCR. Se detectó autocompatibilidad en 12 accesiones y autoincompatibilidad en 91 accesiones. Cinco accesiones presentaron androesterilidad. El genotipado permitió identificar cuatro nuevos alelos *S* (*S* α , *S* β , *S* γ , *S* δ) y establecer las relaciones de intercompatibilidad de las accesiones, que se clasificaron en los diferentes grupos de incompatibilidad, uno de ellos (XXVII, *ScSo*) descrito por primera vez en este trabajo. Para realizar una selección adecuada de variedades polinizadoras es necesario que las variedades sean intercompatibles y que coincidan en floración, por lo que es recomendable seleccionar al menos dos polinizadores para asegurar la coincidencia en floración debido a las variaciones en la época de floración entre años.

¹Parte de los resultados de este capítulo están publicados en:

Guerra, M. E., **Guerrero, B. I.**, Casadomet, C., Rodrigo, J. (2020). Self-(in)compatibility, *S-RNase* allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Scientia Horticulturae*, 261, article 109022, doi:10.1016/j.scienta.2019.109022. (Anexo IV).

INTRODUCCIÓN

El ciruelo es el frutal de hueso con mayor superficie cultivada en el mundo (2.727.745 ha), por delante del almendro, melocotonero, albaricoquero y cerezo. La producción mundial total ha aumentado en la última década, pasando de 10 (2010) a 12 millones de toneladas (2019) (FAOSTAT, 2021). Las estadísticas oficiales no diferencian entre ciruelo de tipo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) y ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), por lo que es difícil conocer los datos correspondientes a cada especie. Dentro de los diferentes ciruelos cultivados para consumo de fruto, el ciruelo de tipo japonés está experimentando una importante renovación varietal en los últimos años (Guerrero et al., 2018b). Desde el inicio de la mejora genética del ciruelo japonés en el siglo XIX y como consecuencia del interés creciente en su cultivo, se ha generado un elevado número de variedades con un alto grado de introgresión, ya que las actuales variedades comerciales no son *Prunus salicina* puras, sino una mezcla de híbridos interespecíficos obtenidos a partir de la hibridación de *P. salicina* con otras especies de ciruelos diploides (Okie, 2006; Faust & Surányi, 2011; Guerra & Rodrigo, 2015).

La mayoría de las variedades de ciruelo de tipo japonés son autoincompatibles, por lo que sus flores no pueden fecundarse con su propio polen y necesitan polen de otras variedades intercompatibles para producir fruto (Okie & Weinberger, 1996; Beppu et al., 2002, 2012b; Guerra & Rodrigo, 2015). Al igual que otras especies del género *Prunus*, el ciruelo japonés presenta un sistema de incompatibilidad de tipo gametofítico (GSI), que está determinado por el locus polimórfico *S* (Tao et al., 1997; Yamane et al., 2001; Wunsch & Hormaza, 2002). Este mecanismo también condiciona las relaciones de incompatibilidad entre variedades, ya que variedades autoincompatibles con el mismo genotipo *S* son incompatibles entre sí y necesitan cultivarse junto a otras variedades compatibles y coincidentes en floración (Guerra et al., 2009, 2012, 2020), por lo que es

necesario conocer las necesidades de polinización de cada variedad para el diseño adecuado de las nuevas plantaciones (Guerra & Rodrigo, 2015).

En trabajos previos se han identificado los alelos *S* de incompatibilidad de 256 variedades de ciruelo japonés, que se han distribuido en 26 grupos de incompatibilidad (Beppu et al., 2002, 2003; Sapir et al., 2004, 2008; Zhang et al., 2007, 2008; Halász et al., 2007; Jun et al., 2007; Kitashiba et al., 2008; Guerra et al., 2009, 2011, 2012, 2020; Nyawo, 2017; Abdallah et al., 2019). Sin embargo, no se conocen las necesidades de polinización de muchas de las nuevas variedades que se están introduciendo en los últimos años. En el periodo 1995-2020 se han registrado 149 nuevas variedades de ciruelo japonés en la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales de la Unión Europea (*Community Plant Variety Office*) (CPVO, 2021), procedentes de programas de mejora tanto públicos como privados de países de los cinco continentes (Guerra & Rodrigo, 2017; Batlle et al., 2018).

El objetivo de este capítulo es determinar las necesidades de polinización de 129 nuevas variedades y selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés procedentes de programas de mejora de EEUU, Francia y Sudáfrica. Por un lado, se ha determinado el carácter de auto(in)compatibilidad de cada accesión mediante observaciones al microscopio del crecimiento de tubos polínicos de flores autopolinizadas, y por otro se ha identificado el genotipo *S* de un grupo de estas accesiones para su asignación a los correspondientes grupos de incompatibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para los ensayos de polinización se utilizaron flores de 129 accesiones de ciruelo de tipo japonés (56 variedades comerciales y 73 selecciones avanzadas) (Tabla 1), y para el análisis de las *S-RNasas* se utilizaron hojas jóvenes de 84 de las 129 accesiones (41 variedades comerciales y 43 selecciones avanzadas). El material vegetal se obtuvo de las colecciones de AFRUCCAS (Asociación de Fruticultores de Caspe) e Ibergen en Caspe (Zaragoza), Viveros Mariano Soria en La Almunia de Doña Godina (Zaragoza), y el Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-La Orden) en Guadajira (Badajoz). Las accesiones proceden de siete programas de mejora de tres países: EEUU (Chamberlin, SDR Fruit LLC, USDA y Zaiger Genetics), Francia (INRA) y Sudáfrica (ARC-Infruitec y Stargrow).

Tabla 1. Accesiones de ciruelo de tipo japonés analizadas.

Accesiones	Origen	Accesiones	Origen
African Delight	ARC-Infruitec, Sudáfrica	S007	Stargrow, Sudáfrica
African Pride	ARC-Infruitec, Sudáfrica	S008	Stargrow, Sudáfrica
African Rose	ARC-Infruitec, Sudáfrica	S011	Stargrow, Sudáfrica
Atumn Treat	Zaiger Genetics, EEUU	S012	Stargrow, Sudáfrica
Bella Gold	Zaiger Genetics, EEUU	S013	Stargrow, Sudáfrica
Black Satin	Zaiger Genetics, EEUU	S015	Stargrow, Sudáfrica
Black Splendor	Zaiger Genetics, EEUU	S017	Stargrow, Sudáfrica
Candy Heart	Zaiger Genetics, EEUU	S018	Stargrow, Sudáfrica
Constante	Desconocido	S019	Stargrow, Sudáfrica
Crimson Glo	Zaiger Genetics, EEUU	S020	Stargrow, Sudáfrica
Crimson Heart	Zaiger Genetics, EEUU	S022	Stargrow, Sudáfrica
Crimson Kat	Zaiger Genetics, EEUU	S023	Stargrow, Sudáfrica
Dapple Jack	Zaiger Genetics, EEUU	S024	Stargrow, Sudáfrica
Earliqueen	Zaiger Genetics, EEUU	S025	Stargrow, Sudáfrica
Ebony Rose	Zaiger Genetics, EEUU	S026	Stargrow, Sudáfrica
Emerald Drop	Zaiger Genetics, EEUU	S029	Stargrow, Sudáfrica
Fall Fiesta	Zaiger Genetics, EEUU	S030	Stargrow, Sudáfrica
Festival Red	Zaiger Genetics, EEUU	S031	Stargrow, Sudáfrica
Flavor Fall	Zaiger Genetics, EEUU	S032	Stargrow, Sudáfrica
Flavor Finale	Zaiger Genetics, EEUU	S033	Stargrow, Sudáfrica
Flavor Fusion	Zaiger Genetics, EEUU	S034	Stargrow, Sudáfrica
Flavor Grenade	Zaiger Genetics, EEUU	S035	Stargrow, Sudáfrica

Accesiones	Origen	Accesiones	Origen
Flavor King	Zaiger Genetics, EEUU	S036	Stargrow, Sudáfrica
Flavor Supreme	Zaiger Genetics, EEUU	S039	Stargrow, Sudáfrica
Flavorosa	Zaiger Genetics, EEUU	S040	Stargrow, Sudáfrica
Glory Red	Zaiger Genetics, EEUU	S041	Stargrow, Sudáfrica
Golden Globe	Zaiger Genetics, EEUU	S042	Stargrow, Sudáfrica
Golden Kiss	ARC-Infruitec, Sudáfrica	S043	Stargrow, Sudáfrica
Green Sun	Chamberlin, USA	S044	Stargrow, Sudáfrica
Grenadine	Zaiger Genetics, EEUU	S045	Stargrow, Sudáfrica
Hiromi Red	Zaiger Genetics, EEUU	S046	Stargrow, Sudáfrica
Honey Crisp	Desconocido	S047	Stargrow, Sudáfrica
Honey Down	Stargrow, Sudáfrica	S048	Stargrow, Sudáfrica
Honey Lucas	Desconocido	S049	Stargrow, Sudáfrica
Honey Moon	Stargrow, Sudáfrica	Z002	Zaiger Genetics, EEUU
Honey Punch	Zaiger Genetics, EEUU	Z003	Zaiger Genetics, EEUU
Honey Star	Stargrow, Sudáfrica	Z004	Zaiger Genetics, EEUU
Honey Sweet	INRA, Francia	Z005	Zaiger Genetics, EEUU
Joanna Red	Zaiger Genetics, EEUU	Z006	Zaiger Genetics, EEUU
Late Blue	Zaiger Genetics, EEUU	Z007	Zaiger Genetics, EEUU
Negra de junio	Desconocido	Z008	Zaiger Genetics, EEUU
Negra de octubre	Desconocido	Z009	Zaiger Genetics, EEUU
Owen T	USDA, EEUU	Z010	Zaiger Genetics, EEUU
Pioneer	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z011	Zaiger Genetics, EEUU
Ruby Star	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z012	Zaiger Genetics, EEUU
Ruby Sun	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z013	Zaiger Genetics, EEUU
Sapphire	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z014	Zaiger Genetics, EEUU
Souvenir	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z015	Zaiger Genetics, EEUU
Splash	Zaiger Genetics, EEUU	Z016	Zaiger Genetics, EEUU
Sundew	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z017	Zaiger Genetics, EEUU
Sunkiss	ARC-Infruitec, Sudáfrica	Z018	Zaiger Genetics, EEUU
Sweet Blaze	Zaiger Genetics, EEUU	Z019	Zaiger Genetics, EEUU
Sweet Pixie	Zaiger Genetics, EEUU	Z020	Zaiger Genetics, EEUU
Sweet Treat	Zaiger Genetics, EEUU	Z021	Zaiger Genetics, EEUU
Tasty Sweet	Zaiger Genetics, EEUU	Z022	Zaiger Genetics, EEUU
Titine	Zaiger Genetics, EEUU	Z023	Zaiger Genetics, EEUU
A001	Desconocido	Z024	Zaiger Genetics, EEUU
A002	Desconocido	Z025	Zaiger Genetics, EEUU
A003	Desconocido	Z026	Zaiger Genetics, EEUU
C001	SDR Fruit LLC, EEUU	Z027	Zaiger Genetics, EEUU
S001	Stargrow, Sudáfrica	Z028	Zaiger Genetics, EEUU
S002	Stargrow, Sudáfrica	Z029	Zaiger Genetics, EEUU
S004	Stargrow, Sudáfrica	Z031	Zaiger Genetics, EEUU
S005	Stargrow, Sudáfrica	Z032	Zaiger Genetics, EEUU
S006	Stargrow, Sudáfrica		

Caracterización de la época de floración

Se caracterizó la fenología de 2-5 árboles de cada accesión desde las primeras hasta las últimas flores abiertas. Se consideró plena floración (F50) cuando al menos el 50 % de las flores se encontraron en el estado F (Baggiolini, 1952), que coincide con el estado 65 de la escala BBCH (Meier, 2001; Fadón et al., 2015). Para cada localización, se elaboró un calendario de floración con datos de varios años de cada accesión: en la colección de Ibergen del 2020 al 2021, en AFRUCCAS del 2018 al 2020, y en CICITEX-La Orden del 2018 al 2021. El registro de la floración de las accesiones analizadas y otras variedades de referencia localizadas en cada una de las colecciones permitió la comparación de los periodos de floración entre años y accesiones, así como la determinación de las accesiones coincidentes en floración.

Polinizaciones semi-in vivo en laboratorio

Para establecer la auto(in)compatibilidad de cada accesión, se realizaron autopolinizaciones y cruzamientos *semi-in vivo* en laboratorio, y posteriormente se observó el crecimiento de los tubos polínicos en las flores polinizadas mediante microscopía de fluorescencia (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020). Para ello, se recogieron flores de cada accesión en botón globoso [estado D (Baggiolini, 1952); estado 57 de la escala BBCH (Meier, 2001)], se emascularon y se colocaron en espuma de florista húmeda a temperatura ambiente. Se utilizaron entre 25-30 flores por cada autopolinización o cruzamiento, que se polinizaron 24 h después de ser emasculadas. El cruzamiento se utilizó como control empleando una mezcla de polen de diferentes variedades para asegurar la presencia de polen compatible. Para obtener el polen, se recogieron flores en botón globoso de cada accesión, se separaron las anteras y se colocaron sobre bandejas de papel a temperatura ambiente durante 24 h hasta su dehiscencia. El polen se coló usando una malla fina de 0.26 mm x 0.26 mm de luz de

malla y se usó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta su uso. Transcurridas 72 h después de la polinización, los pistilos se fijaron en etanol:ácido acético (3:1) durante al menos 24 h, y se almacenaron en etanol 75% (v/v) a 4°C (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

La viabilidad del polen de cada accesión se determinó en el momento de cada polinización mediante la siembra de aproximadamente 300 granos de polen en una placa de Petri con medio sólido de germinación (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020). Se dejó germinar el polen durante 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se observó en la lupa para comprobar la germinación. Se consideró polen viable cuando la mayoría de los granos de polen presentaban un tubo polínico de longitud mayor al diámetro del grano de polen (Hormaza et al., 1996; Hedhly et al., 2005; Guerra et al., 2011).

Para preparar las muestras para su observación al microscopio, los pistilos fijados se lavaron con agua destilada tres veces en intervalos de 1 h y se dejaron en sulfito sódico al 5% (p/v) a 4°C durante 24 h. Posteriormente, se autoclavaron en sulfito sódico al 5% (p/v) en una autoclave vertical Presoclave II (JP Selecta, Barcelona, España) a 120°C durante 8 min y se tiñeron con azul de anilina al 1% (v/v) en K_3PO_4 0,1N. Se observó el crecimiento de los tubos a lo largo del estilo en un microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con epifluorescencia para luz ultravioleta, usando un filtro excitador BP340-390 y un filtro de barrera LP425 (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

De cada accesión y polinización se observaron al menos 10 pistilos con suficientes granos de polen en el estigma para ser considerados como válidos. En cada pistilo, se determinó hasta qué longitud del estilo crecieron los tubos polínicos y el número de tubos polínicos que alcanzaron la base del estilo. Se consideraron accesiones autocompatibles aquellas en cuyas flores autopolinizadas los tubos polínicos crecieron a lo largo del pistilo

hasta la base del estilo alcanzando la entrada al ovario, y accesiones autoincompatibles cuando los tubos polínicos detuvieron su crecimiento a lo largo del estilo, generalmente en el primer tercio del mismo, y no se observaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Identificación de alelos S

En cada accesión se extrajo ADN genómico de hojas jóvenes liofilizadas y pulverizadas en un mortero. El ADN se aisló usando el kit comercial Speedtools plant DNA extraction kit (Biotools, Madrid, España), se cuantificó en un espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Delaware, EEUU) y se diluyó a una concentración de 10 ng/μl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl usando un termociclador Thermal Cycler T100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU) (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Las combinaciones de *primers* usados para la amplificación por PCR del primer intrón del gen que codifica para la *S-RNasa* fueron: PaConsI-F/PaConsI-R2 (Sonneveld et al., 2006) y Pru-T2/SI32 (Tao et al., 1999; Wiersma et al., 2001; Wünsch & Hormaza, 2004b). Se comprobó la amplificación de los fragmentos obtenidos por PCR mediante electroforesis en geles de agarosa (Horizontal Mini Gel Electrophoresis System - Fisherbrand, Massachusetts, EEUU) (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020). La determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis capilar, marcando los *primers* Pru-T2 y PaConsI-F con los fluorocromos 6-FAM y VIC, respectivamente. La separación de los fragmentos se realizó en un secuenciador ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) con un marcador de tamaño GeneScan 500LIZ (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) diseñado para medir el tamaño de los fragmentos de ADN en el intervalo 35-500 pb. Los fragmentos (alelos) se visualizaron y dimensionaron con el software PeakScanner versión 1.0

(Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU) (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Para el establecimiento de los tamaños de los diferentes alelos S presentes en las accesiones, se utilizaron como referencia diez variedades con alelos conocidos (Beppu et al., 2002; Guerra et al., 2009, 2012).

Estadística

Para comparar las variables que determinan el carácter de auto(in)compatibilidad entre el grupo de accesiones autocompatibles y autoincompatibles, se realizó un análisis estadístico no paramétrico de la prueba de la mediana de Mood (Mangiafico, 2016) usando la función ‘mood.medtest’ del paquete ‘RVAideMemoire’ v. 0.9-80 (Hervé, 2021) en el entorno de desarrollo integrado RStudio v. 1.2.5033 (RStudio-Team, 2020) para el lenguaje de programación R v. 3.6.3 (R Core Team, 2021). Previo al análisis estadístico, los datos de porcentajes se transformaron mediante la función de la raíz cuadrada del arcoseno seguido de una transformación angular.

RESULTADOS

Épocas de floración

Se observaron diferencias en la época de floración entre accesiones dentro de cada localización y entre años para cada accesión, aunque en general se mantuvo el orden de la época de floración entre accesiones (Figuras 1, 2 y 3). En todos los años y localizaciones, la mayoría de las accesiones coincidieron en floración, aunque sólo algunas coincidieron en plena floración. Todas las floraciones en la localización de Caspe (AFRUCCAS e Ibergen) se agruparon en pocos días en todos los años. Esta tendencia fue más clara en la colección de AFRUCCAS en 2019, mientras que las floraciones en la localización de Guadajira (CICYTEX-La Orden) se alargaron varias semanas.

Algunas variedades coincidieron en plena floración en todos los años, como Candy Hear, Emerald Drop y Flavor Fall (Ibergen, Figura 1), Black Diamond, Black Gold y Black Splendor (AFRUCCAS, Figura 2) y Black Amber, Crimson Glo, Freedom, Sapphire, Souvenir y Sundew (CICYTEX-La Orden, Figura 3). El número de accesiones coincidentes en plena floración todos los años fue menor en las colecciones con mayor número de años de observaciones [5 de 17 en AFRUCCAS (29 % en tres años), 6 de 18 en CICYTEX-La Orden (33 % en cuatro años) y 9 de 11 en Ibergen (82 % en dos años)].

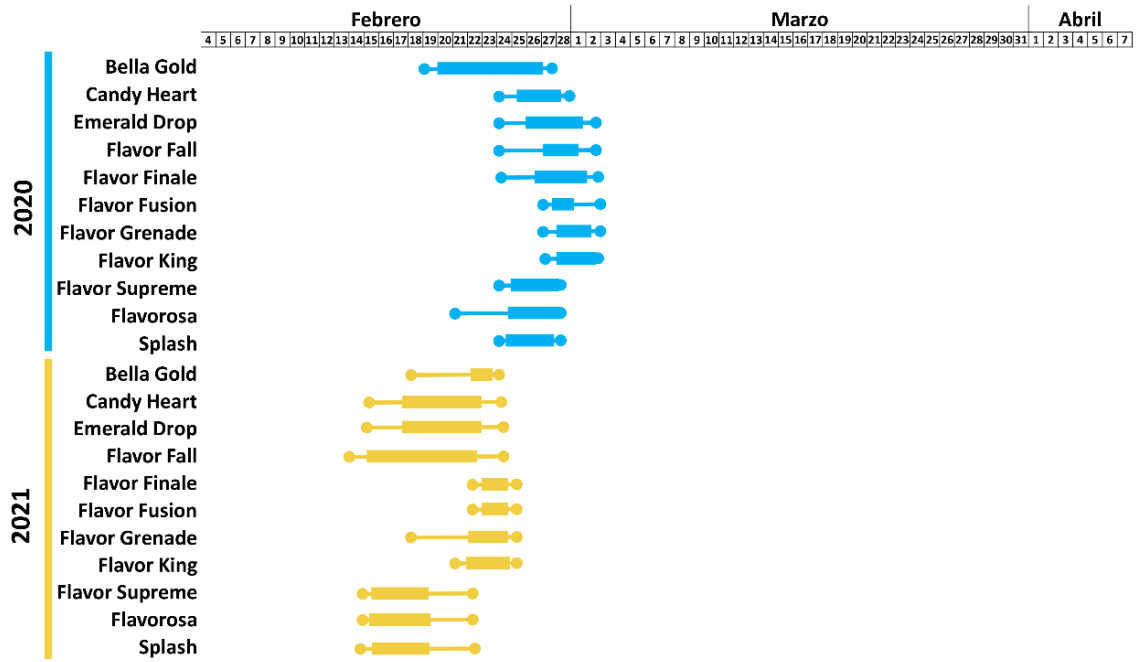


Figura 1. Época de floración en 11 variedades de ciruelo de tipo japonés de la colección de Ibergen en Caspe (Zaragoza) en 2020 y 2021. Las líneas indican el periodo desde las primeras hasta las últimas flores abiertas y los rectángulos indican los días de plena floración.



Figura 2. Época de floración en 17 accesiones de ciruelo de tipo japonés de la colección de AFRUCCAS en Caspe (Zaragoza) en 2018, 2019 y 2020. Las líneas indican el periodo desde las primeras hasta las últimas flores abiertas y los rectángulos indican los días de plena floración. En negrita las variedades cuyas necesidades de polinización se han analizado en este trabajo.

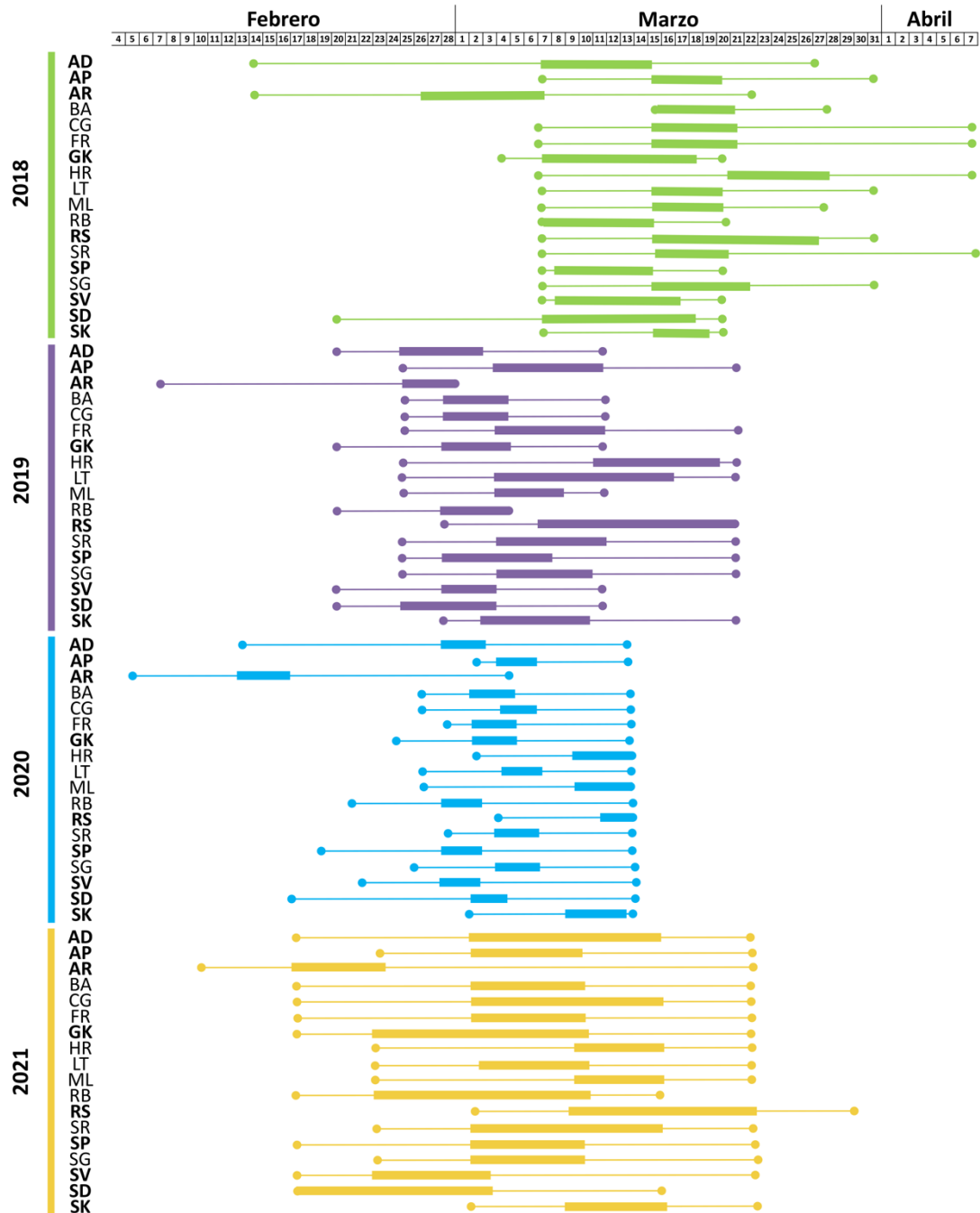


Figura 3. Época de floración en 18 variedades de ciruelo de tipo japonés de la colección del CICYTEX-La Orden en Guadajira (Badajoz) en cuatro años consecutivos (2018-2021). Las líneas indican el periodo desde las primeras hasta las últimas flores abiertas y los rectángulos indican los días de plena floración. En negrita las variedades cuyas necesidades de polinización se han analizado en este trabajo. AD=African Delight, AP=African Pride, AR=African Rose, BA=Black Amber, CG=Crimson Glo, FR=Freedom, GK=Golden Kiss, HR=Hiromi Red, LT=Laetitia, ML=Methley, RB=Red Beaut, RS=Ruby Star, SR=Santa Rosa, SP=Sapphire, SG=Songold, SV=Souvenir, SD=Sundew, SK=Sunkiss.

Determinación de la auto(in)-compatibilidad

Se determinó la autocompatibilidad de nueve variedades (African Rose, Bella Gold, Fall Fiesta, Flavor Finale, Grenadine, Late Blue, Owen T, Pioneer y Souvenir) y tres selecciones avanzadas (S049, Z003, y Z029) mediante la observación de la germinación de los granos de polen en el estigma (Figura 4A), el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo (Figura 4B) y en la base del estilo (Figura 4C). En estas accesiones, entre el 32 y el 80 % de los pistilos autopolinizados mostraron entre 1 y 5 tubos polínicos llegando a la base del estilo (Figura 4C, Tabla 2). Por otro lado, se determinó autoincompatibilidad en 35 variedades y 56 selecciones avanzadas, en cuyas flores autopolinizadas los tubos polínicos no alcanzaron la base del estilo (Figura 4D). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las accesiones autocompatibles y autoincompatibles en el porcentaje de pistilos con tubos polínicos en la mitad y en la base del estilo, en el porcentaje del estilo recorrido por el tubo polínico más largo, en el porcentaje del estilo recorrido por el tubo polínico más largo (alcance máximo) y en la media de tubos polínicos en la base del estilo (Tabla 2).

En todas las flores autopolinizadas se observaron granos de polen germinados en el estigma (Figura 4A), con excepción de tres variedades (Candy Heart, Festival Red y Flavor Supreme) y tres selecciones avanzadas (C001, S004 y S039) (Tabla 2). El porcentaje de pistilos con granos de polen germinados en el estigma varió de 40 a 100%. La variedad Sweet Pixie y cuatro selecciones avanzadas (S033, S036, Z031 y Z032) no presentaron granos de polen en las anteras y se consideraron accesiones androestériles. El polen del resto de las accesiones germinó correctamente en condiciones *in vitro* y fue considerado viable. Tres accesiones se consideraron posibles autocompatibles (AC^p), Crimson Kat, Glory Red y Z019, ya que se observaron pocas flores con tubos polínicos en la base del estilo y sería necesario realizar más observaciones para confirmar la

autocompatibilidad. Las accesiones cuyas flores no mostraron suficientes granos de polen germinados en el estigma, así como las que presentaron pocos pistilos con tubos polínicos alcanzando la base del estilo fueron consideradas accesiones con datos no concluyentes (Tabla 2).

En todas las polinizaciones de cruzamientos usados como control se observaron pistilos con entre 1 y 5 tubos polínicos alcanzando la base del estilo, con las excepciones de los cruzamientos con ‘Bella Gold’ y ‘Honey Moon’ (Tabla suplementaria 1).

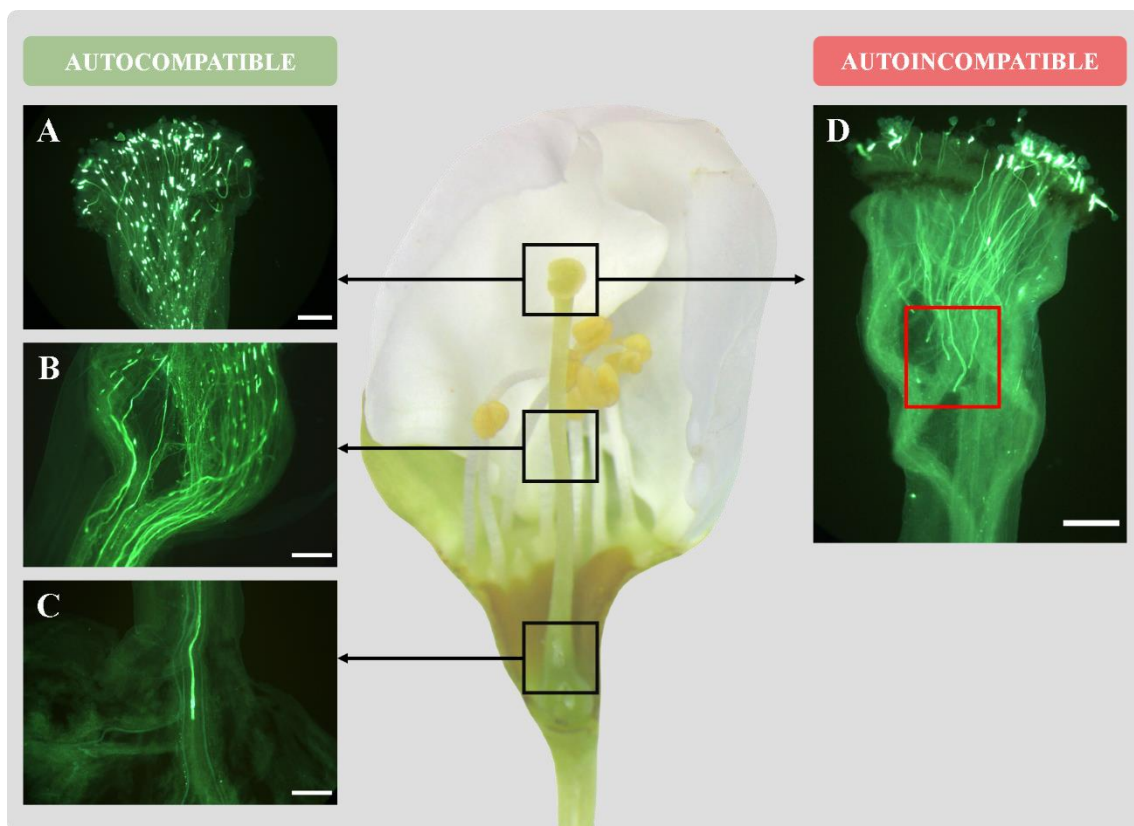


Figura 4. Germinación de los granos de polen y crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas de ciruelo de tipo japonés. (A) Polen germinado en el estigma, (B) tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo y (C) tubo polínico alcanzado la base del estilo en una variedad autocompatible. (D) Polen germinado en el estigma y tubos polínicos detenidos en el estilo (recuadro rojo) en una variedad autoincompatible (Barra = 200 μm).

Tabla 2. Comportamiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas de 56 variedades y 73 selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés. Pistilos con granos de polen germinados en el estigma, pistilos con tubos polínicos en la mitad y en la base del estilo, alcance máximo del estilo recorrido por el tubo polínico más largo, número de tubos polínicos alcanzando la base del estilo y autocompatibilidad (AC) o autoincompatibilidad (AI).

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)	AC/AI
		mitad del estilo	base del estilo				
African Delight	83	0	0	5	20	0	AI
African Pride	97	17	0	30	80	0	AI
Autumn Treat	87	0	0	32	40	0	AI
Black Satin	80	0	0	21	35	0	AI
Black Splendor	100	100	0	54	60	0	AI
Constante	100	8	0	38	80	0	AI
Crimson Glo	93	61	0	42	60	0	AI
Dapple Jack	79	9	0	33	70	0	AI
Earliqueen	89	19	0	34	50	0	AI
Ebony Rose	88	10	0	35	50	0	AI
Emerald Drop	100	53	0	46	50	0	AI
Flavor Fall	97	53	0	43	50	0	AI
Flavor Fusion	100	9	0	26	60	0	AI
Flavor Grenade	100	47	0	43	60	0	AI
Flavorosa	94	47	0	39	70	0	AI
Golden Globe	100	0	0	36	50	0	AI
Green Sun	100	100	0	61	80	0	AI
Hiroimi Red	100	100	0	60	70	0	AI
Honey Crisp	86	92	0	58	70	0	AI
Honey Down	100	10	0	27	50	0	AI
Honey Lucas	100	90	0	75	90	0	AI
Honey Moon	100	10	0	29	40	0	AI
Honey Punch	91	20	0	41	70	0	AI
Honey Sweet	91	90	0	52	60	0	AI
Joanna Red	86	17	0	30	30	0	AI
Negra de Junio	100	0	0	21	30	0	AI
Negra de Octubre	100	35	0	30	50	0	AI
Ruby Star	87	8	0	17	50	0	AI
Ruby Sun	100	0	0	32	40	0	AI
Sapphire	100	4	0	19	50	0	AI
Splash	67	0	0	11	20	0	AI
Sundew	100	0	0	5	30	0	AI
Sweet Blaze	100	0	0	33	40	0	AI
Tasty Sweet	100	69	0	47	50	0	AI
Titine	100	0	0	26	30	0	AI
A001	100	17	0	33	50	0	AI
A002	100	100	0	64	80	0	AI
A003	100	31	0	36	60	0	AI
S001	100	33	0	36	50	0	AI
S002	100	8	0	30	50	0	AI

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)	AC/AI
		mitad del estilo	base del estilo				
S005	40	0	0	1	5	0	AI
S006	63	65	0	45	60	0	AI
S008	63	70	0	43	50	0	AI
S012	81	38	0	41	80	0	AI
S015	71	70	0	64	50	0	AI
S017	100	0	0	6	30	0	AI
S018	100	0	0	20	30	0	AI
S019	100	90	0	55	80	0	AI
S020	80	13	0	30	50	0	AI
S022	100	83	0	60	80	0	AI
S023	100	100	0	59	80	0	AI
S024	86	63	0	46	50	0	AI
S026	100	90	0	49	50	0	AI
S029	96	74	0	51	70	0	AI
S030	100	79	0	45	75	0	AI
S032	100	70	0	49	70	0	AI
S034	70	44	0	45	80	0	AI
S035	83	95	0	68	80	0	AI
S040	100	21	0	27	30	0	AI
S041	75	58	0	30	50	0	AI
S042	91	0	0	24	30	0	AI
S043	41	45	0	45	50	0	AI
S044	100	67	0	44	50	0	AI
S045	100	100	0	52	60	0	AI
S046	92	0	0	27	40	0	AI
S047	100	40	0	39	80	0	AI
S048	71	100	0	64	85	0	AI
Z002	83	60	0	27	60	0	AI
Z004	100	60	0	43	80	0	AI
Z005	100	100	0	61	75	0	AI
Z006	100	90	0	53	60	0	AI
Z007	100	50	0	47	85	0	AI
Z008	95	11	0	22	30	0	AI
Z009	100	67	0	48	80	0	AI
Z010	100	38	0	41	90	0	AI
Z011	100	70	0	47	50	0	AI
Z012	75	83	0	70	90	0	AI
Z013	94	80	0	57	60	0	AI
Z014	77	88	0	49	70	0	AI
Z015	83	70	0	53	70	0	AI
Z016	88	100	0	57	60	0	AI
Z017	100	8	0	32	40	0	AI
Z020	100	0	0	26	30	0	AI
Z021	100	100	0	52	60	0	AI
Z022	100	100	0	85	90	0	AI
Z023	100	50	0	39	50	0	AI
Z024	67	0	0	23	30	0	AI

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)	AC/AI
		mitad del estilo	base del estilo				
Z025	57	100	0	76	90	0	AI
Z026	100	100	0	68	90	0	AI
Z027	100	0	0	0	0	0	AI
Z028	90	28	0	44	70	0	AI
African Rose	65	50	32	46	100	1	AC
Bella Gold	100	100	54	81	100	3	AC
Fall Fiesta	93	100	54	81	100	4	AC
Flavor Finale	100	100	86	84	100	4	AC
Grenadine	93	79	64	94	100	3	AC
Late Blue	100	100	69	81	100	3	AC
Owen T	100	100	80	89	100	3	AC
Pioneer	100	75	75	78	100	3	AC
Souvenir	75	53	47	51	100	1	AC
S049	70	100	86	100	100	2	AC
Z003	83	100	50	56	100	2	AC
Z029	100	100	73	90	100	5	AC
Crimson Kat	92	73	36	60	100	3	AC ^P
Glory Red	100	90	40	79	100	3	AC ^P
Z019	100	50	30	63	100	3	AC ^P
AI (Media)	91	46 b	0 b	40 b	57 b	0 b	--
AC (Media)	87	72 a	37 a	64 a	100 a	3 a	--
Chi-cuadrado	35,3	4,0	110,3	87,5	30,9	405,5	--
df	1	1	1	1	1	1	--
p-value	2,8 ^{-09***}	0,045*	<2,2 ^{-16***}	<2,2 ^{-16***}	2,6 ^{-08***}	<2,2 ^{-16***}	--
Datos no concluyentes							
Candy Heart	0	0	0	0	0	0	
Crimson Heart	95	95	5	66	100	2	
Festival Red	0	0	0	0	0	0	
Flavor King	100	96	4	65	100	4	
Flavor Supreme	0	0	0	0	0	0	
Golden Kiss	74	29	12	37	100	1	
Honey Star	58	18	0	17	60	--	
Sunkiss	83	40	8	38	100	2	
Sweet Treat	100	100	7	68	100	3	
C001	0	0	0	0	0	0	
S004	0	0	0	0	0	0	
S007	100	70	10	64	100	2	
S011	67	10	10	23	100	4	
S013	86	83	8	67	100	1	
S025	52	9	9	33	100	1	
S031	100	69	8	51	100	1	
S039	0	0	0	0	0	0	
Z018	57	46	8	33	100	3	

AC^P = Posible autocompatible. Diferencias significativas: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns = no significativo.

Identificación de alelos S y relaciones de incompatibilidad

Se utilizaron 2 pares de *primers* desarrollados en cerezo que son específicos de las regiones conservadas del primer intron del gen de la *S-RNasa* (Figura 5). Adicionalmente, para confirmar el tamaño de los alelos *S*, se amplificaron los alelos *S* de 10 variedades de las que se conoce su genotipo (Tabla 3).

Con el par de *primers* Pru-T2/SI-32 se amplificaron 12 fragmentos con un rango de tamaño de 408 a 498 pb, 8 de ellos pertenecientes a los genotipos de las variedades de referencia, pero no se pudieron amplificar los alelos *Sf*, *Sg* y *Sr*. Con el par de *primers* PaConsI-F/PaConsI-R2 se amplificaron 15 fragmentos con tamaños de 207 a 405 pb, 11 de ellos pertenecientes a los genotipos de las variedades de referencia, incluyendo los alelos que no se lograron amplificar con el par Pru-T2/SI-32. Aunque se observaron bajos niveles de polimorfismo (diferencias entre 1 y 2 pb) entre los alelos *Sb* (444 pb) y *Se* (446 pb) con el par Pru-T2/SI-32, y entre los alelos *Sa* (389 pb) y *Sh* (390 pb) con el par PaConsI-F/PaConsI-R2, los cuatro alelos se identificaron correctamente. El uso de estos dos pares de *primers* permitió completar la identificación de los alelos *S* amplificados (Tabla 3), con excepción de cuatro alelos con tamaños de 337/408, 345/422, 395/468 y 406/480 pb (PaConsI-F/PaConsI-R2 y Pru-T2/SI-32) que no se pudieron identificar con ningún alelo *S* conocido, y se nombraron *S α* , *S β* , *S γ* , *S δ* , respectivamente.

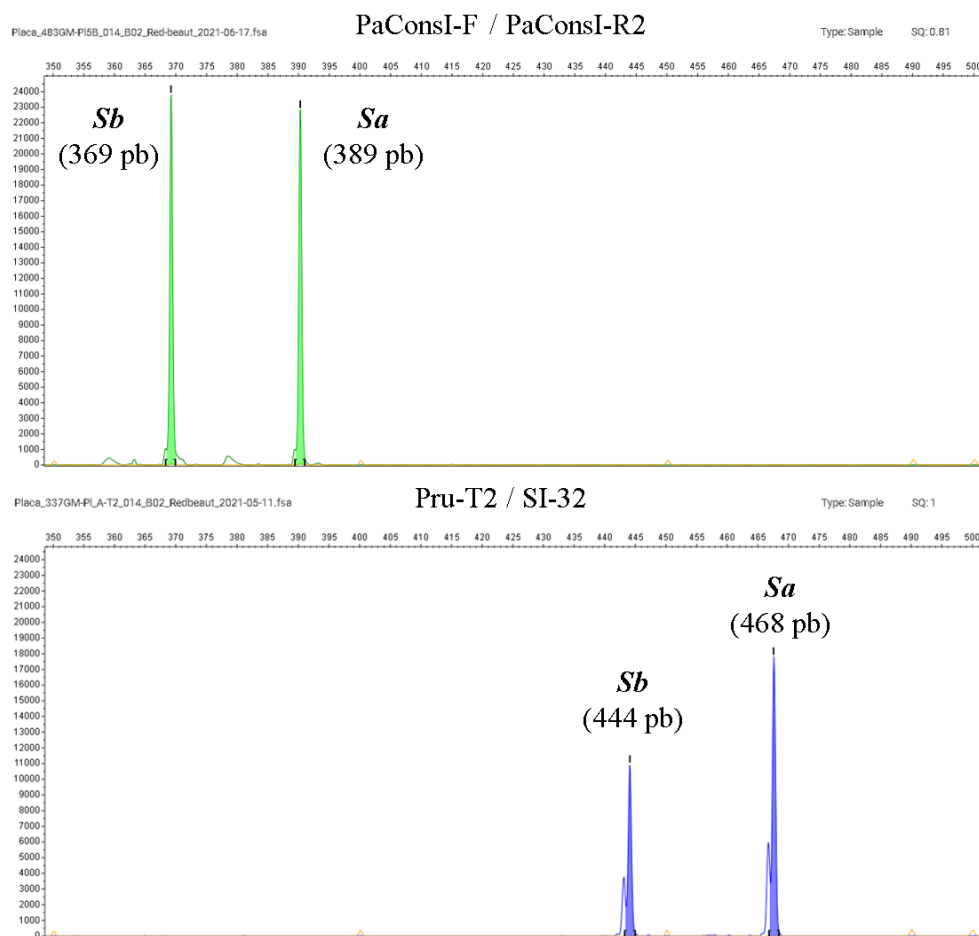


Figura 5. Electroferogramas de la amplificación de fragmentos del gen *S-RNasa* por PCR con los pares de primers PaConsI-F/PaConsI-R2 y Pru-T2/SI-32 de la variedad Red Beaut (*SaSb*).

Tabla 3. Tamaños (pb) de los fragmentos del gen *S-RNasa* amplificados por PCR separados por electroforesis capilar identificados en las variedades de referencia.

Alelos <i>S</i>	Variedades	Referencia	PaConsI-F/ PaConsI-R2	Pru-T2/ SI-32
<i>Sa</i>	Red Beaut (<i>SaSb</i>)	Beppu et al. (2002)	389	468
<i>Sb</i>	Red Beaut (<i>SaSb</i>)	Beppu et al. (2002)	369	444
<i>Sc</i>	Laroda (<i>SbSc</i>)	Beppu et al. (2002)	342	412
<i>Sd</i>	3442 (<i>SbSd</i>)	Guerra et al. (2012)	424	458
<i>Se</i>	Black Splendor (<i>ScSe</i>)	Guerra et al. (2009)	374	446
<i>Sf</i>	Golden Japan (<i>SfSg</i>)	Guerra et al. (2009)	328	n.a.
<i>Sg</i>	Golden Japan (<i>SfSg</i>)	Guerra et al. (2009)	317	n.a.
<i>Sh</i>	Songold (<i>ShSk</i>)	Guerra et al. (2009)	390	462
<i>Sk</i>	Songold (<i>ShSk</i>)	Guerra et al. (2009)	384	459
<i>So</i>	Ambra (<i>SbSo</i>)	Guerra et al. (2009)	422	498
<i>Sr</i>	Joanna Red (<i>SrSs</i>)	Guerra et al. (2009)	207	n.a.

n.a.= alelo no amplificado.

Se han identificado los genotipos *S* de 84 accesiones (9 autocompatibles y 75 autoincompatibles). De las autoincompatibles, 66 se asignaron a 11 de los 26 grupos de incompatibilidad descritos previamente (Beppu et al. 2003; Guerra et al. 2012; Guerra et al. 2009, 2011; Halász et al. 2007). La selección avanzada Z004 se asignó al grupo XXVII (*ScSo*), descrito por primera vez en este trabajo, y ‘Z013’ se asignó al grupo 0, ya que su genotipo (*ScSk*) no coincidió con ninguna accesión. En tres variedades (Splash, Sweet Pixie y Sweet Treat) y cuatro selecciones avanzadas (Z008, Z0011, Z021 y Z033) sólo se logró identificar un alelo, por lo cual no pudieron ser incluidas en ningún grupo de incompatibilidad (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo *S* de 43 variedades y 41 selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés analizadas en este trabajo y 60 variedades analizadas en trabajos previos.

G.I.	Genotipo <i>S</i>	Accesiones analizadas en este trabajo	Variedades analizadas en trabajos previos
I	<i>SaSb</i>		Red Beaut ¹
II	<i>SbSc</i>	Black Satin Dapple Jack Emerald Drop Flavor Grenade Honey Sweet Tasty Sweet A001 S023 Z009 Z020 Z023	Black Amber ⁴ Black Beaut ⁶ Flavor Grenade ⁴ Fortune ⁶ Golden Globe ⁶ Golden Plum ⁶ Green Sun ^{6, b} Laroda ¹ October Sun ⁴ Super Giant ⁴ TC Sun ⁴
III	<i>SbSf</i>	Titine	AU Amber ⁸ AU Roadside ⁸
IV	<i>SbSh</i>	Flavor Fall Flavor Supreme Hiromi red Sundew Z031	Eldorado ⁶ Freedom ⁶ Hiromi Red ⁶
VI	<i>SfSh</i>	A002	Mariposa ⁸
VII	<i>ScSh</i>	Candy Heart Constante Negra de Octubre 5-AMB A003 S029 Z006 Z022 Z026	Angeleno ⁴ Gaia ⁶ Green Sun ^{4, b} Queen Rosa ² Royal Diamond ⁸ Ruby Crunch ⁶ Ruby Queen ⁸ Sweet August ⁷

G.I.	Genotipo S	Accesiones analizadas en este trabajo	Variedades analizadas en trabajos previos
VIII	<i>SeSh</i>	African Delight African Pride Earliqueen Negra de Junio Ruby Star S018 S026 S041 S047 Z005	Black Diamond ³ Black Gold ⁶ Black Late ⁶ Earliqueen ⁶ Extremagold ⁶ John W ⁶ Showtime ⁶
X	<i>ShSk</i>	Golden Kiss Howard Sun Z007 Z016	Friar ⁴ Howard Sun ⁶ Songold ⁶
XI	<i>ScSe</i>	Autumn Treat Black Splendor Festival Red S002 S022 S042 Z014 Z019 Z024 Z025	AU Rosa ⁸ Autumn Giant ⁶ Black Splendor ⁶ Champion ⁷ E-326 ⁸ Royal Garnet ⁶ Royal Zee ⁴ Sweet Autum ⁴ Sybarite ⁷
XII	<i>SbSe</i>	Flavor Fall Flavor King Flavorosa Sapphire Z010 Z012 Z017 Z028 Z031	Black Jewell ⁷ Flavor King ⁴ Freya ⁸ Sapphire ⁶ Sparkly ⁸
XIV	<i>SaSc</i>	Sunkiss	Crimson Glo ⁶

G.I.	Genotipo <i>S</i>	Accesiones analizadas en este trabajo	Variedades analizadas en trabajos previos
XX	<i>SbSk</i>	Crimson Kat Sweet Blaze S036 Z023 Z027	
XXVII ^a	<i>ScSo</i>	Z004	Red Heart ⁶
Grupo 0	<i>ScSk</i>	Z013	
Accesiones con al menos un alelo sin identificar	<i>SeSβ</i>	Splash	
	<i>ShSβ</i>	Sweet Pixie	
	<i>SeSα</i>	Sweet Treat	
	<i>Sh</i>	Z008	
	<i>SbSβ</i>	Z011	
	<i>Sb</i>	Z021	
	<i>ShSβ</i>	Z033	
Accesiones autocompatibles	<i>SbSc</i>	Glory Red	Nubiana ⁶ Zanzi Sun ⁶
	<i>SbSe</i>	African Rose Pioneer	
	<i>SbSh</i>	Flavor Finale Late Blue	
	<i>SbSg</i>		Methley ⁵
	<i>ScSe</i>		Beauty ¹ Casselman ¹
		Fall Fiesta	Late Santa Rosa ¹ Santa Rosa ⁶
	<i>SeSh</i>		Laetitia ⁶
		Souvenir	
	<i>SγSδ</i>	Bella Gold	
	<i>SeSβ</i>	Z029	

^aGrupo de incompatibilidad descrito por primera vez en este trabajo; ^bVariedad descrita con genotipos diferentes; ¹Beppu et al., 2002, ²2003; ³Sapir et al., 2004; ⁴Halász et al., 2007; ⁵Jun et al., 2007; ⁶Guerra et al., 2009, ⁷2011, ⁸2012.

En las 84 accesiones se han identificado ocho de los 11 alelos amplificados en las variedades con genotipo *S* conocido y usadas como referencia. Los alelos más frecuentes en las variedades comerciales y en las selecciones avanzadas fueron *Sb* (26 y 20 %), *Sc* (19 y 24 %), *Se* (21 y 23 %) y *Sh* (22 y 20 %) (Figura 6). Los alelos *Sa*, *Sf* y *Sk* presentaron una frecuencia alélica menor del 10 %. Los alelos *Sα*, *Sγ* y *Sδ* sólo se amplificaron en las variedades comerciales, con una frecuencia alélica del 1 % cada uno. El alelo *Sβ* presentó frecuencias alélicas del 2 y 4 % en variedades y selecciones avanzadas, respectivamente.

Los alelos *Sd*, *Sg*, y *Sr*, presentes en las variedades utilizadas como referencia, no se observaron en las accesiones analizadas (Figura 6).

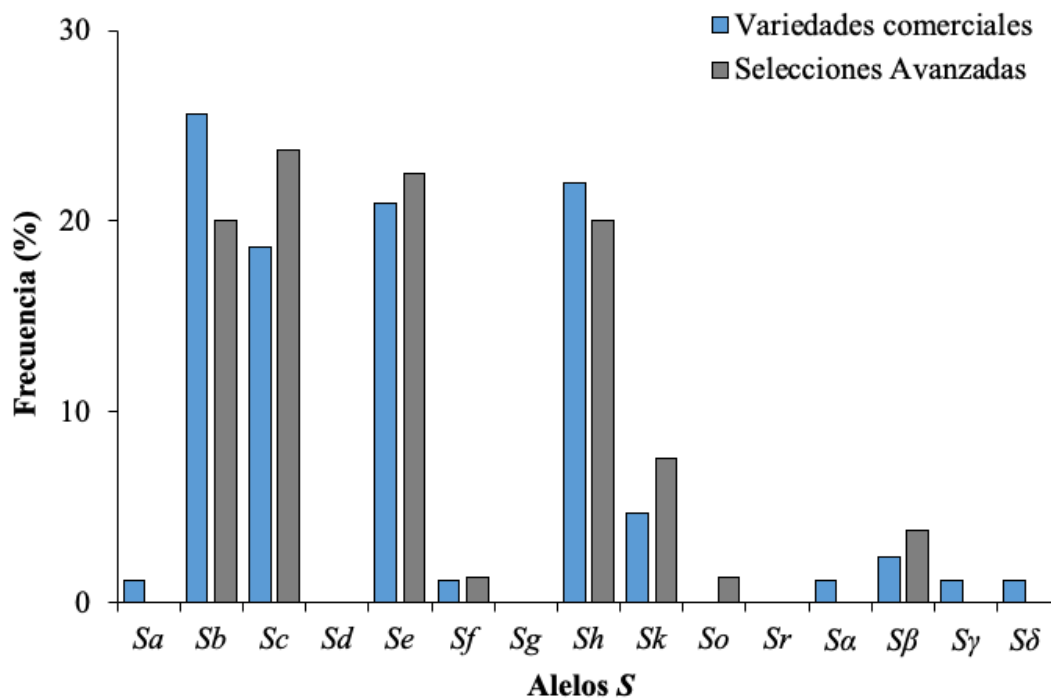


Figura 6. Frecuencia de los alelos *S* amplificadas en las variedades comerciales y selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés analizadas.

DISCUSIÓN

Se ha determinado la auto(in)compatibilidad de 129 accesiones por primera vez en este trabajo. El 9 % fueron autocompatibles y el 71 % autoincompatibles. El resto se consideraron androestériles (4%), posibles autocompatibles (2%) o con datos no concluyentes que requieren ensayos adicionales (14%). Un reducido número de accesiones autocompatibles también se ha observado en variedades comerciales (Guerra et al., 2009, 2010, 2011) y en variedades locales tunecinas (Abdallah et al., 2019). Aunque la autocompatibilidad es un objetivo común en la mayoría de programas de mejora, existen muy pocas variedades autocompatibles en la actualidad (Milošević & Milošević, 2018). Todas las accesiones presentaron polen viable, con excepción de Candy Heart y las accesiones androestériles, por lo que necesitan ser cultivadas junto a otras variedades intercompatibles para producir cuajado y no pueden usarse como polinizadores de otras variedades (Guerra, 2011; Guerra & Rodrigo, 2015).

La determinación del genotipo *S* ha permitido establecer las relaciones de intercompatibilidad de 77 accesiones por primera vez y confirmar los genotipos *S* de siete accesiones descritas en trabajos previos. Estos resultados han permitido asignar cada accesión autoincompatible a su correspondiente grupo de incompatibilidad. Se han descrito un nuevo grupo de incompatibilidad (XXVII, *ScSo*) y cuatro nuevos alelos *S* (*S* α , *S* β , *S* γ , *S* δ) en las variedades Sweet Pixie y Sweet Treat (ambas pluerrys), Splash (pluot) y Bella Gold (peacotum). Se necesitan nuevos análisis para determinar si son nuevos alelos de ciruelo, ya que las cuatro variedades se comercializan como híbridos de ciruelo con albaricoquero, cerezo y/o melocotonero.

Cinco de las accesiones autocompatibles (African Rose, Fall Fiesta, Pioneer, Souvenir y Z029) portaron el alelo *Se* en su genotipo, confirmando la relación entre la presencia de este alelo y el carácter de autocompatibilidad (Beppu et al., 2005). Las

variedades autocompatibles Flavor Finale, Glory Red y Late Blue, al igual que African Rose y Pioneer, portaron el alelo *Sb*, que también ha sido relacionado con la autocompatibilidad en las variedades Nubiana y Zanzi Sun (Guerra et al., 2009). Sin embargo, ni el alelo *Se* ni el *Sb* confieren siempre el carácter de autocompatibilidad, ya que también están presentes en el genotipo *S* de algunas variedades autoincompatibles (Sapir et al., 2004; Halász et al., 2007; Hegedűs & Halász, 2007; Guerra et al., 2009, 2011, 2012), al igual que en las accesiones analizadas en este trabajo que han sido incluidas en los grupos de incompatibilidad II (*SbSc*), III (*SbSf*), IV (*SbSh*), VIII (*SeSh*), XI (*ScSe*), XII (*SbSe*) y XX (*SbSc*). Aunque no existe evidencia de que alguna delección o disminución en la transcripción en los genes *S-RNasa* (Beppu et al., 2005) o *SFB* (Beppu et al., 2010) sean la causa de la autocompatibilidad en ciruelo de tipo japonés, es necesario realizar nuevos trabajos de secuenciación con los alelos presentes en las variedades autocompatibles para determinar si existen varios alelos del mismo tamaño o son mutaciones que hayan sido erróneamente identificados como *Sb* o *Se*. En otros frutales de hueso como almendro (Kodad et al., 2010; Fernández i Martí et al., 2014), cerezo (Bošković & Tobutt, 1996; Wunsch & Hormaza, 2004a; Cachi & Wunsch, 2014) y guindo (Yamane et al., 2003), la identificación de los alelos *S* permite determinar si una accesión es autocompatible o autoincompatible, ya que todas las autocompatibles presentan un alelo determinado. Sin embargo, en ciruelo de tipo japonés la información disponible actualmente no permite la determinación de la autocompatibilidad a través de los alelos *S* y es necesario el estudio al microscopio del crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas (Guerra & Rodrigo, 2015).

En dos selecciones avanzadas solo se pudo amplificar un único alelo [Z008 (*Sh*) y Z021 (*Sb*)]. Para completar el genotipo *S* de estas accesiones sería necesario realizar la

caracterización molecular con diferentes *primers* que amplifiquen otros segmentos del gen de la *S-RNAsa* o un análisis de secuenciación.

Aunque las variedades comerciales de ciruelo de tipo japonés cultivadas en la actualidad son híbridos de varias especies de ciruelos diploides, y que las accesiones analizadas en este trabajo son recientes, se ha observado una baja diversidad alélica. Cuatro alelos (*Sb*, *Sc*, *Se* y *Sh*) representan el 80% de la frecuencia alélica, lo que posiblemente esté relacionado con el uso del mismo grupo de variedades como parentales en los programas de mejora, como Casselman, Friar, Mariposa, Nubiana, Queen Rosa y Red Beaut (Google-Patents, 2021). El análisis de la diversidad génica mediante el uso de marcadores moleculares como SSR (*Simple Sequence Repeat*) podría ayudar a confirmar si se está perdiendo la diversidad genética.

La observación del crecimiento de tubos polínicos en pistilos procedentes de polinizaciones controladas y la identificación de los alelos de incompatibilidad mediante técnicas moleculares permitió determinar la auto- e inter-compatibilidad de las accesiones y su distribución en los diferentes G.I. Aquellas accesiones que presentan el mismo genotipo se agrupan en el mismo G.I. y son incompatibles entre sí, mientras que aquellas que difieren en al menos un alelo se consideran inter-compatibles (Guerra & Rodrigo, 2015; Herrera et al., 2021b).

La coincidencia en la época de floración de las accesiones intercompatibles fue muy variable entre años. Algunas variedades como Black Amber (*SbSc*), Crimson Glo (*SaSc*) y Freedom (*SbSh*) coincidieron en floración todos los años (CICYTEX-La Orden), por lo que pueden establecerse en la misma plantación para actuar como polinizadores entre sí. Otras accesiones coincidieron en floración algunos años, como Sapphire (*SbSe*) y Songold (*ShSk*) (CICITEX-La orden). Sin embargo, la mayoría de accesiones intercompatibles no coincidieron ningún año en floración, como Howard Sun (*ShSk*) y

John W (*SeSh*) (AFRUCCAS), lo que realza la necesidad de considerar las épocas de floración de las variedades en cada zona de estudio junto a las relaciones de intercompatibilidad para un correcto diseño de plantaciones (Guerra et al., 2020; Herrera et al., 2021b).

La fecha de floración puede presentar importantes variaciones entre años, ya que viene determinada por las condiciones meteorológicas de los meses previos. El ciruelo de tipo japonés, al igual que otros frutales de clima templado, necesita acumular una cantidad de frío durante el reposo invernal y posteriormente una acumulación de temperaturas cálidas para florecer adecuadamente (Lang et al., 1987). Estas necesidades de frío y calor son específicas para cada variedad (Fadón et al., 2020b). La variabilidad en la floración entre años y variedades puede aumentar en los próximos años por la reducción del frío invernal ocasionada por el cambio climático (Campoy et al., 2011; Luedeling et al., 2013a; Guo et al., 2014; Fadón et al., 2021b), especialmente en inviernos templados en los que se tarda más tiempo en cubrir las necesidades de frío (Luedeling et al., 2013a). Este hecho, unido a la falta de conocimiento de datos fenológicos de las nuevas variedades, hace que sea conveniente utilizar más de una variedad polinizadora para prevenir la falta de coincidencia de floración.

Conocer el carácter de auto(in)compatibilidad de cada variedad es necesario para determinar qué variedades necesitan polinización cruzada. Para la selección de polinizadores en el diseño de nuevas plantaciones, y para identificar problemas de producción asociados a falta de polinización en plantaciones ya establecidas, es necesario combinar las relaciones de incompatibilidad entre variedades con la información de las épocas de floración de cada variedad en cada zona de cultivo. Conocer las necesidades agroclimáticas de cada variedad permitiría prever las posibles diferencias en la época de floración entre variedades, además de predecir la adaptación a cada zona de cultivo. Sin

embargo, existe información de muy pocas variedades de ciruelo de tipo japonés (Tabuenca, 1967; Ruiz et al., 2018). En el siguiente capítulo se van a determinar las necesidades agroclimáticas de las principales variedades cultivadas en la actualidad y de un grupo de nuevas obtenciones de varios programas de mejora.

Tabla suplementaria 1. Comportamiento de los tubos polínicos en flores de 54 variedades y 70 selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés polinizadas con mezcla de polen de otras accesiones. Pistilos con granos de polen germinados en el estigma, pistilos con tubos polínicos en la mitad y en la base del estilo, alcance máximo del estilo recorrido por el tubo polínico más largo y número de tubos polínicos alcanzando la base del estilo.

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)
		mitad del estilo	base del estilo			
African Delight	78	22	11	33	100	1
African Pride	100	75	56	71	100	1
African Rose	100	16	14	25	100	1
Atumn Treat	100	100	100	100	100	2
Bella Gold	100	10	0	38	50	--
Black Satin	100	100	100	100	100	4
Black Splendor	100	100	100	100	100	2
Candy Heart	100	100	100	100	100	2
Constante	100	100	100	100	100	3
Crimson Glo	86	100	100	100	100	3
Crimson Heart	100	100	100	100	100	2
Crimson Kat	83	100	100	100	100	3
Dapple Jack	80	100	100	92	100	2
Earliqueen	100	100	100	100	100	1
Ebony Rose	79	100	100	100	100	2
Emerald Drop	100	100	100	100	100	2
Fall fiesta	100	100	100	100	100	4
Festival Red	100	100	100	100	100	3
Flavor Fall	100	100	100	100	100	3
Flavor Finale	100	100	100	100	100	4
Flavor Fusion	91	100	100	100	100	3
Flavor Grenade	100	100	100	100	100	4
Flavor King	100	100	100	90	100	4
Flavor Supreme	100	100	100	100	100	3
Flavorosa	100	100	100	100	100	2
Glory Red	92	100	100	100	100	3
Golden Globe	100	100	100	100	100	2
Golden Kiss	94	93	53	72	100	2
Green Sun	100	100	100	100	100	4
Grenadine	100	92	42	69	100	1
Hiroimi Red	100	100	100	100	100	3
Honey Crisp	100	100	100	100	100	2
Honey Down	80	100	100	94	100	2
Honey Lucas	100	100	70	81	100	2
Honey Moon	75	0	0	30	30	--
Honey Punch	100	100	50	74	100	3
Honey Star	100	100	100	100	100	3
Honey Sweet	83	100	100	100	100	2
Joanna Red	70	100	100	100	100	2

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)
		mitad del estilo	base del estilo			
Late Blue	100	85	85	85	100	3
Negra de junio	100	100	100	100	100	1
Negra de octubre	100	100	100	100	100	2
Owen T	100	100	100	100	100	3
Pioneer	100	88	88	89	100	3
Ruby Star	90	100	78	86	100	2
Ruby Sun	100	100	100	100	100	3
Sapphire	100	57	43	56	100	2
Souvenir	100	50	42	59	100	2
Splash	100	100	100	100	100	4
Sundew	100	75	31	63	100	2
Sunkiss	92	58	33	55	100	1
Sweet Blaze	100	100	100	100	100	2
Sweet Treat	100	100	100	100	100	5
Tasty Sweet	90	89	89	100	100	2
Titine	100	100	100	100	100	2
A001	100	100	100	100	100	2
A002	100	100	100	100	100	1
A003	100	100	100	100	100	1
C001	50	100	60	73	100	5
S001	100	100	92	87	100	2
S002	100	100	100	100	100	2
S004	70	86	71	83	100	2
S005	100	100	100	100	100	2
S006	100	100	100	100	100	2
S007	100	100	100	100	100	3
S008	50	100	20	81	100	4
S011	100	100	60	80	100	4
S012	88	100	100	100	100	3
S013	70	100	100	100	100	4
S015	80	100	63	79	100	3
S017	100	90	90	88	100	2
S018	100	100	92	97	100	2
S019	100	90	90	90	100	2
S020	100	100	100	100	100	3
S022	100	100	100	100	100	3
S023	60	100	100	100	100	3
S024	100	100	100	100	100	2
S025	100	100	100	100	100	1
S026	100	100	100	100	100	4
S029	100	100	100	100	100	4
S030	79	100	100	100	100	3
S031	70	100	100	100	100	2
S032	100	100	60	93	100	3
S034	80	100	100	100	100	2
S035	100	100	80	92	100	5

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)
		mitad del estilo	base del estilo			
S039	40	50	0	28	100	2
S040	100	100	100	100	100	2
S041	85	100	100	100	100	2
S042	100	100	100	100	100	1
S043	100	100	100	98	100	3
S044	90	100	67	84	100	3
S045	90	100	100	100	100	2
S046	100	100	100	100	100	3
S047	90	100	100	94	100	1
S048	70	100	100	95	100	3
S049	90	89	78	83	100	3
Z002	70	100	86	83	100	1
Z003	50	100	100	100	100	3
Z004	80	100	100	100	100	2
Z005	100	100	100	99	100	2
Z006	100	100	100	100	100	3
Z007	80	100	100	100	100	3
Z008	90	100	100	100	100	4
Z009	100	100	100	100	100	2
Z010	100	100	100	100	100	2
Z011	100	100	100	100	100	2
Z012	100	100	100	100	100	2
Z013	70	100	100	96	100	1
Z014	83	100	100	100	100	2
Z015	100	100	90	91	100	2
Z016	100	100	100	100	100	2
Z017	100	100	100	100	100	2
Z018	80	100	100	100	100	3
Z019	100	100	100	100	100	3
Z020	100	100	100	100	100	3
Z021	100	100	100	100	100	3
Z022	100	100	100	100	100	1
Z023	100	100	100	100	100	2
Z024	71	100	100	100	100	2
Z025	91	100	90	97	100	3
Z026	100	100	100	100	100	6
Z027	100	100	100	100	100	2
Z028	100	100	100	100	100	2
Z029	90	100	100	100	100	4



Objetivo 2. Necesidades agroclimáticas.

CAPÍTULO 3

NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS DE ACCESIONES DE CIRUELO DE TIPO JAPONÉS

RESUMEN

Las especies leñosas de clima templado entran en un periodo de reposo durante el invierno en el que necesitan acumular frío para salir de endodormancia y posteriormente acumular temperaturas cálidas durante la ecodormancia para que tenga lugar la floración. Estas necesidades agroclimáticas son específicas para cada variedad. A pesar del gran número de variedades de ciruelo de tipo japonés disponibles en la actualidad, se desconocen las necesidades agroclimáticas de la mayoría. En este trabajo se determinaron las necesidades de frío y calor de 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés, incluyendo variedades comerciales y selecciones avanzadas de programas de mejora, en colecciones situadas en Guadajira (Badajoz, Extremadura) y Zaragoza, Caspe y La Almunia de Doña Godina (Zaragoza, Aragón). Un grupo de 22 variedades se analizaron en dos localizaciones. Para la determinación de la salida de la endodormancia, en cada accesión se realizaron muestreos semanales de 5 varetas con al menos 10 yemas florales cada una durante el invierno. Las varetas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 12 h y una temperatura de 22 ± 1 °C durante 8 días, caracterizando su crecimiento y desarrollo fenológico. Se consideró el fin de endodormancia cuando las yemas aumentaron su peso 30% tras los 8 días en cámara. El frío acumulado hasta esa fecha se cuantificó con tres modelos, en horas frío (HF), unidades frío (UF) y porciones frío (PF). El calor acumulado desde la salida de endodormancia hasta la floración se cuantificó mediante la suma de *Growing degree hours* (GDH). Se observó gran variabilidad en las necesidades de frío, que presentaron un rango de 136-922 HF, 262-1.116 UF y 19,4-54,0 PF, y en las necesidades de calor, que oscilaron entre 3.975 y 10.167 GDH. La época de floración estuvo más condicionada por las necesidades de frío en Guadajira y por las necesidades de calor en Caspe. Conocer las necesidades agroclimáticas de cada variedad es importante para determinar su adaptación a cada zona de cultivo y a los inviernos menos fríos ocasionados por el cambio climático en algunos años.

INTRODUCCIÓN

El ciruelo de tipo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.), como otras especies leñosas de clima templado, entra en un periodo de reposo a finales del otoño y florece al final del invierno (Guerra & Rodrigo, 2015). El reposo presenta varias fases: endodormancia, ecodormancia y paradormancia (Lang et al., 1987). Las fases de endodormancia y paradormancia se caracterizan por la suspensión del crecimiento de los meristemas por factores intrínsecos de la planta. La endodormancia está regulada por factores fisiológicos internos de la estructura implicada, mientras que la paradormancia está controlada por factores de la planta ajenos a la estructura implicada, como la dominancia apical (Lang et al., 1985). En endodormancia, los meristemas son más resistentes a las condiciones adversas causadas por las bajas temperaturas del invierno. Esta exposición al frío es necesaria para superar el estado de reposo. Cuando los árboles cubren sus necesidades de frío, entran en la fase de ecodormancia, que está controlada por factores ambientales externos a la planta (Lang et al., 1985). En esta fase, los árboles deben estar expuestos a un periodo de temperaturas cálidas para que se produzca el desborre y la floración (Brown & Kotob, 1956; Lang et al., 1987; Guerra & Rodrigo, 2015; Fadón et al., 2020b). Las necesidades agroclimáticas -de frío durante la endodormancia y de calor durante la ecodormancia-, son específicas para cada variedad, lo que condiciona su distribución en las zonas de cultivo y su capacidad de adaptación a regiones con diferente climatología (Fadón et al., 2020a).

El conocimiento de las necesidades agroclimáticas es clave para prever si una variedad se puede adaptar con éxito a una zona de cultivo (Fadón & Rodrigo, 2018). Para estimar experimentalmente las necesidades de frío, es necesario determinar cuándo se produce la salida del reposo y así poder cuantificar el frío acumulado hasta entonces. La técnica empírica más utilizada se basa en la evaluación de la fenología y el crecimiento

de las yemas fructíferas en varetas recogidas secuencialmente durante el invierno tras un periodo en una cámara de crecimiento con condiciones controladas de fotoperiodo y temperaturas cálidas (Brown & Kotob, 1956; Fadón et al., 2018b, 2020a; Ruiz et al., 2018).

Para la cuantificación del frío durante la endodormancia y del calor durante la ecodormancia se han desarrollado diferentes modelos que utilizan rangos de temperatura específicos (Campoy et al., 2011; Fadón et al., 2020b). Los más utilizados para cuantificar el frío invernal son: el modelo de Weinberger, que propone las horas frío (HF) (Weinberger, 1950); el modelo Utah, que propone el uso de unidades frío (UF) (Richardson et al., 1974); y el modelo dinámico, que mide el frío acumulado en porciones frío (PF) (Fishman et al., 1987). Para cuantificar la acumulación de calor desde la salida de ecodormancia hasta la floración, el modelo más utilizado es el de horas calor expresadas como *Growing degree hours* (GDH) (Richardson et al., 1974).

Aunque se han realizado numerosos trabajos sobre la determinación de las necesidades agroclimáticas en frutales de hueso (Fadón et al., 2020b), en ciruelo japonés la información es escasa (Tabuenca, 1967; Ruiz et al., 2018). En este cultivo se está produciendo una intensa renovación varietal, con la incorporación de un gran número de nuevas variedades procedentes de programas de mejora de varios países (Topp et al., 2012; Guerra & Rodrigo, 2015, 2017; Guerrero et al., 2018a). La introducción de las nuevas variedades en las plantaciones comerciales está provocando falta de producción en algunos casos, debido a que se desconoce su comportamiento agronómico y capacidad de adaptación a cada zona de cultivo (Guerra & Rodrigo, 2016; Guerrero et al., 2018a).

La información disponible sobre las necesidades agroclimáticas del ciruelo japonés se limita a dos estudios realizados en Zaragoza (8 variedades) (Tabuenca, 1967) y en Murcia (11 variedades) (Ruiz et al., 2018), en los que sólo dos variedades, Golden

Japan y Santa Rosa, se analizaron en ambos trabajos. Las variedades analizadas hasta ahora representan un porcentaje muy pequeño de las existentes en la actualidad, lo que hace necesario estudiar las necesidades agroclimáticas de otras variedades para determinar su adaptación a cada zona de cultivo, especialmente en las zonas más cálidas, dentro del contexto del cambio climático con reducción del frío invernal (Fadón et al., 2020b).

En este trabajo se han analizado 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés, incluyendo variedades comerciales y selecciones avanzadas de programas de mejora, en tres localizaciones en la provincia de Zaragoza (Aragón) y una en Badajoz (Extremadura) durante al menos dos años. En 22 variedades se han analizado las necesidades agroclimáticas en dos localizaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se analizaron 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés procedentes de colecciones situadas en zonas de diferentes condiciones agroclimáticas: una localizada en la provincia de Badajoz (Guadajira) y las otras tres en la provincia de Zaragoza (Zaragoza, Caspe y La Almunia de Doña Godina) (Figura 1). En Badajoz, el material vegetal se obtuvo de 46 variedades de la colección del Instituto de Investigaciones Agrarias Finca La Orden-Valdesequera perteneciente al Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-La Orden) en Guadajira (38°51'9.6" N, 6°40'15.6" W y 214 m de altitud). En Zaragoza, el material vegetal se obtuvo de tres localizaciones distintas: 16 variedades de la colección del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) (41°43'37.1" N, 0°47'21.0" W y 220 m de altitud), 21 accesiones de la colección de AFRUCCAS (Asociación de Fruticultores de la Comarca de Caspe) (41°18'56.5" N, 0°05'06.9" E y 172 m de altitud) y 34 accesiones de la colección de "Viveros Mariano Soria" en La Almunia de Doña Godina (41°28'37.4" N, 1°22'26.8" W y 366 m de altitud). En 22 de las 95 accesiones los ensayos se llevaron a cabo en dos localizaciones, en Guadajira y La Almunia (4 variedades), Guadajira y Zaragoza (8 variedades), en Guadajira y Caspe (9 variedades), y Caspe y La Almunia (una variedad). Los ensayos se realizaron durante los inviernos de 2017 a 2021 en al menos dos años en cada localización: Zaragoza (2017-2018; 2018-2019; 2019-2020; 2020-2021), Caspe (2017-2018; 2018-2019; 2019-2020), La Almunia (2019-2020; 2020-2021) y Guadajira (2019-2020; 2020-2021).



Figura 1. Situación de las colecciones de ciruelo japonés utilizadas en el estudio en las provincias de Badajoz (Guadajira) y Zaragoza (Caspe, La Almunia de Doña Godina y Zaragoza).

Época de floración

La fenología de las diferentes accesiones se monitoreó en floración de acuerdo a Baggiolini (1952) en los años estudiados. La duración del periodo de floración se estableció desde la apertura de las primeras flores hasta las últimas. Se consideró plena floración cuando al menos el 50% de las flores (F50) se encontraban en el estado fenológico F (Baggiolini, 1952), que corresponde al estado 65 en la escala BBCH (Meier, 2001; Fadón et al., 2015).

Determinación del fin de la endodormancia

Se realizaron muestreos semanales durante todo el reposo invernal, desde principios de noviembre a principios de febrero. Cada día de muestreo se recogieron 5 varetas (20-30 cm de largo y 4-8 mm de diámetro con al menos 10 yemas florales cada una) de cada accesión (Figura 2A). Se realizó un corte fresco bajo el agua en la base de

las varetas, se colocaron en espuma de florista con agua (Figura 2B) y se mantuvieron durante 8 días en una cámara de cultivo, con un fotoperiodo de 12 horas luz proporcionada por lámparas de iluminación de luz de día (6500 K, Osram L58W/865 y T5 L21W/865) y a una temperatura de 22 ± 1 °C (Fadón et al., 2018b) (Figura 2C).

Para determinar la fecha de salida de endodormancia se tuvo en cuenta el crecimiento y desarrollo fenológico de las yemas. En cada día de muestreo y variedad, se registró el estado fenológico de todas las yemas de cada vareta y se pesaron 10 yemas seleccionadas al azar al inicio (día 0) y al final (día 8) del periodo en la cámara de crecimiento. La fecha de salida de endodormancia se estableció cuando el peso de las yemas florales aumentó al menos un 30% después de los 8 días en la cámara (Fadón et al., 2018b; Ruiz et al., 2018) (Figura 2D).

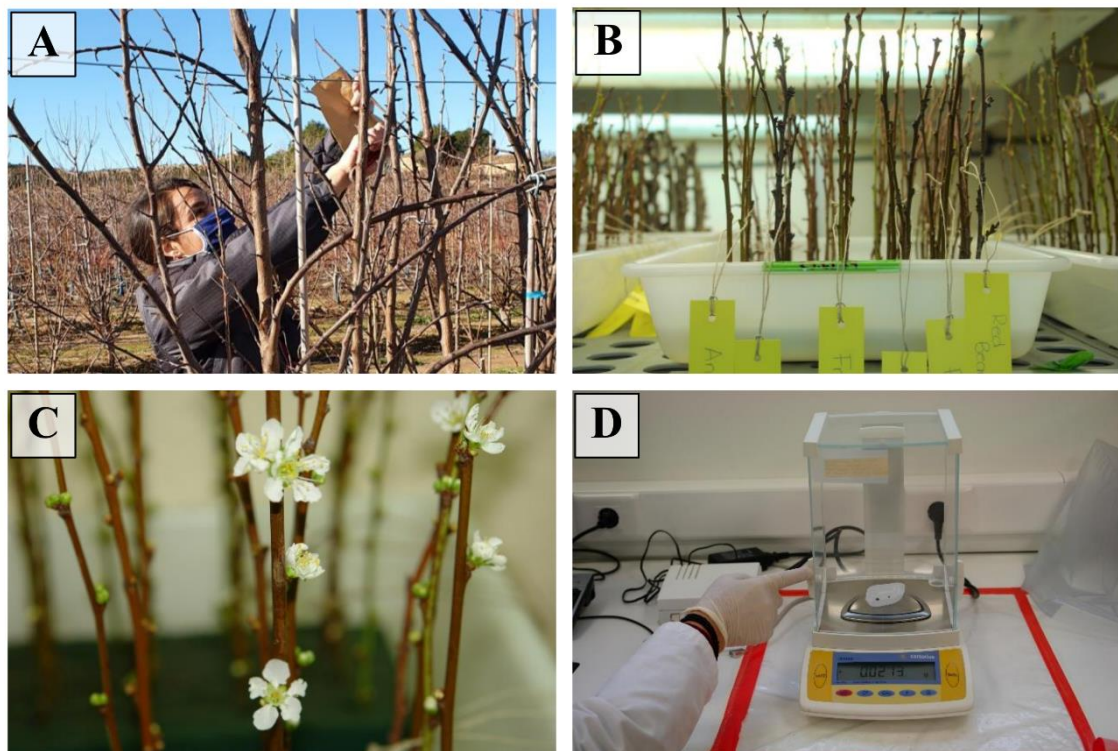


Figura 2. Determinación del fin de la endodormancia en ciruelo de tipo japonés. Muestreo de varetas en campo (A), varetas en bandejas con agua en cámara con condiciones controladas de temperatura (B), apariencia de las varetas tras 8 días en cámara (C) y evaluación de la fenología y pesado de yemas (D).

Estimación de las necesidades de frío

Para la estimación de las necesidades de frío se utilizaron datos semi-horarios de temperatura registrados en estaciones situadas en cada colección: la estación BA205-La Orden de la Red de Asesoramiento al Regante de Extremadura en Guadajira (REDAREX, 2021), las estaciones 38 (Caspe) y 31 (Épila) de la Oficina del Regante de Aragón (ORESA, 2021). En Zaragoza, los datos semi-horarios de temperatura se obtuvieron de Data Loggers HOBO Pendant Temp/Alarm (onset-HOBO, EEUU) colocados en las diferentes parcelas y cuyos datos se descargaron periódicamente con el software HOBOWare versión 3.7.20 (Onset Computer Corporation, EEUU). La acumulación de frío desde el 1 de octubre hasta la fecha de salida de endodormancia en cada accesión se cuantificó siguiendo los tres modelos más usados en árboles frutales (Campoy et al., 2011; Fadón et al., 2020b). El modelo de Weinberger establece que una hora Frío (HF) corresponde a una hora entre 0 y 7,2 °C (Weinberger, 1950). El modelo de Utah propone que una unidad frío (UF) corresponde a una hora entre 2,5 y 9,1 °C, 0,5 UF corresponde a una hora en dos rangos: de 1,5 a 2,4 °C y de 9,2 a 12,4 °C, mientras que la acumulación de UF es nula a temperaturas menores que 1,4 °C y entre 12,5-15,9 °C, y negativa para temperaturas iguales o mayores a 16 °C (Richardson et al., 1974). El modelo dinámico considera que la acumulación de frío ocurre en un proceso de dos fases, en el que temperaturas cálidas pueden anular el efecto de temperaturas frías previas, y se expresa en porciones frío (PF) (Fishman et al., 1987).

Estimación de las necesidades de calor

Las necesidades de calor se determinaron utilizando el modelo propuesto por Richardson et al. (1974), mediante la suma de *Growing degree hours* (GDH) acumuladas desde el fin de la endodormancia hasta la plena floración (F50). Una GDH se define como

1 hora a 1 °C por encima de la temperatura base de 4,5 °C. Las GDH se calculan restando 4,5 °C a cada temperatura horaria entre 4,5 °C y 25°C. Todas las temperaturas superiores a 25°C se consideran de efecto igual a 25 °C, por lo que la mayor acumulación para cualquier hora es 20,5 GDH °C (Richardson et al., 1974).

Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de desarrollo integrado RStudio versión 1.2.5033 (RStudio-Team, 2020) para el lenguaje de programación R versión 3.6.3 (R Core Team, 2021).

Para determinar el efecto de los factores “accesión” y “año” en cada variable (HF, UF, PF, GDH, fecha de final de endodormancia y fecha de plena floración), se realizó un ANOVA de dos vías en aquellas accesiones con al menos dos años de ensayos.

Para analizar el efecto de la localización sobre las necesidades agroclimáticas, se seleccionaron las accesiones con ensayos en dos localizaciones y se dividieron en tres subgrupos: accesiones coincidentes en Guadajira y Caspe (n=9), en Guadajira y Zaragoza (n=8), y en Guadajira y La Almunia (n=4). Para cada subgrupo se realizó un ANOVA de una vía, con excepción de las variables ‘fecha de plena floración (F50)’ y ‘necesidades de calor’ del subgrupo Guadajira-La Almunia, ya que en la localización de La Almunia sólo se registraron datos de un año (2020).

Las correlaciones entre las variables HF, UF, PF, GDH, fecha de final de endodormancia y fecha de plena floración se calcularon mediante la prueba de correlación de Pearson en las localizaciones con datos de varios años (Caspe, Guadajira y Zaragoza).

En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad, mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y de homocedasticidad, mediante las pruebas de Barlett, Levene y ncVST (non-constant Variance Score Test), así como en los gráficos de los residuales para cada ANOVA.

RESULTADOS

Acumulación de frío

La acumulación de frío presentó grandes variaciones entre localizaciones, años y modelos. En todos los casos se inició entre la segunda mitad de octubre y la primera semana de noviembre. Como ejemplo, en el invierno de 2019-2020, las PF y HF comenzaron a acumularse en las cuatro localidades en la segunda semana de octubre, y las UF a partir de la primera semana de noviembre. Según los tres modelos, se acumuló más frío y de forma más rápida en Zaragoza (1.101 HF, 1.285 UF y 65 PF, 31 de enero 2020), mientras que el invierno más cálido tuvo lugar en Guadajira (538 HF; 888 UF; 53 PF; 31 de enero 2020). En Caspe y La Almunia de Doña Godina, la acumulación de frío siguió un patrón similar en HF y PF, aunque se acumularon más UF en Caspe que en La Almunia (Figura 3).

Según el modelo PF, en Zaragoza y La Almunia el invierno más frío fue 2020-2021 y el más cálido 2017-2018. En Caspe, el invierno de 2018-2019 fue más frío que los otros dos años (2017-2018, 2019-2020). En Guadajira, la acumulación de frío fue similar en los dos inviernos (2019-2020, 2020-2021), con 66 PF acumuladas a 31 de enero (Figura 4).

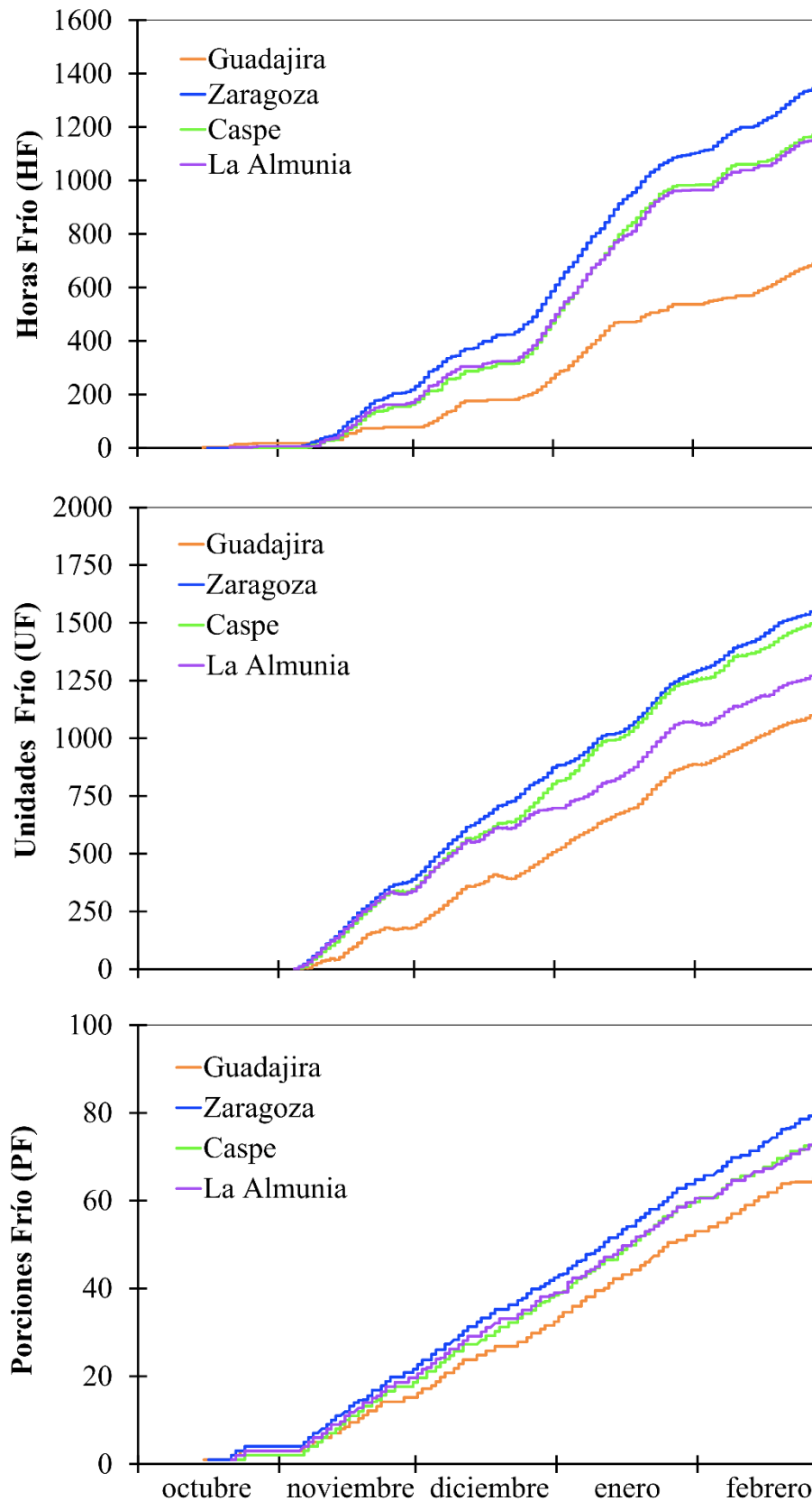


Figura 3. Acumulación de frío en el invierno 2019-2020. Acumulación de frío en cuatro localidades (Guadajira, Zaragoza, Caspe y La Almunia) según tres modelos (horas frío, unidades frío y porciones frío).

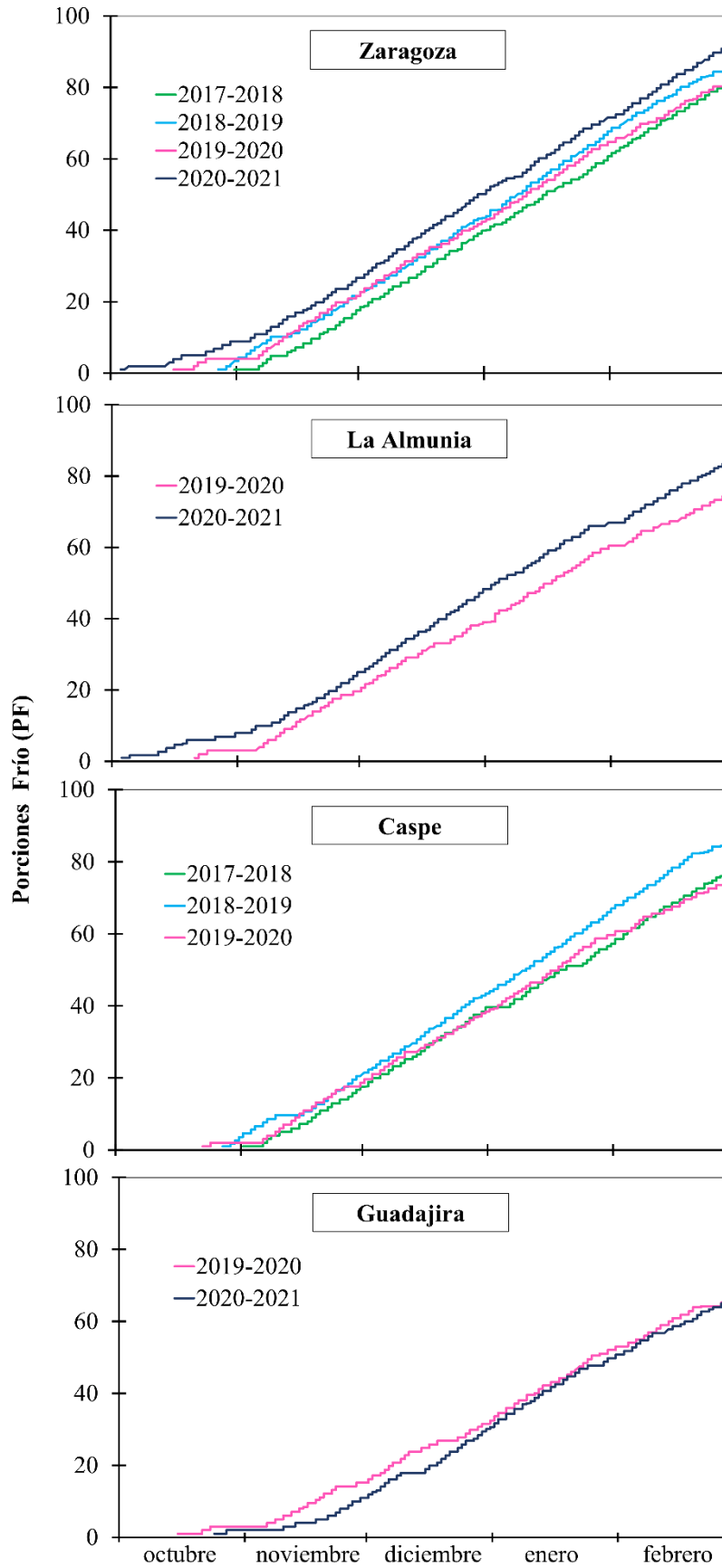


Figura 4. Acumulación de frío según el modelo Dinámico (porciones de frío) en cuatro localidades durante dos inviernos.

Fin de la endodormancia

La evaluación del peso y la fenología de las yemas florales en cada variedad permitió caracterizar su crecimiento a lo largo del reposo. Al inicio del invierno el peso medio de 10 yemas fue de aproximadamente 0,02 g en todas las accesiones y se mantuvo sin variaciones significativas durante noviembre y diciembre. El peso aumentó hasta 0,25 g durante el desborre (Figura 5), con el cambio de estado fenológico de ‘A’ a ‘B’ (Baggiolini, 1952) (Figura 6).

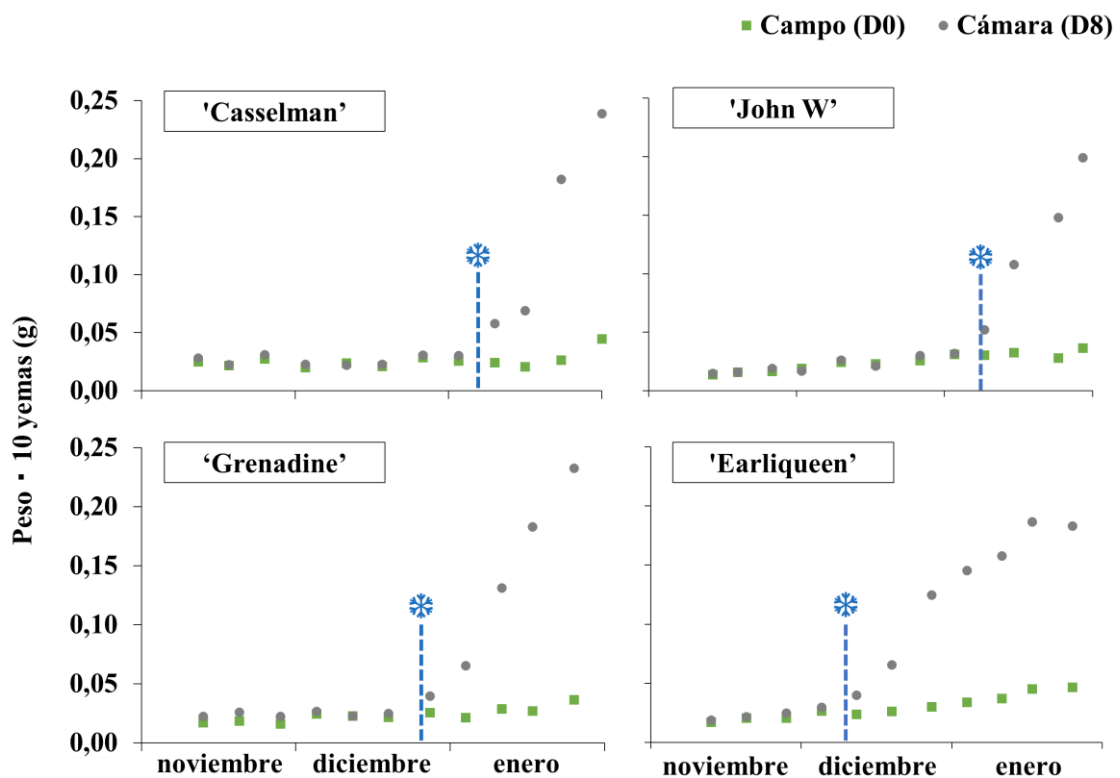


Figura 5. Crecimiento de las yemas florales en cuatro variedades de ciruelo de tipo japonés de noviembre a enero. La salida de la endodormancia (*) se corresponde con un aumento del 30% de peso de las yemas después de 8 días en cámara con condiciones controladas de temperatura.

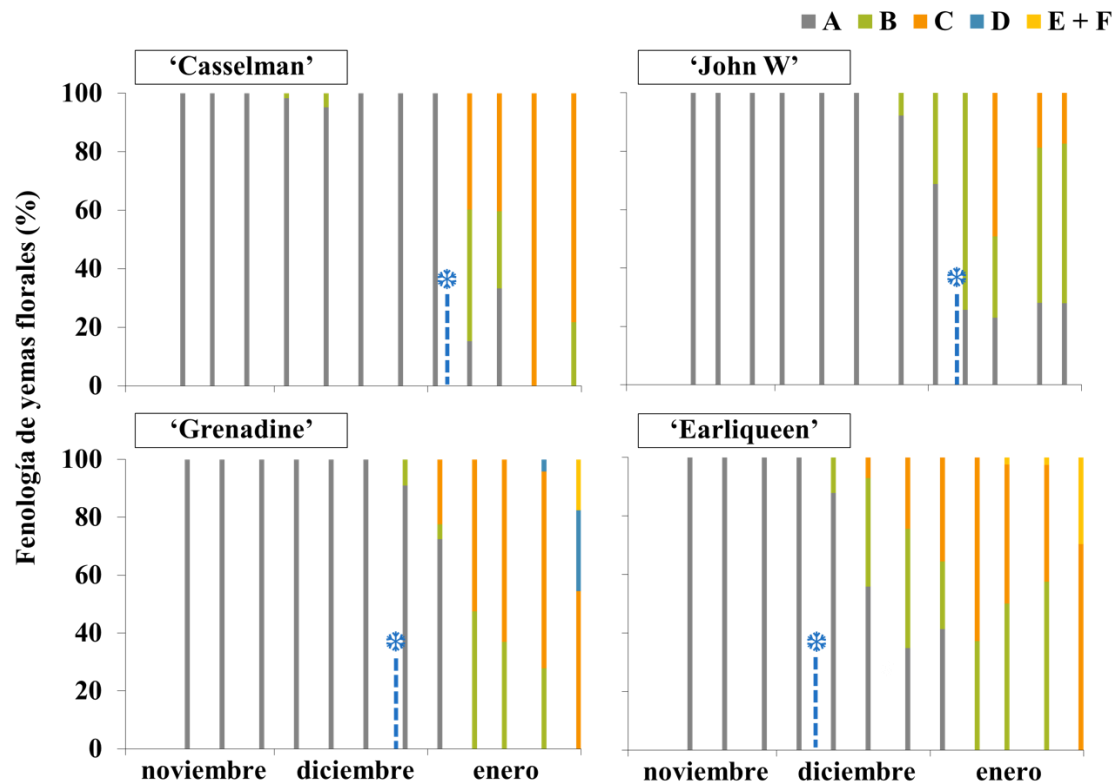


Figura 6. Crecimiento de las yemas florales en cuatro variedades de ciruelo japonés de noviembre a enero. La salida de la endodormancia (*) se corresponde con un aumento del 30% de peso de las yemas después de 8 días en cámara con condiciones controladas de temperatura.

Las fechas del final de la endodormancia presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) no sólo entre accesiones sino también entre años para cada accesión. La accesión Crimson Kat fue la más precoz en salir de endodormancia (20 de noviembre 2019, La Almunia) y Ambra la más tardía (07 de febrero 2019, Guadajira). El final de la endodormancia ocurrió entre el 20 de noviembre y el 18 de enero en La Almunia, entre el 29 de noviembre y el 24 de enero en Caspe, entre el 2 de diciembre y el 4 de enero en Zaragoza, y entre el 7 de diciembre y el 7 de febrero en Guadajira. Las accesiones analizadas en dos localizaciones mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) de 15 a 30 días en la salida de endodormancia entre localizaciones, ocurriendo antes en Zaragoza (Caspe, La Almunia y Zaragoza) que en Badajoz (Guadajira) (Tabla 1).

Necesidades de frío

Los resultados mostraron un amplio rango de necesidades de frío en los tres modelos: 136-922 HF; 262-1.116 UF; 19,4-54,0 PF (Tabla 1), con diferencias significativas ($p < 0,001$) entre accesiones. African Rose (136 HF, 262 UF, 19 PF) y Souvenir (136 HF, 263 UF, 19 PF) fueron las accesiones con menos necesidades de frío, mientras que 'Z023' (787 HF, 907 UF, 52 PF) presentó las necesidades de frío más altas (Tabla 1). Para cada accesión se observó variabilidad en las necesidades de frío entre los años de estudio en los tres modelos, pero las diferencias sólo fueron significativas para HF ($p < 0,01$) y UF ($p < 0,001$). El modelo de Weinberger (HF) presentó mayores coeficientes de variación entre años (CV, %) que los modelos Utah (UF) y dinámico (PF). No se observaron diferencias significativas en las necesidades de frío de las accesiones entre localizaciones, con excepción de las UF de las accesiones coincidentes en Guadajira y Caspe ($p < 0,05$) y las PF en las accesiones coincidentes en Guadajira y Zaragoza ($p < 0,01$).

Las accesiones se clasificaron en cuatro grupos según sus necesidades de frío: 'necesidades bajas' (≤ 30 PF; ≤ 300 HF; ≤ 500 UF), 'necesidades medias' (31-40 PF; 301-500 HF; 501-700 UF), 'necesidades altas' (41-50 PF; 501-700 HF; 701-900 UF) y 'necesidades muy altas' (> 50 PF; > 700 HF; > 900 HF) (Tabla 2).

Tabla 1. Necesidades de frío de 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Guadajira (Badajoz) y Caspe, La Almunia y Zaragoza (Zaragoza) expresadas en horas frío, unidades frío y porciones frío. Se muestran los valores obtenidos en cada año, la media y el coeficiente de variación (CV) (%) entre años. En las variedades analizadas en varias localizaciones, se incluye el coeficiente de variación (CV) (%) entre localizaciones (en cursiva).

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
African Delight	Guadajira	2019	13-dic	176	161	13	357	304	25	23,8	20,9	20
		2020	14-dic	147			250			17,9		
African Pride	Guadajira	2019	29-dic	230	236	3	480	469	3	31,6	30,0	7
		2020	28-dic	242			458			28,4		
African Rose	Guadajira	2019	07-dic	125	136	11	276	262	8	20,8	19,4	10
		2020	12-dic	147			247			17,9		
Alpha	Guadajira	2019	20-ene	490	470	6	737	713	5	46,0	43,3	9
		2020	13-ene	451			689			40,7		
Ambra ¹	Zaragoza	2018	14-dic	306	357	20	636	637	0	31,5	32,4	4
		2019	16-dic	408			639			33,3		
	Guadajira	2019	07-feb	560	505	15	932	780	28	56,0	46,5	29
		2020	08-ene	451			627			37,0		
				<i>431</i>	<i>24</i>		<i>708</i>	<i>14</i>		<i>39</i>	<i>25</i>	
Angeleno ¹	Zaragoza	2018	12-dic	295	323	16	603	532	24	29,4	29,8	8
		2019	14-dic	384			612			32,4		
		2020	2-dic	290			382			27,7		
	Guadajira	2019	16-ene	471	378	35	684	594	21	43,2	36,9	24
		2020	31-dic	286			505			30,7		
				<i>351</i>	<i>11</i>		<i>563</i>	<i>8</i>		<i>33</i>	<i>15</i>	
Black Amber ¹	Zaragoza	2018	24-dic	448	445	15	795	696	14	39,0	37,3	14
		2019	13-dic	378			600			31,3		
		2020	19-dic	509			695			41,5		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	14-ene	469	541	19	671	689	4	42,2	42,4	1
		2020	16-ene	614			707			42,6		
					493	14		693	1		40	9
Black Beaut	Zaragoza	2017	3-ene	765	497	49	744	682	11	41,6	36	17
		2018	12-dic	295			603			29,4		
		2019	22-dic	433			700			36,3		
Black Diamond ¹	Caspe	2017	28-dic	671	451	43	691	685	7	37,6	35,5	8
		2018	21-dic	366			727			36,6		
		2019	22-dic	315			637			32,2		
	Guadajira	2019	22-ene	507	445	20	779	674	22	47,5	40,9	23
		2020	05-ene	383			569			34,3		
					448	1		680	1		38	10
Black Gold	Caspe	2017	05-dic	338	347	54	369	526	49	21,1	27,3	41
		2018	29-nov	165			383			20,5		
		2019	03-ene	539			826			40,2		
Black Satin	La Almunia	2019	05-ene	579	447	42	734	563	43	42,4	35,9	26
		2020	06-dic	315			393			29,4		
Black Splendor ¹	La Almunia	2019	28-nov	162	192	22	324	278	23	18,6	20,3	12
		2020	26-nov	221			232			21,9		
	Caspe	2017	05-dic	338	263	34	369	439	25	21,1	23,0	16
		2018	29-nov	165			383			20,5		
		2019	13-dic	287			565			27,3		
					227	22		358	32		22	9
Casselma	Zaragoza	2018	3-ene	670	657	3	930	898	5	34,8	39	16
		2019	2-ene	644			866			43,5		
Crimson Glo ¹	La Almunia	2019	28-dic	404	373	12	688	579	27	38,1	35,2	12
		2020	10-dic	343			471			32,3		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	12-ene	439	485	14	649	665	3	41,2	40,4	3
		2020	12-ene	532			681			39,7		
					429	18		622	10		38	10
Crimson Heart	La Almunia	2019	17-dic	318	305	6	593	473	36	31,1	29,3	9
		2020	04-dic	292			353			27,4		
Crimson Kat	La Almunia	2019	20-nov	132	223	58	261	327	29	14,0	21,7	50
		2020	06-dic	315			393			29,4		
Dupple Jack	La Almunia	2019	23-dic	327	429	34	624	675	11	34,1	38,7	17
		2020	25-dic	531			725			43,3		
Earliqueen ¹	La Almunia	2019	07-dic	263	277	7	472	412	20	25,2	26,3	6
		2020	04-dic	292			353			27,4		
	Guadajira	2019	06-ene	341	307	15	582	537	12	37,2	33,6	15
		2020	30-dic	274			493			30,1		
					292	7		475	19		30	17
Ebony 1	Guadajira	2019	01-ene	276	226	31	517	437	26	33,6	28,7	24
		2020	21-dic	176			357			23,8		
Ebony 51	Guadajira	2019	19-ene	474	524	13	715	705	2	45,2	42,9	8
		2020	14-ene	573			695			40,7		
Ebony 55	Guadajira	2019	01-feb	538	576	9	885	796	16	53,1	47,8	16
		2020	16-ene	614			707			42,6		
Ebony 61	Guadajira	2020	20-dic	163			338			25,8		
Ebony 114	Guadajira	2019	30-ene	538	599	14	883	826	10	52,0	49,9	6
		2020	24-ene	660			769			47,8		
Ebony 118	Guadajira	2019	05-ene	324	323	1	571	554	4	35,9	34,4	6
		2020	02-ene	321			537			32,8		
Ebony 122	Guadajira	2019	18-ene	471	326	63	699	535	43	44,2	34,0	42
		2020	22-dic	182			372			23,8		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
Ebony Rose	La Almunia	2019	16-dic	315	303	5	580	467	34	31,1	29,3	9
		2020	04-dic	292			353			27,4		
Fall Fiesta	La Almunia	2019	17-ene	799	679	25	863	813	9	50,8	48,0	8
		2020	27-dic	560			763			45,2		
Festival Red	La Almunia	2019	20-dic	325	380	20	612	606	1	33,1	36,0	11
		2020	19-dic	435			600			38,9		
Flavor Fall	La Almunia	2019	22-dic	325	320	2	611	502	31	33,1	31,3	8
		2020	06-dic	315			393			29,4		
Flavor Fusion	La Almunia	2019	15-dic	305	406	35	561	631	16	30,1	36,2	24
		2020	24-dic	507			702			42,4		
Fortune ¹	Zaragoza	2018	12-dic	295	358	16	603	582	8	29,4	32,1	8
		2019	14-dic	384			612			32,4		
		2020	10-dic	397			532			34,6		
	Guadajira	2019	15-ene	471	501	9	676	679	0,5	43,2	41,4	6
		2020	12-ene	532			681			39,7		
					430	24		630	11		37	18
Freedom ¹	Caspe	2017	11-dic	406	411	30	435	634	31	25,2	33	23
		2018	16-dic	289			641			34,5		
		2019	03-ene	539			826			40,2		
	Guadajira	2019	11-ene	421	486	19	641	665	5	40,0	40,4	1
		2020	13-ene	551			689			40,7		
					448	12		649	3		37	14
Friar	Guadajira	2019	11-ene	421	540	31	641	684	9	40,0	42,4	8
		2020	19-ene	660			728			44,8		
Frontier	Zaragoza	2018	12-dic	295	441	13	603	641	8	29,4	32	13
		2019	19-dic	431			679			35,3		
Glory Red	La Almunia	2019	12-dic	305	406	35	557	629	16	29,1	35,7	26
		2020	24-dic	507			702			42,4		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
Golden Globe ¹	Caspe	2017	04-ene	708	851	15	742	1.030	24	39,6	50,8	19
		2018	18-ene	896			1.174			56,4		
		2019	24-ene	950			1.176			56,3		
	Guadajira	2019	29-ene	538	599	14	875	801	13	52,0	48,4	11
		2020	19-ene	660			728			44,8		
					725	25		916	18		50	3
Golden Japan ¹	Zaragoza	2018	27-dic	520	565	16	867	812	12	41,0	42	4
		2019	03-ene	668			875			44,5		
		2020	19-dic	509			695			41,5		
	Guadajira	2019	20-ene	490	520	8	737	713	5	46,0	43	9
		2020	13-ene	550			689			40,7		
					543	6		762	9		43	2
Golden Kiss	Guadajira	2019	11-ene	421	347	30	641	567	18	40,0	35,1	20
		2020	30-dic	274			493			30,1		
Golden Plumza ¹	Caspe	2017	08-ene	771	632	26	815	860	9	41,8	42	6
		2018	25-dic	451			816			39,6		
		2019	09-ene	674			949			44,7		
	Guadajira	2019	23-ene	507	583	19	798	774	4	48,5	47,6	3
		2020	22-ene	660			751			46,8		
					608	6		817	7		45	9
Green Sun	Caspe	2017	21-dic	545	441	22	591	695	15	32,5	35,4	9
		2018	24-dic	427			792			38,6		
		2019	26-dic	351			702			35,1		
Grenadine	La Almunia	2019	22-dic	325	416	31	611	656	10	33,1	37,7	17
		2020	24-dic	507			702			42,4		
Hiromi Red ¹	La Almunia	2019	04-ene	563	535	7	727	714	3	42,4	42,4	0
		2020	24-dic	507			702			42,4		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	22-ene	507	519	3	779	730	10	47,5	43,6	13
		2020	12-ene	532			681			39,7		
					527	2		722	2		43	2
Honey Crisp	La Almunia	2019	22-dic	325	343	7	611	467	44	33,1	34,2	5
		2020	14-dic	361			323			35,3		
Honey Down	La Almunia	2019	13-dic	305	303	1	550	460	28	29,1	28,7	2
		2020	05-dic	302			371			28,4		
Honey Moon	La Almunia	2019	19-dic	325	335	4	612	549	16	33,1	33,2	0
		2020	11-dic	345			487			33,3		
Honey Punch	La Almunia	2019	13-dic	305	298	3	550	451	31	29,1	28,3	4
		2020	04-dic	292			353			27,4		
Honey Star	La Almunia	2019	20-dic	325	363	15	612	591	5	33,1	35,0	8
		2020	17-dic	402			570			36,9		
Honey Sweet	La Almunia	2019	27-dic	384	440	18	679	680	0	37,1	39,5	8
		2020	23-dic	497			680			41,8		
Howard Sun	Caspe	2017	30-dic	688	639	7	717	849	14	38,4	41,8	8
		2018	02-ene	628			949			44,6		
		2019	06-ene	602			883			42,5		
Joanna Red ¹	La Almunia	2019	07-ene	627	588	9	746	747	0	43,9	44,0	0
		2020	26-dic	550			749			44,1		
	Guadajira	2019	15-ene	471	439	10	676	629	11	43,2	39,5	13
		2020	06-ene	406			583			35,7		
					513	21		688	12		42	8
John W ¹	Caspe	2017	05-dic	338	411	31	369	636	38	21,1	32	32
		2018	19-dic	338			694			34,5		
		2019	04-ene	558			846			41,3		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	22-ene	507	456	16	779	681	20	47,8	41,7	20
		2020	06-ene	406			583			35,7		
					434	7		659	5		37	18
Kelsey	Guadajira	2019	21-ene	499			756			46,5		
Laetitia ¹	Caspe	2017	21-dic	545	407	35	591	642	16	32,5	33	13
		2018	12-dic	258			572			28,8		
		2019	29-dic	419			763			37,1		
	Guadajira	2019	17-ene	471	378	35	695	600	22	44,2	37,4	26
		2020	31-dic	286			505			30,7		
					393	5		621	5		35	9
Laroda	Zaragoza	2018	20-dic	385	408	8	731	708	5	36,0	36	2
		2019	20-dic	431			684			35,2		
Larry Ann	Guadajira	2019	17-ene	471	501	14	695	688	14	44,2	41,9	14
		2020	12-ene	532			681			39,7		
Late Blue	La Almunia	2019	24-dic	340	540	52	640	790	27	35,1	43,7	28
		2020	06-ene	740			940			52,2		
Methley	Guadajira	2019	05-ene	324	354	12	571	570	0	35,9	35,1	3
		2020	05-ene	383			569			34,3		
Nubiana	Zaragoza	2018	26-dic	496	591	23	843	863	3	27,4	36	35
		2019	4-ene	686			884			45,2		
Owen T ¹	Caspe	2017	31-dic	700	531	29	735	780	9	39,6	39	6
		2018	27-dic	499			864			41,2		
		2019	28-dic	395			741			36,8		
	Guadajira	2019	26-ene	528	551	6	850	772	14	50,5	45,6	15
		2020	14-ene	573			695			40,7		
					541	3		776	1		42	11
Plum Late	Guadajira	2019	18-ene	471	461	3	699	663	8	44,2	40,6	13
		2020	08-ene	451			627			37,0		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
Prime Time	Guadajira	2019	22-ene	507	529	6	779	734	9	47,5	44,1	11
		2020	13-ene	551			689			40,7		
Queen Ann	Zaragoza	2018	13-dic	305	369	25	624	659	8	30,5	33	12
		2019	21-dic	433			695			36,3		
Queen Rosa	Zaragoza	2018	23-dic	430	437	2	774	744	6	37,9	38	1
		2019	23-dic	444			715			37,3		
Red Beaut ¹	Zaragoza	2017	26-dic	685	420	44	632	569	22	36,4	32	11
		2018	14-dic	306			635			31,5		
		2019	15-dic	399			626			33,3		
		2020	02-dic	290			382			27,7		
	Guadajira	2019	12-ene	439	433	2	649	627	5	41	38	10
		2020	07-ene	427			606			36		
				426	2		598	7		35	13	
Royal Diamond	Guadajira	2019	30-ene	538	599	14	883	805	14	52,0	48,4	11
		2020	19-ene	660			728			44,8		
Ruby Star	Guadajira	2019	22-ene	507	551	11	779	740	8	47,5	44,6	9
		2020	15-ene	596			700			41,8		
Ruby Sun	La Almunia	2019	06-dic	248			458			24,2		
Santa Rosa ¹	Zaragoza	2018	27-dic	520	529	7	867	807	6	41,0	41,6	5
		2019	27-dic	500			773			39,9		
		2020	23-dic	568			782			43,9		
	Guadajira	2019	15-ene	471	427	15	676	623	12	43,2	38,7	16
		2020	05-ene	383			569			34,3		
				478	15		715	18		40	5	
Sapphire	Guadajira	2019	24-dic	189	297	52	415	499	24	27,8	31,8	18
		2020	06-ene	406			583			35,7		
Showtime	Guadajira	2019	17-ene	471	427	15	695	632	14	44,2	39,2	18
		2020	05-ene	383			569			34,3		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
Simka	Zaragoza	2018	21-dic	400	441	13	741	753	2	37,0	38	5
		2019	26-dic	483			765			39,9		
Songold ¹	Zaragoza	2017	14-dic	504	519	27	480	695	29	26,7	35,7	25
		2018	20-dic	385			731			36,0		
		2019	3-ene	668			875			44,5		
	Guadajira	2019	18-ene	471	522	14	699	697	0,4	44,2	42,4	6
		2020	14-ene	573			695			40,7		
				520	0		696	0		39	12	
Souvenir	Guadajira	2019	07-dic	125	136	11	276	263	7	20,8	19,4	10
		2020	14-dic	147			250			17,9		
Sundew	Guadajira	2019	20-dic	180	185	4	398	399	0	26,8	26,3	3
		2020	24-dic	191			400			25,8		
Sunkiss	Guadajira	2019	15-ene	471	449	7	676	641	8	43,2	39,5	13
		2020	07-ene	427			606			35,7		
Sweet Blaze	La Almunia	2019	05-dic	235	228	4	441	341	41	23,9	22,9	6
		2020	27-nov	221			242			21,9		
Sweet Pixie	La Almunia	2019	03-ene	547	539	2	710	718	1	41,4	42,4	3
		2020	25-dic	531			725			43,3		
Tasty Sweet	La Almunia	2019	16-dic	315	387	26	580	610	7	31,1	35,5	17
		2020	21-dic	459			640			39,9		
TC Sun ¹	Caspe	2017	11-ene	822	748	12	866	944	9	44,9	46	7
		2018	10-ene	773			1.039			50,3		
		2019	08-ene	650			928			44,0		
	Guadajira	2019	05-feb	552	606	13	912	824	15	55,0	49,9	15
		2020	20-ene	660			736			44,8		
				677	15		884	10		48	5	

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
Zanzi Sun	Caspe	2017	12-ene	836	734	25	886	940	10	45,0	46,1	10
		2018	28-dic	521			888			42,2		
		2019	18-ene	844			1.047			51,0		
606 ¹	Caspe	2017	18-dic	490	382	25	558	629	12	24,5	30	18
		2018	20-dic	352			712			35,3		
		2019	18-dic	305			618			30,3		
	Guadajira	2019	22-ene	507	390	42	779	636	32	47,5	38,8	32
		2020	30-dic	274			493			30,1		
					386	1		632	1		34	18
1515	Caspe	2017	16-dic	466	341	34	521	575	12	28,5	30,2	9
		2018	11-dic	240			552			28,8		
		2019	23-dic	316			650			33,2		
1516	Caspe	2017	14-dic	449	453	23	484	681	27	26,5	34,4	22
		2018	20-dic	352			712			35,3		
		2019	04-ene	558			846			41,3		
1526	Caspe	2017	28-dic	671	409	55	691	621	10	37,6	31,8	17
		2018	14-dic	270			606			30,7		
		2019	13-dic	287			565			27,3		
A001	Caspe	2017	11-ene	822	756	10	866	951	9	44,9	46,6	7
		2018	10-ene	773			1.039			50,3		
		2019	09-ene	674			949			44,7		
A002	Caspe	2017	21-dic	545	447	22	591	695	14	32,5	35,2	7
		2018	20-dic	352			712			35,3		
		2019	30-dic	443			781			37,7		
A003	Caspe	2017	19-ene	921	922	3	998	1.116	9	50,1	54,0	6
		2018	18-ene	896			1.174			56,4		
		2019	24-ene	950			1.176			55,4		

Accesiones	Localización	Año	Fecha fin de endo-dormancia	Necesidades de frío								
				Horas frío			Unidades frío			Porciones frío		
				Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV
A004	Caspe	2017	14-ene	876	920	4	924	1.103	14	47,2	46,0	22
		2018	20-ene	934			1.209			35,3		
		2019	24-ene	950			1.176			55,4		
Z009	La Almunia	2019	28-dic	404	348	23	688	520	46	38,1	32,8	23
		2020	04-dic	292			353			27,4		
Z010	La Almunia	2019	15-dic	305	353	20	561	565	1	30,1	33,5	14
		2020	17-dic	402			570			36,9		
Z012	La Almunia	2019	10-ene	687	536	40	791	675	24	46,2	41,2	17
		2020	16-dic	386			559			36,3		
Z020	La Almunia	2019	27-dic	384	440	18	679	680	0	37,1	39,5	8
		2020	23-dic	497			680			41,8		
Z022	La Almunia	2019	30-dic	452	384	25	693	543	39	38,5	33,9	19
		2020	06-dic	315			393			29,4		
Z023	La Almunia	2019	18-ene	811	787	4	875	907	5	51,8	52,0	1
		2020	07-ene	764			940			52,3		
Z027	La Almunia	2019	17-ene	799	704	19	863	854	1	50,8	49,5	4
		2020	31-dic	609			846			48,3		

ANOVA					
Factor					
Accesión	F	6,51	5,37	6,34	3,62
	p-value	<2 ⁻¹⁶ ***	<2 ⁻¹⁶ ***	<2 ⁻¹⁶ ***	1,8 ⁻¹¹ ***
Año	F	7,25	7,91	13,03	2,04
	p-value	0,008**	0,006**	4,0 ⁻⁰⁴ ***	0,16 ns
Localización	F	25,74	0,001	4,18	1,85
(Guadajira-Caspe)	p-value	1,4 ⁻⁰⁵ ***	0,97 ns	0,05*	0,18 ns
Localización	F	14,99	0,01	0,18	0,50
(Guadajira-La Almunia)	p-value	1,0 ⁻⁰³ ***	0,91 ns	0,67 ns	0,49 ns
Localización	F	85,60	1,95	0,86	8,70
(Guadajira-Zaragoza)	p-value	2,7 ⁻¹⁰ ***	0,17 ns	0,35 ns	0,01**

Diferencias significativas: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns = no significativo.

¹: Accesiones analizadas en dos localizaciones.

Tabla 2. Clasificación de 95 accesiones de ciruelo japonés según sus necesidades de frío en porciones frío (PF), horas frío (HF) y unidades frío (UF).

Clasificación	Rango	Accesiones		
Necesidades bajas	≤30 PF ≤300 HF ≤500 UF	African Delight	Crimson Kat	Honey Punch
		African Pride	Earliqueen	Ruby Sun
		African Rose	Ebony 1	Souvenir
		Black Gold	Ebony 61	Sundew
		Black Splendor	Ebony Rose	Sweet Blaze
		Crimson Heart	Honey Down	1515
Necesidades medias	31-40 PF 301-500 HF 501-700 UF	Ambra	Frontier	Red Beaut
		Angeleno	Glory Red	Santa Rosa
		Black Amber	Golden Kiss	Sapphire
		Black Beaut	Green Sun	Showtime
		Black Diamond	Grenadine	Simka
		Black Satin	Honey Crisp	Songold
		Casselman	Honey Moon	Sunkiss
		Crimson Glo	Honey Star	Tasty Sweet
		Durple Jack	Honey Sweet	606
		Ebony 118	John W	1516
		Ebony 122	Laetitia	1526
		Festival Red	Laroda	A002
		Flavor Fall	Methley	Z009
		Flavor Fusion	Nubiana	Z010
Fortune	Queen Ann	Z020		
Freedom	Queen Rosa	Z022		
Necesidades altas	41-50 PF 501-700 HF 701-900 UF	Alpha	Hiromi Red	Royal Diamond
		Ebony 51	Howard Sun	Ruby Star
		Ebony 55	Joanna Red	Sweet Pixie
		Ebony 114	Kelsey	TC Sun
		Fall Fiesta	Larry Ann	Zanzi Sun
		Friar	Late Blue	A001
		Golden Globe	Owen T	A004
		Golden Japan	Plum Late	Z012
Golden Plumza	Prime Time	Z027		
Necesidades muy altas	>50 PF >700 HF >900UF	1514		
		Z023		

Fechas de floración

Las fechas de plena floración (F50) presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre accesiones y años, oscilando entre el 13 de febrero de 2019 para la accesión más temprana (African Rose) y el 16 de marzo de 2019 para las más tardías (Ebony 55, Ebony 122, Golden Plumza, Kelsey). La floración fue más corta en Caspe (del 24 de febrero al 11 de marzo), Zaragoza (del 24 de febrero al 14 de marzo) y La Almunia (del 16 de febrero al 5 de marzo) que en Guadajira (del 13 de febrero al 16 de marzo). Sin embargo, en las accesiones analizadas en dos localizaciones no se observaron diferencias significativas entre localizaciones (Tabla 3).

Necesidades de calor

Las necesidades de calor mostraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre accesiones, oscilando entre 3.975 ('Z027') y 10.167 GDH ('Crimson Kat'), y entre años para cada accesión ($p < 0,05$) (Tabla 3). Las necesidades de calor de las accesiones analizadas en dos localizaciones presentaron diferencias significativas entre localizaciones [Guadajira-Caspe ($p < 0,001$) y Guadajira-Zaragoza ($p < 0,01$)]. Las accesiones se clasificaron en tres grupos según sus necesidades de calor en: 'necesidades bajas' (≤ 6.000 GDH), 'necesidades medias' (6.001-7.000 GDH) y 'necesidades altas' (> 7.000 GDH) (Tabla 4).

Tabla 3 Necesidades de calor de 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Guadajira(Badajoz) y Caspe, La Almunia y Zaragoza (Zaragoza) en *Growing degree hours*. Se muestran los valores obtenidos en cada año, la media y el coeficiente de variación (CV) (%) entre años. En las variedades analizadas en varias localizaciones se incluye el coeficiente de variación (CV) (%) entre localizaciones (en cursiva).

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				Valor	Media	CV
African Delight	Guadajira	2019	28-feb	10.783	9.536	18
		2020	23-feb	8.289		
African Pride	Guadajira	2019	04-mar	9.032	7.907	20
		2020	23-feb	6.783		
African Rose	Guadajira	2019	13-feb	9.211	8.971	4
		2020	17-feb	8.731		
Alpha	Guadajira	2019	09-mar	8.007	8.697	11
		2020	09-mar	9.386		
Ambra ¹	Zaragoza	2018	01-mar	5.829	6.274	10
		2019	25-feb	6.720		
	Guadajira	2019	04-mar	4.343	5.987	39
		2020	02-mar	7.630		
				<i>6.130</i>	<i>3</i>	
Angeleno ¹	Zaragoza	2018	04-mar	6.646	7.398	13
		2019	04-mar	8.450		
		2020	26-feb	7.096		
	Guadajira	2019	04-mar	7.644	7.722	1
2020	02-mar	7.800				
				<i>7.560</i>	<i>3</i>	
Black Amber ¹	Zaragoza	2018	04-mar	5.715	6.155	13
		2019	25-feb	7.067		
		2020	24-feb	5.683		
	Guadajira	2019	02-mar	7.590	7.528	1
2020	02-mar	7.466				
				<i>6.842</i>	<i>14</i>	
Black Beaut	Zaragoza	2017	14-mar	4.693	5.706	17
		2018	04-mar	6.646		
		2019	25-feb	5.779		
Black Diamond ¹	Caspe	2017	06-mar	6.571	5.999	15
		2018	06-mar	6.467		
		2019	19-feb	4.960		
	Guadajira	2019	28-feb	5.899	6.192	7
		2020	23-feb	6.486		
				<i>6.096</i>	<i>2</i>	
Black Gold	Caspe	2017	26-feb	7.140	6.308	25
		2018	27-feb	7.282		
		2019	19-feb	4.503		
Black Satin	La Almunia	2019	02-mar	6.716		
Black Splendor ¹	La Almunia	2019	20-feb	8.822		

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				<i>Growing degree hours</i>		
				Valor	Media	CV
	Caspe	2017	26-feb	7.140	6.982	6
		2018	27-feb	7.284		
		2019	19-feb	6.522		
					7.902	6
Casselman	Zaragoza	2018	04-mar	5.521	6.197	15
		2019	04-mar	6.872		
Crimson Glo ¹	La Almunia	2019	22-feb	5.338	8.775	10
	Guadajira	2019	04-mar	8.131		
		2020	09-mar	9.418		
					7.056	10
Crimson Heart	La Almunia	2019	18-feb	6.405		
Crimson Kat	La Almunia	2019	20-feb	10.167		
Dapple Jack	La Almunia	2019	20-feb	5.435		
Earliqueen ¹	La Almunia	2019	18-feb	7.794	7.039	7
	Guadajira	2019	28-feb	7.399		
		2020	23-feb	6.678		
					7.416	7
Ebony 1	Guadajira	2019	28-feb	7.762	8.185	7
		2020	02-mar	8.608		
Ebony 51	Guadajira	2019	09-mar	8.053	8.717	11
		2020	09-mar	9.380		
Ebony 55	Guadajira	2019	16-mar	7.798	7.632	3
		2020	02-mar	7.466		
Ebony 61	Guadajira	2020	23-feb	7.499		
Ebony 114	Guadajira	2019	12-mar	7.525	6.959	12
		2020	02-mar	6.392		
Ebony 118	Guadajira	2019	26-feb	7.127	6.835	6
		2020	23-feb	6.542		
Ebony 122	Guadajira	2019	16-mar	9.722	9.102	10
		2020	02-mar	8.481		
Ebony Rose	La Almunia	2019	16-feb	6.261		
Fall Fiesta	La Almunia	2019	02-mar	6.202		
Festival Red	La Almunia	2019	18-feb	5.852		
Flavor Fall	La Almunia	2019	20-feb	5.577		
Flavor Fusion	La Almunia	2019	18-feb	6.644		
Fortune ¹	Zaragoza	2018	04-mar	6.646	6.645	4
		2019	25-feb	6.929		
		2020	24-feb	6.359		
	Guadajira	2019	02-mar	7.400	7.476	1
		2020	02-mar	7.553		
					7.061	8
Freedom ¹	Caspe	2017	06-mar	6.820	5.745	16
		2018	27-feb	5.320		
		2019	24-feb	5.096		

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				<i>Growing degree hours</i>		
				Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	02-mar	7.755	7.638	2
		2020	02-mar	7.521		
					6.692	20
Friar	Guadajira	2019	06-mar	8.572	7.924	12
		2020	02-mar	7.276		
Frontier	Zaragoza	2018	04-mar	6.646	7.924	13
		2019	25-feb	6.337		
Glory Red	La Almunia	2019	16-feb	7.024		
Golden Globe ¹	Caspe	2017	11-mar	6.250	5.674	19
		2018	11-mar	6.321		
		2019	24-feb	4.450		
	Guadajira	2019	12-mar	7.706	8.424	12
		2020	09-mar	9.141		
					7.049	28
Golden Japan ¹	Zaragoza	2018	08-mar	6.255	6.512	5
		2019	04-mar	6.867		
		2020	02-mar	6.413		
	Guadajira	2019	09-mar	8.007	8.362	6
		2020	09-mar	8.716		
					7.437	18
Golden Kiss	Guadajira	2019	02-mar	7.755	7.217	11
		2020	23-feb	6.678		
Golden Plumza ¹	Caspe	2017	06-mar	5.116	5.493	13
		2018	06-mar	6.315		
		2019	24-feb	5.049		
	Guadajira	2019	16-mar	9.275	8.003	22
		2020	02-mar	6.730		
					6.748	26
Green Sun	Caspe	2017	26-feb	5.995	5.931	23
		2018	11-mar	7.274		
		2019	19-feb	4.523		
Grenadine	La Almunia	2019	20-feb	5.577		
Hiromi Red ¹	La Almunia	2019	25-feb	5.708		
	Guadajira	2019	09-mar	7.842	8.630	13
		2020	09-mar	9.418		
					7.169	13
Honey Crisp	La Almunia	2019	20-feb	5.577		
Honey Down	La Almunia	2019	16-feb	6.745		
Honey Moon	La Almunia	2019	16-feb	5.787		
Honey Punch	La Almunia	2019	18-feb	7.037		
Honey Star	La Almunia	2019	16-feb	5.559		
Honey Sweet	La Almunia	2019	20-feb	5.111		
Howard Sun	Caspe	2017	06-mar	6.304	5.837	12
		2018	06-mar	6.157		
		2019	24-feb	5.050		

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				<i>Growing degree hours</i>		
				Valor	Media	CV
Joanna Red ¹	La Almunia	2019	20-feb	4.949		
	Guadajira	2019	04-mar	7.827	7.743	2
		2020	02-mar	7.660		
					6.346	2
John W ¹	Caspe	2017	11-mar	8.838	7.322	23
		2018	11-mar	7.559		
		2019	27-feb	5.568		
	Guadajira	2019	06-mar	7.356	8.440	18
		2020	09-mar	9.525		
					7.881	10
Kelsey	Guadajira	2019	16-mar	9.471		
Laetitia ¹	Caspe	2017	06-mar	6.820	6.157	15
		2018	03-mar	6.555		
		2019	24-feb	5.096		
	Guadajira	2019	04-mar	7.493	7.647	3
		2020	02-mar	7.800		
					6.902	15
Laroda	Zaragoza	2018	04-mar	5.955	6.807	18
		2019	04-mar	7.658		
Larry Ann	Guadajira	2019	04-mar	7.493	7.523	14
		2020	02-mar	7.553		
Late Blue	La Almunia	2019	26-feb	6.170		
Methley	Guadajira	2019	09-mar	9.398	8.889	8
		2020	05-mar	8.379		
Nubiana	Zaragoza	2018	04-mar	5.681	6.252	13
		2019	04-mar	6.822		
Owen T ¹	Caspe	2017	26-feb	5.404	5.385	5
		2018	03-mar	5.656		
		2019	24-feb	5.096		
	Guadajira	2019	04-mar	6.530	7.022	10
		2020	02-mar	7.515		
					6.204	19
Plum Late	Guadajira	2019	02-mar	6.870	7.250	7
		2020	02-mar	7.630		
Prime Time	Guadajira	2019	06-mar	7.356	7.438	2
		2020	02-mar	7.521		
Queen Ann	Zaragoza	2018	04-mar	6.571	7.035	9
		2019	04-mar	7.500		
Queen Rosa	Zaragoza	2018	01-mar	5.153	5.410	7
		2019	25-feb	5.666		
Red Beaut ¹	Zaragoza	2017	02-mar	5.263	6.382	12
		2018	04-mar	6.571		
		2019	25-feb	6.831		
		2020	24-feb	6.863		

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				<i>Growing degree hours</i>		
				Valor	Media	CV
	Guadajira	2019	28-feb	7.064	6.757	6
		2020	23-feb	6.449		
					6.569	4
Royal Diamond	Guadajira	2019	16-mar	8.268	8.705	7
		2020	09-mar	9.141		
Ruby Sun	La Almunia	2019	18-feb	7.865		
Ruby Star	Guadajira	2019	12-mar	8.648	9.010	6
		2020	09-mar	9.372		
Santa Rosa ¹	Zaragoza	2018	04-mar	5.656	6.242	10
		2019	04-mar	6.872		
		2020	02-mar	6.198		
	Guadajira	2019	04-mar	7.827	7.750	1
		2020	02-mar	7.674		
					6.996	15
Sapphire	Guadajira	2019	28-feb	8.609	7.540	20
		2020	23-feb	6.472		
Showtime	Guadajira	2019	04-mar	7.493	7.583	2
		2020	02-mar	7.674		
Simka	Zaragoza	2018	04-mar	5.955	6.440	11
		2019	04-mar	6.924		
Songold ¹	Zaragoza	2017	14-mar	6.194	6.339	7
		2018	04-mar	5.955		
		2019	04-mar	6.867		
	Guadajira	2019	04-mar	7.297	7.510	4
		2020	03-mar	7.723		
					6.925	12
Souvenir	Guadajira	2019	28-feb	11.512	9.709	26
		2020	20-feb	7.906		
Sundew	Guadajira	2019	02-mar	10.044	8.546	25
		2020	23-feb	7.048		
Sunkiss	Guadajira	2019	09-mar	8.703	9.103	6
		2020	09-mar	9.503		
Sweet Blaze	La Almunia	2019	20-feb	8.135		
Sweet Pixie	La Almunia	2019	25-feb	5.773		
Tasty Sweet	La Almunia	2019	17-feb	6.648		
TC Sun ¹	Caspe	2017	06-mar	4.994	5.781	16
		2018	11-mar	6.802		
		2019	27-feb	5.548		
	Guadajira	2019	12-mar	6.340	7.651	24
		2020	09-mar	8.963		
					6.716	20
Zanzi Sun	Caspe	2017	11-mar	5.806	5.762	9
		2018	11-mar	6.261		
		2019	27-feb	5.217		

Accesiones	Localización	Año	Fecha floración F50	Necesidades de calor		
				<i>Growing degree hours</i>		
				Valor	Media	CV
606 ¹	Caspe	2017	26-feb	6.098	6.129	7
		2018	06-mar	6.545		
		2019	19-feb	5.744		
	Guadajira	2019	02-mar	6.539	6.608	1
		2020	23-feb	6.678		
				6.369	5	
1515	Caspe	2017	06-mar	7.083	6.575	15
		2018	06-mar	7.233		
		2019	24-feb	5.409		
1516	Caspe	2017	06-mar	7.281	6.298	18
		2018	06-mar	6.545		
		2019	24-feb	5.069		
1526	Caspe	2017	06-mar	6.571	6.207	9
		2018	27-feb	5.527		
		2019	27-feb	6.522		
A001	Caspe	2017	06-mar	4.994	5.417	23
		2018	11-mar	6.802		
		2019	19-feb	4.456		
A002	Caspe	2017	26-feb	5.995	5.879	12
		2018	06-mar	6.545		
		2019	24-feb	5.096		
A003	Caspe	2017	11-mar	5.008	5.115	5
		2018	06-mar	5.387		
		2019	27-feb	4.949		
A004	Caspe	2017	11-mar	5.741	5.647	12
		2018	11-mar	6.253		
		2019	27-feb	4.949		
Z009	La Almunia	2019	17-feb	4.817		
Z010	La Almunia	2019	20-feb	6.818		
Z012	La Almunia	2019	26-feb	5.705		
Z020	La Almunia	2019	21-feb	5.218		
Z022	La Almunia	2019	01-mar	6.713		
Z023	La Almunia	2019	05-mar	6.718		
Z027	La Almunia	2019	16-feb	3.975		

ANOVA

Factor

Accesiones

F

2,82

2,91

p-value

2,9^{-06***}

1,6^{-16***}

Año

F

71,30

4,70

p-value

1,1^{-12***}

0,032*

Localización

F

0,059

15,14

(Guadajira-Caspe)

p-value

0,809 ns

4,4^{-04***}

Localización

F

0,054

10,93

(Guadajira-Zaragoza)

p-value

0,818 ns

0,002**

Diferencias significativas: ****p*<0,001, ***p*<0,01, **p*<0,05; ns = no significativo.

¹: Accesiones analizadas en dos localizaciones.

Tabla 4. Clasificación de 95 accesiones de ciruelo japonés según sus necesidades de calor en *growing degree hours* (GDH).

Clasificación	Rango	Accesiones		
Necesidades bajas	≤6.000 GDH	Black Beaut	Honey Star	A003
		Dapple Jack	Honey Sweet	A004
		Festival Red	Howard Sun	Z009
		Flavor Fall	Queen Rosa	Z012
		Green Sun	Sweet Pixie	Z020
		Grenadine	Zanzi Sun	Z027
		Honey Crisp	A001	
		Honey Moon	A002	
Necesidades medias	6.001-7.000 GDH	Ambra	Freedom	Songold
		Black Amber	Golden Plumza	Tasty Sweet
		Black Diamond	Honey Down	TC Sun
		Black Gold	Joanna Red	606
		Black Satin	Laetitia	1515
		Casselman	Laroda	1516
		Crimson Heart	Late Blue	1526
		Ebony 114	Nubiana	Z010
		Ebony 118	Owen T	Z022
		Ebony Rose	Red Beaut	Z023
		Fall Fiesta	Santa Rosa	
Flavor Fusion	Simka			
Necesidades altas	>7.000 GDH	African Delight	Ebony 61	Methley
		African Pride	Fortune	Plum Late
		African Rose	Friar	Prime Time
		Alpha	Frontier	Queen Ann
		Angeleno	Glory Red	Royal Diamond
		Black Splendor	Golden Globe	Ruby Sun
		Crimson Glo	Golden Japan	Ruby Star
		Crimson Kat	Golden Kiss	Sapphire
		Earliqueen	Hiromi Red	Showtime
		Ebony 1	Honey Punch	Souvenir
		Ebony 122	John W	Sundew
		Ebony 51	Kelsey	Sunkiss
		Ebony 55	Larry Ann	Sweet Blaze

Correlaciones entre variables

En las tres localizaciones, las fechas de fin de endodormancia se correlacionaron positivamente con las necesidades de frío estimadas en los tres modelos (de $R=0,76^{**}$ a $0,99^{**}$). Las necesidades de frío según los tres modelos se correlacionaron positivamente entre sí (de $R=0,76^{**}$ a $0,99^{**}$). En Caspe y en Guadajira, las necesidades de calor se correlacionaron negativamente con las necesidades de frío, pero estas correlaciones no fueron significativas en Zaragoza. La fecha de plena floración (F50) se correlacionó con diferentes variables en cada localización: en Caspe, positivamente con las necesidades de calor ($R=0,70^{**}$); en Guadajira, positivamente con las necesidades de frío (en un rango de $R= 0,59^{**}$ a $0,70^{**}$ dependiendo del modelo) y las necesidades de calor ($R=0,31^{**}$); y en Zaragoza, sólo se correlacionó significativamente con las UF ($R=0,41^{**}$) (Tabla 5, Figura 7).

Tabla 5. Coeficientes de correlación de Pearson entre necesidades de frío para salir de la endodormancia [horas frío (HF), unidades frío (UF) y porciones frío (PF)] necesidades de calor para la floración [*Growing degree hours* (GDH)]; fechas de fin de endodormancia y fechas de plena floración (F50) de las accesiones de ciruelo de tipo japonés analizadas en Caspe, Guadajira y Zaragoza en dos años.

Provincia	Variable	Horas frío	Unidades frío	Porciones frío	Growing degree hours	Fecha de fin de endodormancia	Fecha floración F50
Caspe	Horas frío	--					
Guadajira		--					
Zaragoza		--					
Caspe	Unidades frío	0,98**	--				
Guadajira		0,90**	--				
Zaragoza		0,90**	--				
Caspe	Porciones frío	0,91**	0,93**	--			
Guadajira		0,88**	0,99**	--			
Zaragoza		0,81**	0,76**	--			
Caspe	Growing degree hours	-0,38*	-0,38*	-0,43**	--		
Guadajira		-0,24*	-0,34**	-0,33**	--		
Zaragoza		-0,03 ns	-0,29 ns	0,0 ns	--		
Caspe	Fecha de fin de endodormancia	0,97**	0,97**	0,92**	-0,54**	--	
Guadajira		0,89**	0,99**	0,99**	-0,39**	--	
Zaragoza		0,87**	0,92**	0,76**	-0,23 ns	--	
Caspe	Fecha F50	0,2 ns	0,27 ns	0,2 ns	0,70**	0,07 ns	--
Guadajira		0,59**	0,70**	0,70**	0,31**	0,69**	--
Zaragoza		0,19 ns	0,41*	0,2 ns	0,11 ns	0,32 ns	--

Diferencias significativas: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns = no significativo.

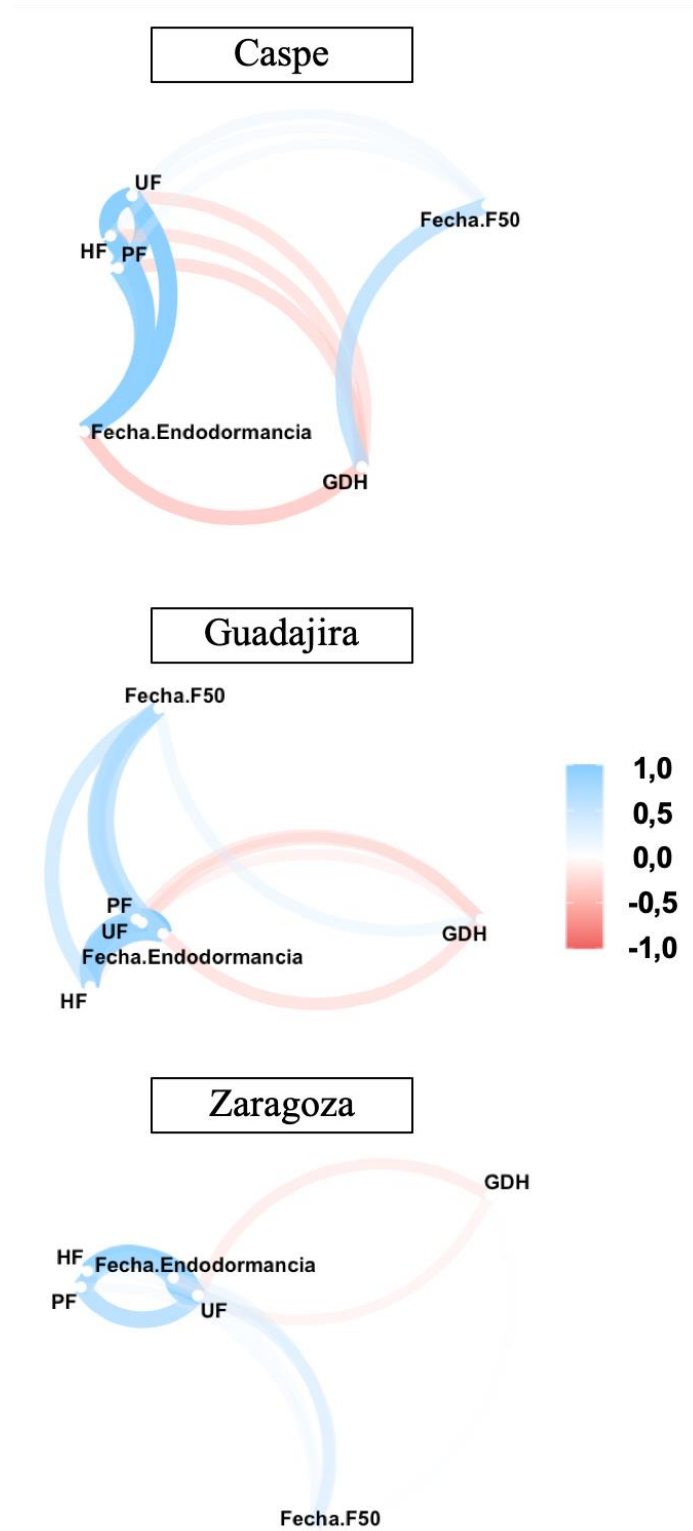


Figura 7. Red de correlaciones de Pearson entre necesidades de frío [en horas frío (HF), unidades frío (UF) y porciones frío (PF)], necesidades de calor [*growing degree hours* (GDH)], fecha de fin de endodormancia y fecha de plena floración (F50) de accesiones de ciruelo de tipo japonés analizados en tres localizaciones.

DISCUSIÓN

Se han analizado las necesidades agroclimáticas de 95 accesiones de ciruelo de tipo japonés, 85 de ellas por primera vez. Los datos previos disponibles en ciruelo de tipo japonés se limitan a 11 variedades analizadas en Murcia (Ruiz et al., 2018) y 7 en Zaragoza (Tabuenca, 1967), de las cuales 10 se han analizado en este estudio. Seis variedades mostraron necesidades de frío similares a los obtenidos en trabajo previos (Black Diamond, Fortune, Golden Globe, Laetitia, Red Beaut y Santa Rosa). En tres variedades se obtuvieron valores muy diferentes (>20%) a los obtenidos previamente (Angelino, Black Splendor y Songold), mientras que en Golden Japan los resultados fueron similares a los de un trabajo (Ruiz et al., 2018) y diferentes a los del otro (Tabuenca, 1967). Se han observado diferencias en las necesidades de frío entre localizaciones en numerosos trabajos previos en varias especies de frutales de hueso (revisado en Fadón et al., 2020), que pueden achacarse a las limitaciones del método (Luedeling et al., 2009) y a las diferencias en la metodología experimental: frecuencia de los muestreos, condiciones y periodo en la cámara de crecimiento, así como los parámetros tenidos en cuenta para la evaluación del crecimiento de las yemas, lo que dificulta la comparación entre resultados de distintos trabajos (Dennis, 2003). Sin embargo, en esos casos los datos pueden ser válidos para comparar las necesidades de frío entre variedades y para evaluar la adaptación de variedades a la zona de estudio (Fadón & Rodrigo, 2018).

A diferencia de los otros dos modelos de cuantificación de frío (HF y UF), con el modelo dinámico (PF) no se observaron diferencias significativas entre años para cada variedad, ni entre Guadajira (localización más cálida) y Caspe, por lo que este modelo parece el más apropiado para las condiciones de estos ensayos. En trabajos previos se ha

observado que el modelo dinámico es el más adecuado para zonas cálidas o de inviernos templados (Fadón et al., 2020b).

Se han observado particularidades del ciruelo de tipo japonés que han condicionado el diseño experimental utilizado en otras especies. Por un lado, el tamaño de las yemas es hasta 5-10 veces más pequeño que en otras especies del género *Prunus* (Guerra & Rodrigo, 2015), por lo que es conveniente monitorizar un número mayor de yemas. Por otro lado, en la mayoría de accesiones fue necesario muestrear varetas más largas (> 30 cm), como en trabajos previos en albaricoquero (Campoy et al., 2012) y ciruelo japonés (Ruiz et al., 2018), que las utilizadas en otros estudios en albaricoquero japonés (Gao et al., 2012), cerezo (Fadón et al., 2018b) y melocotonero (Citadin et al., 2001). Además, el desarrollo fenológico tras el periodo en la cámara fue muy heterogéneo entre accesiones. En la mayoría de los casos, el primer cambio fenológico observado en las yemas sucedió una vez superado un aumento de peso mayor al 30%, por lo que la evaluación de la fenología como indicador de cubrimiento de necesidades de frío puede dar como resultado sobreestimaciones de las necesidades de frío en algunas accesiones. La evaluación del peso parece ser un indicador más fiable que el desarrollo fenológico en la mayoría de accesiones de ciruelo de tipo japonés.

Las necesidades de frío fueron menores que las de otras especies de *Prunus* como albaricoquero (Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2012), cerezo (Alburquerque et al., 2008; Fadón et al., 2021b), ciruelo europeo (Tabuenca, 1967) y melocotonero (Citadin et al., 2001), pero mayores que las de almendro (Egea et al., 2003; Alonso et al., 2005). La variabilidad observada entre las accesiones analizadas es similar a la encontrada en otras especies de *Prunus*, con excepción del melocotonero, que presenta un rango más amplio (Fadón et al., 2020b).

La cantidad de frío acumulado en todas las localizaciones resultó suficiente para la salida de la endodormancia en todas las accesiones evaluadas, lo que evidencia la correcta adaptación del ciruelo japonés en las zonas de estudio, situadas en zonas tradicionales de cultivo de fruta de hueso. En Extremadura se concentra el 50 % de la producción de ciruelas (77.600 t en 6.764 ha) y el 5 % en Aragón (8.125 t en 1.1125 ha) (MAPA, 2021).

La floración de las accesiones analizadas ocurrió en fechas parecidas a las de Murcia (Ruiz et al., 2018) y antes que en Serbia (Ruml et al., 2021). La floración en ciruelo japonés fue anterior al cerezo (Alburquerque et al., 2008; Fadón et al., 2021b), y posterior al albaricoquero (Campoy et al., 2012) y almendro (Alonso et al., 2005). Las necesidades de calor fueron similares a las determinadas en trabajos previos de ciruelo japonés (Ruiz et al., 2018), pero en un rango más amplio, probablemente debido a que el número de accesiones analizadas en este estudio es mayor. También presentaron un rango más amplio que en albaricoquero (Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2012), cerezo (Alburquerque et al., 2008; Fadón et al., 2021b) y almendro (Egea et al., 2003; Alonso et al., 2005).

Las necesidades de frío según los tres modelos estuvieron estrechamente relacionadas con la fecha de fin de endodormancia, como era esperable. Las necesidades de calor se correlacionaron negativamente con las de frío, ya que las accesiones con menores necesidades de frío necesitaron una mayor acumulación de calor para florecer adecuadamente. La fecha de floración estuvo más condicionada por las necesidades de calor en las condiciones más frías de Caspe, al igual que en almendro (Alonso et al., 2005) y cerezo (Fadón et al., 2021b) cultivados en condiciones similares. En la localización de condiciones más cálidas, Guadajira, la floración estuvo más condicionada por las necesidades de frío, como en las condiciones climáticas del sureste de España en

albaricoquero (Campoy et al., 2012), almendro (Egea et al., 2003) y ciruelo japonés (Ruiz et al., 2018).

En este trabajo se han determinado las necesidades agroclimáticas de un amplio y diverso grupo de variedades tradicionales, nuevas obtenciones y selecciones avanzadas de ciruelo de tipo japonés procedentes de diferentes programas de mejora, lo que permite determinar su posible adaptación a cada zona de cultivo. Sin embargo, las diferencias observadas entre las zonas estudiadas y con resultados de otros trabajos previos realzan la necesidad de estandarización de las condiciones experimentales para determinar con claridad el momento de salida de endodormancia. En otras especies se han propuesto diferentes marcadores biológicos (Julian et al., 2011, 2014; Fadón et al., 2018a, 2019a, 2021a) y moleculares (Bielenberg et al., 2008; Yamane et al., 2011; Balogh et al., 2019; Vimont et al., 2019; Quesada-Traver et al., 2020) para determinar la transición de endodormancia a ecodormancia. Encontrar un biomarcador de la salida de endodormancia en ciruelo japonés permitiría contrastar los resultados obtenidos y facilitaría la estimación de necesidades agroclimáticas en el futuro.

En los capítulos anteriores se ha descrito la metodología para determinar las necesidades de polinización (capítulo 1) y su aplicación en un grupo de accesiones (capítulo 2). En este capítulo se han evaluado las necesidades agroclimáticas de otro grupo de accesiones. En el capítulo siguiente se van a analizar las necesidades de polinización y agroclimáticas de un grupo de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero, utilizando la metodología utilizada en este y los capítulos anteriores.

CAPÍTULO 4**NECESIDADES DE POLINIZACIÓN Y NECESIDADES AGROCLIMÁTICAS
EN NUEVOS HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS CIRUELO ×
ALBARICOQUERO**

RESUMEN

En los últimos años se han desarrollado varios programas de mejora que buscan obtener híbridos interespecíficos entre ciruelo japonés y albaricoquero, con el objetivo de desarrollar variedades con frutos atractivos, firmes y de mejor calidad que las ciruelas. En este capítulo se va a aplicar la metodología puesta a punto en ciruelo de tipo japonés en los capítulos anteriores para caracterizar la auto(in)compatibilidad (34 accesiones), el genotipo *S* (59 selecciones) y las necesidades agroclimáticas (23 accesiones) de híbridos interespecíficos del programa de mejora de Ibergén. Tres accesiones resultaron autocompatibles y 31 autoincompatibles. Se han identificado dos nuevos alelos *S* (*S ϵ* y *S θ*), y el resto se correspondieron con alelos descritos en ciruelo de tipo japonés. La identificación de los genotipos *S* de las accesiones permitió su asignación a 12 grupos de incompatibilidad establecidos, siguiendo la nomenclatura establecida para ciruelo. Los grupos XXVIII (*ScSk*) y XXIX (*ShSo*) se han descrito por primera vez. Las necesidades agroclimáticas mostraron rangos muy amplios de necesidades de frío (249-890 horas frío, 527-1.146 unidades frío y 27-55 porciones frío) y necesidades de calor (5.471-7.876 *growing degree hours*). Las accesiones menos exigentes en frío necesitaron más cantidad de calor para florecer, y viceversa. Las necesidades de polinización y necesidades agroclimáticas de los híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero analizados parecen indicar un comportamiento más próximo al ciruelo que al albaricoquero.

INTRODUCCIÓN

La mejora genética del ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) se originó en California (Estados Unidos) a finales del siglo XIX (Okie & Weinberger, 1996). La intensa actividad del mejorador Luther Burbank y las hibridaciones espontáneas con otras especies de *Prunus* han provocado gran variabilidad en el comportamiento agronómico de las variedades cultivadas en la actualidad (Okie, 2005).

La hibridación entre especies diploides del subgénero Prunophora [*P. salicina*, *Prunus cerasifera* Ehrh. (sección Euprunus), *Prunus americana* Marsh. (sección Prunocerasus) y *Prunus armeniaca* L. (sección Armeniaca)], ha provocado la introgresión de genes de interés de otras especies hacia el ciruelo japonés (Okie, 2006). La renovación varietal en este cultivo ha dado lugar a nuevas obtenciones de híbridos interespecíficos con características agronómicas y de calidad de fruto novedosas (Okie & Ramming, 1999; Okie, 2005), muy apreciadas por el consumidor (Brantley, 2004).

En la actualidad se utiliza el término ‘interespecífico’ para diferenciar a los híbridos entre *P. salicina* y especies como *P. armeniaca*, *Prunus persica* (L.) Batsch y *Prunus avium* L. de los ciruelos de tipo japonés, que se consideran híbridos entre *P. salicina* y otros ciruelos diploides como *P. americana*, *Prunus besseyi* Bailey, *P. cerasifera* y *Prunus simonii* Carr. (Okie, 2005). A principios del siglo XX, Burbank denominó por primera vez ‘plumcots’ a las variedades Apex, Red Bud y Rutland, procedentes de la hibridación de ciruelo (en inglés *plum*) × albaricoquero (en inglés *apricot*) (Hedrick, 1911; Okie, 2005). Los plumcots tuvieron buena aceptación comercial en California (Estados Unidos) y se llegaron a describir como “el mejor fruto producido en este planeta” debido a la novedad, la diversidad en tamaño, forma, sabor, color y aroma de los frutos y al crecimiento rápido de los árboles (Hedrick, 1911).

En varios países se han puesto en marcha programas de mejora enfocados a la hibridación interespecífica para el desarrollo de nuevas variedades mediante la transferencia entre especies de características como la resistencia virus del Sharka (PPV), las bajas necesidades de frío y la calidad del fruto (Milošević & Milošević, 2018). Los programas de mejora más activos están en Corea del Sur (*National Institute of Horticultural and Herbal Science*), Estados Unidos (Bradford Farms, B. Q. Genetics, Rutgers University, USDA y Zaiger Genetics) y España (CEBAS-CSIC/IMIDA, Ibergen, Iridis y Provedo). El programa de mejora Zaiger Genetics (California, EEUU) ha registrado las marcas ‘pluot’ y ‘aprium’ para los híbridos procedentes de los retrocruzamientos de plumcots con ciruelo y albaricoquero, respectivamente, así como ‘peacotum’ (híbrido melocotonero-albaricoquero-ciruelo) y ‘pluerry’ (ciruelo-cerezo) (Topp et al., 2012). La buena aceptación de la fruta de estos híbridos por parte de los consumidores situó a variedades como Black Kat, Flavor Fall, Flavorich y Flavorosa entre las 20 variedades de ciruelo más cultivadas en California en 2008 (Topp et al., 2012). En Corea del Sur, el *National Institute of Horticultural and Herbal Science* comenzó su actividad de mejora a finales del siglo XX y desde entonces ha desarrollado plumcots como ‘Beniasama’, ‘Red Pricot’ y ‘New Castle Gold’ a partir de cruzamientos entre ‘Soldam’ (*P. salicina*) y ‘Harcot’ (*P. armeniaca*) (Milošević & Milošević, 2018).

En Europa, la mejora genética ha estado más dirigida al ciruelo europeo (*Prunus domestica* L.), que representa el 80 % de la actividad frente al 20 % del ciruelo japonés (Hartmann & Neümuller, 2009; Milošević & Milošević, 2018). La transferencia de la resistencia al virus del Sharka a *P. salicina* desde otras especies como *P. domestica* (Neumüller, 2011) o *P. armeniaca* (Nicolás-Almansa et al., 2021) es un objetivo principal de algunos de estos programas de mejora. El resultado de cruzamientos entre *P. domestica*, *P. cerasifera* y *P. spinosa* también ha permitido la selección de híbridos

resistentes a esta enfermedad y de mejor calidad de fruto (Minev & Balev, 2002). En los últimos años se han desarrollado en España diferentes programas de mejora (CEBAS-CSIC/IMIDA, Ibergen, Iridis y Provedo) que buscan obtener híbridos interespecíficos entre ciruelo japonés y albaricoquero con diferentes objetivos. El programa de mejora coordinado por el CEBAS-CSIC y el IMIDA es el único programa de mejora público en España de ciruelo japonés, y entre sus objetivos está el desarrollo de variedades de plumcots resistentes al virus del Sharka mediante hibridaciones interespecíficas de ciruelo × albaricoquero (Ruiz et al., 2019; Nicolás-Almansa et al., 2020, 2021). El programa de mejora de Provedo tiene como objetivos principales conseguir híbridos muy productivos y mayor vida postcosecha del fruto (Guerra & Rodrigo, 2017; Provedo, 2017). Los programas de Iridis e Ibergen buscan frutos más atractivos y firmes, con mayor calidad gustativa y valor nutritivo, así como ampliar el periodo de cosecha (Negueroles, 2019; Frutaria, 2021).

En las nuevas obtenciones de los programas de mejora es necesario conocer tanto las necesidades de polinización (Capítulos 1 y 2) como las necesidades agroclimáticas (Capítulo 3) para la elección de variedades polinizadoras adecuadas en el diseño de nuevas plantaciones, así como para poder predecir la adaptación de las variedades a cada zona de cultivo. En este capítulo se va aplicar la metodología puesta a punto en los capítulos anteriores en ciruelo de tipo japonés para caracterizar las necesidades de polinización y las necesidades agroclimáticas de nuevas variedades y selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos del programa de mejora de Ibergen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se determinaron las necesidades de polinización [auto(in)compatibilidad y genotipo S] de 34 accesiones y el genotipo S de 59 selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos procedentes del programa de mejora Ibergen. Adicionalmente, se determinaron las necesidades agroclimáticas de 23 accesiones. Para el estudio de las necesidades de polinización, el material vegetal (hojas jóvenes y flores) se recogió de las plantaciones experimentales de Ibergen en Caspe (Zaragoza) y en San Rafael del Río (Castellón) durante las primaveras de 2017 a 2021. Para los ensayos de necesidades agroclimáticas se recogieron varetas con yemas de flor de la plantación de Caspe (Zaragoza) durante los inviernos de 2018-2019 y 2019-2020.

Época de floración

La floración de las accesiones se monitoreó de acuerdo a los estados fenológicos de Baggiolini (1952) de 2019 a 2020. La duración del periodo de floración se estableció desde la apertura de las primeras flores hasta las últimas flores abiertas. Se consideró plena floración cuando al menos el 50% (F 50) de las flores se encontraban en estado F (Baggiolini, 1952), que corresponde al estado 65 en la escala BBCH (Meier, 2001; Fadón et al., 2015) (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Determinación del carácter de auto(in)compatibilidad

Para establecer la auto(in)compatibilidad de cada accesión, se realizaron autopolinizaciones y cruzamientos semi-*in vivo* en laboratorio y la posterior observación del crecimiento de los tubos polínicos en las flores polinizadas mediante microscopía de fluorescencia (Capítulos 1 y 2, Guerrero et al., 2020). Para ello, se recogieron flores de cada accesión en estado de botón globoso [estado D (Baggiolini, 1952); estado 57 BBCH

(Meier, 2001)], se emascularon y se colocaron en espuma de florista húmeda a temperatura ambiente, y se polinizaron 24 h después. Los cruzamientos se realizaron como control, utilizando una mezcla de polen de diferentes accesiones para asegurar la presencia de polen compatible (Capítulos 1 y 2, Guerrero et al., 2020). Para obtener el polen, se recogieron flores en botón globoso de cada accesión, se separaron las anteras, se colocaron sobre bandejas de papel a temperatura ambiente durante 24 h hasta su dehiscencia y se colaron usando una malla fina de 0.26 mm x 0.26 mm de luz de malla. El polen se usó inmediatamente o se almacenó a -20°C hasta su uso. Los pistilos se fijaron una vez transcurridas 72 h después de la polinización en etanol:ácido acético (3:1) durante al menos 24 h, y se almacenaron en etanol (75%) (v/v) a 4°C (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Para preparar los pistilos para su observación en el microscopio, los pistilos fijados se lavaron con agua destilada tres veces en intervalos de 1 h y se dejaron en sulfito sódico al 5% (p/v) durante 24 h a 4°C. Posteriormente, se autoclavaron en sulfito sódico al 5% (p/v) en un autoclave vertical Presoclave II (JP Selecta, Barcelona, España) a 120°C durante 8 min y se tiñeron con azul de anilina al 1% (v/v) en K₃PO₄ 0,1N. El crecimiento de los tubos a lo largo del estilo de las flores polinizadas se observó en un microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems, Alemania) con epifluorescencia para luz ultravioleta, usando un filtro excitador BP340-390 y un filtro de barrera LP425 (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020).

Identificación del genotipo S

En cada accesión, se extrajo ADN genómico de hojas jóvenes liofilizadas y pulverizadas en un mortero. El ADN se aisló usando el kit comercial Speedtools plant DNA extraction kit (Biotools, España), se cuantificó y se diluyó a una concentración de

10 ng/μl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020). Se utilizaron los pares de *primers* PaConsI-F/PaConsI-R2 (Sonneveld et al., 2006) y Pru-T2/SI32 (Tao et al., 1999; Wiersma et al., 2001; Wunsch & Hormaza, 2004b). La identificación de los fragmentos amplificados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Capítulo 1, Guerrero et al., 2020) y mediante electroforesis capilar (Capítulo 2). Para el establecimiento de los tamaños de los diferentes alelos *S* identificados en las accesiones analizadas, se utilizaron diez variedades de ciruelo de tipo japonés con alelos conocidos como referencia (Beppu et al., 2002; Guerra et al., 2009, 2012).

Determinación de las necesidades agroclimáticas

Se realizaron muestreos semanales durante el reposo invernal (Capítulo 3). Cada día de muestreo se recogieron 5 varetas (30-40 cm de largo y 4-8 mm de diámetro con al menos 10 yemas florales cada una) de cada accesión. Se realizó un corte fresco bajo el agua en la base de las varetas, se colocaron en espuma de florista con agua y se mantuvieron durante 8 días en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 12 horas con luz proporcionada por lámparas de iluminación de luz de día (6500 K, Osram L58W/865 y T5 L21W/865) y a una temperatura de 22 ± 1 °C (Fadón et al., 2018b).

Para determinar la fecha de fin de endodormancia, se registró el estado fenológico de todas las yemas de cada vareta y se pesaron 10 yemas seleccionadas al azar al inicio (día 0) y al final (día 8) del periodo en la cámara de crecimiento (Capítulo 3). La fecha de fin de endodormancia se estableció cuando el peso de las yemas florales aumentó al menos un 30% después de 8 días en la cámara (Fadón et al., 2018b; Ruiz et al., 2018).

Para la estimación de las necesidades de frío se utilizaron datos semi-horarios de temperatura registrados en Data Loggers HOBO Pendant Temp/Alarm (onset-HOBO,

EEUU) colocados en la colección y cuyos datos se descargaron periódicamente con el software HOBOWare versión 3.7.20 (Onset Computer Corporation, EEUU). Se cuantificó la acumulación de frío desde el 1 de octubre hasta el 28 de febrero en los dos inviernos, siguiendo los tres modelos más usados en árboles frutales (Campoy et al., 2011; Fadón et al., 2020b): horas frío (HF; Weinberger, 1950), unidades frío (UF; modelo Utah; Richardson et al., 1974) y porciones frío (PF; modelo Dinámico, Fishman et al., 1987).

Las necesidades de calor se determinaron mediante la suma de *growing degree hours* (GDH) (Richardson et al., 1974) acumuladas desde la fecha del fin de la endodormancia hasta la fecha de la plena floración (F50).

Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de desarrollo integrado RStudio v. 1.2.5033 (RStudio-Team, 2020) para el lenguaje de programación R v. 3.6.3 (R Core Team, 2021).

Para comparar las variables que determinan el carácter de auto(in)compatibilidad entre el grupo de accesiones autocompatibles y autoincompatibles, se realizó un análisis estadístico no paramétrico de la prueba de la mediana de Mood (Mangiafico, 2016) usando la función ‘mood.medtest’ del paquete ‘RVAideMemoire’ v. 0.9-80 (Hervé, 2021). Previo al análisis estadístico, los datos de porcentajes se transformaron mediante la función raíz cuadrada del arcoseno seguido de una transformación angular.

Se realizó un ANOVA de dos vías para analizar el efecto de los factores “accesión” y “año” en las variables determinadas para establecer las necesidades agroclimáticas. En todos los casos se comprobaron los supuestos de normalidad, mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y de homocedasticidad, mediante las pruebas de Barlett,

Levene y ncVST (non-constant Variance Score Test), así como en los gráficos de los residuales para cada ANOVA.

Se calcularon las correlaciones entre las variables HF, UF, PF, GDH, fecha de fin de endodormancia y fecha de plena floración mediante la prueba de correlación de Pearson.

RESULTADOS

Determinación de las relaciones de auto- e inter-compatibilidad

En las flores autopolinizadas de todas las accesiones se observaron granos de polen germinados en el estigma (Figura 1A) y tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo (Figura 1B). Tres accesiones, IberPlum 3, IBP-16-10 y IBP-53-10, se consideraron autocompatibles, ya que la mayoría de pistilos (entre 65 y 93 %) presentaron tubos polínicos alcanzando la base del estilo (Figura 1C). En 28 accesiones los tubos polínicos se detuvieron en el estilo sin alcanzar la base (Figura 1D), por lo que se consideraron autoincompatibles. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre accesiones autocompatibles y autoincompatibles en el porcentaje de tubos polínicos alcanzando la base del estilo, el porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo y el número de tubos polínicos alcanzando la base del estilo (Tabla 1). En tres accesiones se observaron tubos polínicos en la base del estilo en muy pocos pistilos autopolinizados (1-3), por lo que se consideraron datos no concluyentes. El polen utilizado para las autopolinizaciones presentó buena viabilidad en todas las accesiones.

Las flores de todos los cruzamientos control realizados usando una mezcla de pólenes presentaron buena germinación de granos de polen en el estigma y tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo y alcanzando la base del pistilo (Tabla suplementaria 1).

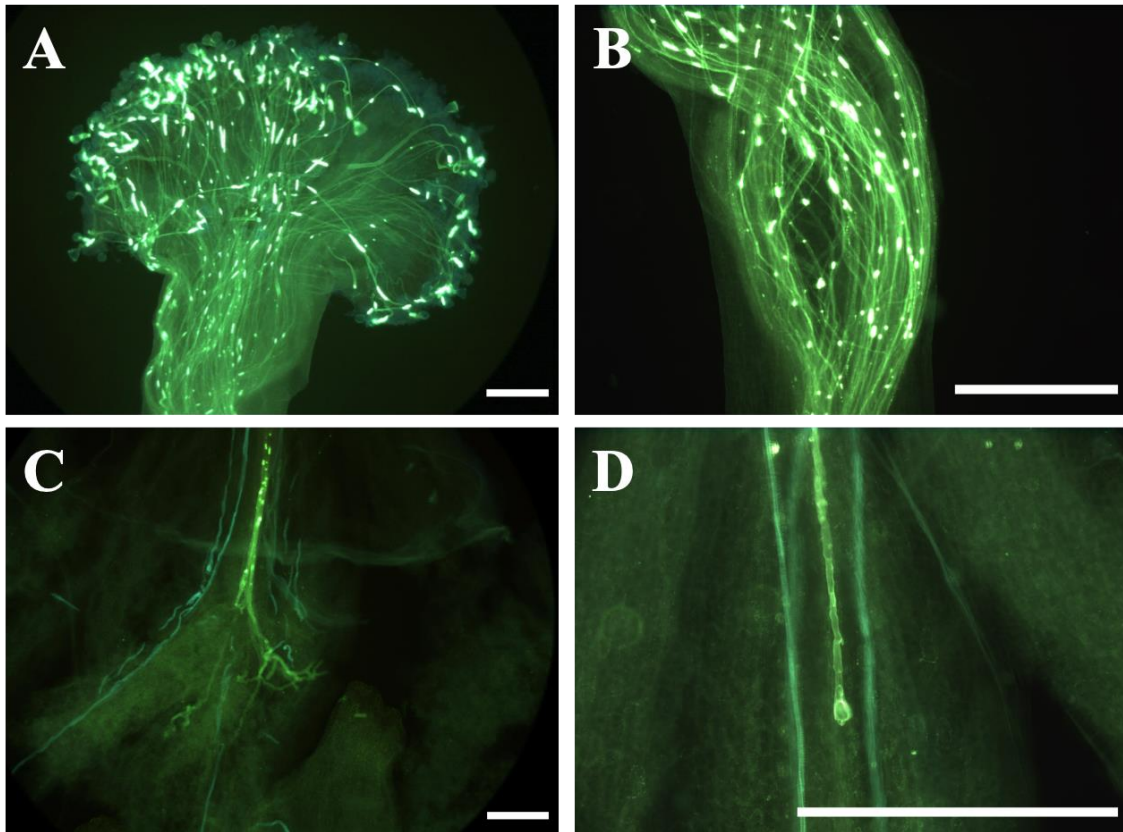


Figura 1. Crecimiento de tubos polínicos en pistilos de flores autopolinizadas de híbridos interespecíficos ciruelo \times albaricoquero. (A) Polen germinado en el estigma, (B) tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo, (C) tubos polínicos alcanzado la base del estilo en una accesión autocompatible, y (D) tubo polínico detenido en el estilo en una accesión autoincompatible (Barras = 200 μ m).

Tabla 1. Comportamiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas de 34 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen. Pistilos con granos de polen germinados en el estigma, pistilos con tubos polínicos en la mitad y en la base del estilo, alcance máximo del estilo recorrido por el tubo polínico más largo, número de tubos polínicos alcanzando la base del estilo y autocompatibilidad (AC) o autoincompatibilidad (AI).

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)	AC/AI
		mitad del estilo	base del estilo				
Aprium 30-14	100	0	0	28	40	0	AI
BBP-16-19	100	0	0	11	30	0	AI
IberPlum 1	100	8	0	18	50	0	AI
IberPlum 2	68	70	0	48	75	0	AI
IberPlum 4	90	17	0	26	60	0	AI
IberPlum 7	78	17	0	29	65	0	AI
IberPlum 9	57	6	0	16	50	0	AI
IberPlum 10	100	40	0	31	50	0	AI
IberPlum 11	100	95	0	63	85	0	AI
IberPlum 12	94	73	0	45	70	0	AI
IBP-14-5	85	3	0	20	80	0	AI
IBP-15-4	73	6	0	32	80	0	AI
IBP-15-8	68	7	0	26	80	0	AI
IBP-15-16	100	93	0	55	60	0	AI
IBP-15-19	100	81	0	58	80	0	AI
IBP-15-21	82	0	0	12	30	0	AI
IBP-16-9	100	82	0	53	80	0	AI
IBP-16-13	93	0	0	8	20	0	AI
IBP-16-14	100	60	0	41	85	0	AI
IBP-16-17	100	53	0	38	50	0	AI
IBP-19-14	100	80	0	53	65	0	AI
IBP-21-1	100	0	0	17	30	0	AI
IBP-21-22	93	46	0	39	70	0	AI
IBP-26-1	100	0	0	33	40	0	AI
IBP-32-17	75	8	0	28	50	0	AI
IBP-32-18	100	18	0	32	50	0	AI
IBP-53-11	65	63	0	41	80	0	AI
IBP-3A-4-2	100	39	0	40	60	0	AI
IberPlum 3	94	100	94	96	100	3	AC
IBP-16-10	64	100	93	99	100	2	AC
IBP-53-10	95	85	65	81	100	2	AC
AI (Media)	90	35	0 b	34 b	59	0 b	--
AC (Media)	84	95	84 a	92 a	100	2 a	--
Chi-cuadrado	1,3	1,6	20,61	56,6	1,95	427,6	--
df	1	1	1	1	1	1	--
p-value	0,247 ns	0,202 ns	5,6 ^{-06***}	3,32 ^{-14***}	0,162 ns	< 2,2 ^{-16***}	--
Datos no concluyentes							
IberPlum 6	100	46	4	35	100	3	--
IBP-16-18	91	14	5	27	100	2	--
IBP-17-11	95	86	9	61	100	3	--

Diferencias significativas: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns = no significativo.

La amplificación de los fragmentos del gen *S-RNasa* se realizó con los *primers* PaconsI-F/PaconsI-R2 y Pru-T2/SI-32, usando como referencia los genotipos *S* de diez variedades de ciruelo de tipo japonés descritos anteriormente (Capítulo 2, Tabla 3). Los tamaños de los alelos *S* amplificados en las accesiones analizadas fueron consistentes con los tamaños de los alelos *S* descritos previamente en accesiones de ciruelo de tipo japonés (Capítulo 2). Sin embargo, la electroforesis en geles de agarosa no permitió la identificación de alelos de tamaños similares como *Sb/Se* y *Sa/Sh* (Figura 2). Para la identificación completa de los genotipos *S* se separaron los fragmentos amplificados en electroforesis capilar. Esta técnica permitió la distinción entre los alelos de tamaños muy próximos como los alelos *Sb* y *Se* y los alelos *Sa* y *Sh*, que en geles de agarosa se solapaban en la misma banda, mientras que en los electroferogramas obtenidos mediante electroforesis capilar se observaron perfiles diferenciados, mostrando tamaños de 369/444 y 374/446 pb para *Sb* y *Se*, y 389/468 y 390/462 para *Sa* y *Sh* (PaconsI-F/PaconsI-R2 y Pru-T2/SI-32) (Figura 3). No se pudieron identificar dos alelos de tamaños 331/413 y 393/454 pb (PaconsI-F/PaconsI-R2 y Pru-T2/SI-32), que se nombraron *Sε* y *Sθ*, siguiendo la nomenclatura propuesta en el capítulo 2.

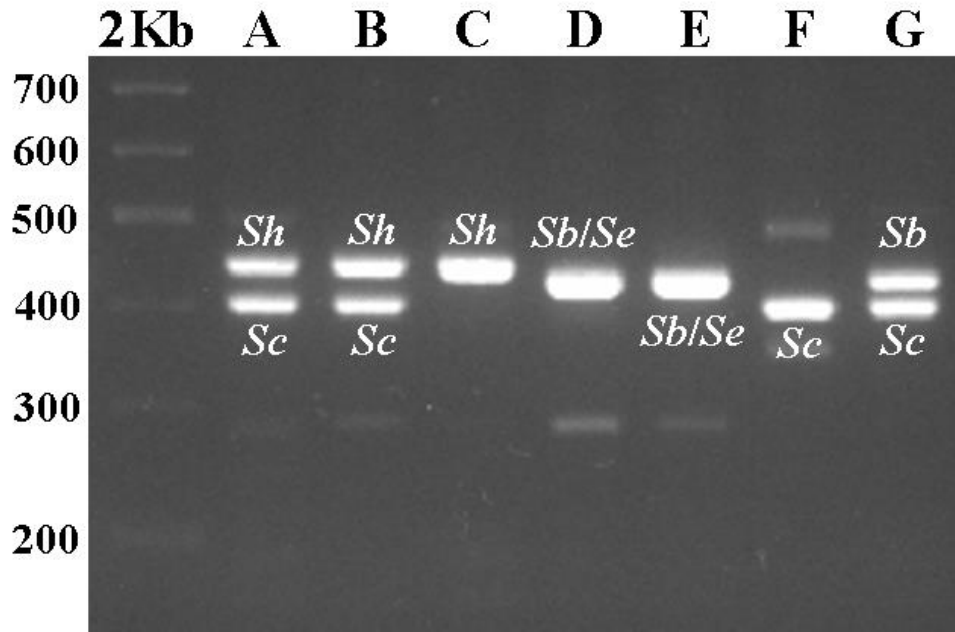


Figura 2. Gel de agarosa de la amplificación de fragmentos del gen *S-RNasa* por PCR con el par de *primers* Pru-T2/SI-32. (A) ‘IberPlum 6’, (B) ‘IberPlum 4’, (C) ‘IBP-15-8’, (D) ‘IBP-16-9’, (E) ‘IBP-16-18’, (F) ‘IBP-15-15’ y (G) ‘IBP-21-22’. Marcador de tamaño: 100-2000 pb.

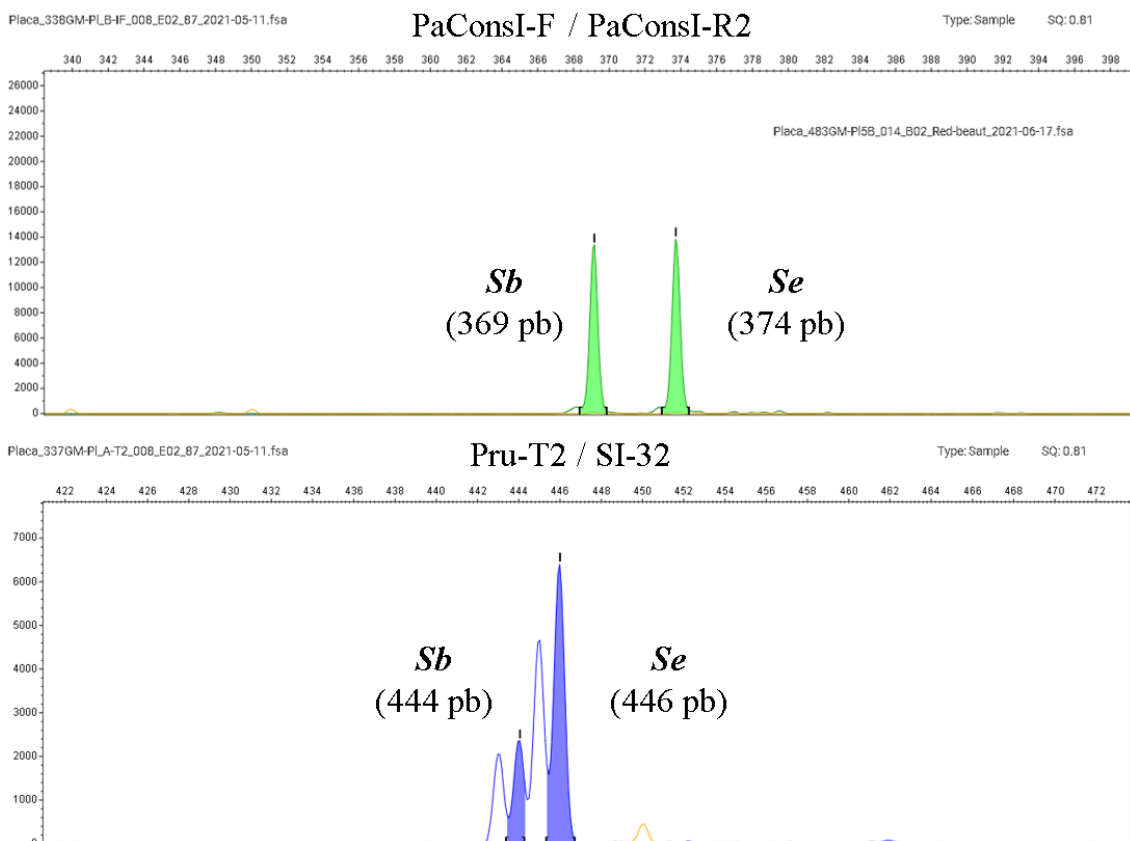


Figura 3. Electroferogramas de la amplificación de fragmentos del gen *S-RNasa* por PCR con los pares de *primers* PaConsI-F/PaConsI-R2 y Pru-T2/SI-32 de la accesión BBP-3A-1-5 (*SbSe*).

Se determinaron los genotipos *S* de 93 accesiones. Las 83 accesiones autoincompatibles se asignaron a 12 grupos de incompatibilidad: I (n=1), II (n=5), IV (n=14), VII (n=9), VIII (n=12), X (n=5), XI (n=11), XII (n=11), XIV (n=3) y XX (n=4). Seis accesiones se asignaron a los grupos de incompatibilidad XXVIII (n=3) y XXIX (n=2), que han sido descritos por primera vez en este trabajo. Las accesiones IBP-44B-2-44 (*ScSf*), IBP-3B-2-7 (*SdSe*) y una accesión tetraploide BBP-4B-2-24 (*SbScSeSh*) se asignaron al grupo '0' por presentar genotipos únicos. En cuatro accesiones sólo se pudo identificar un alelo *S* (Tabla 2). En las tres accesiones que no se pudo determinar su auto(in)compatibilidad se identificaron los dos alelos, IBP-17-11 (*ScSh*), Iberplum 6 (*ScSh*) y IBP-16-18 (*SbSe*), pero no se incluyeron en los grupos de incompatibilidad.

Tabla 2. Grupos de incompatibilidad (G.I.) y genotipo *S* de 90 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen.

G.I.	Genotipo <i>S</i>	Accesiones
I	<i>SaSb</i>	IBP-27A-3-4
II	<i>SbSc</i>	BBP-13B-1-55 IberPlum 12 IBP-21-22 IBP-5B-1-49 IBP-6B-2-11
IV	<i>SbSh</i>	BBP-3A-1-7 BBP-3A-1-8 BBP-8B-1-10 BBP-10A-1-4 BBP-11B-1-19 BBP-40A-1-6 BBP-40A-1-33 IberPlum 7 IBP-16-17 IBP-32-18 IBP-3B-1-6 IBP-8A-1-6 IBP-8B-1-56 IBP-41A-1-12
VII	<i>ScSh</i>	BBP-3A-5-5 IberPlum 4 IBP-15-4 IBP-15-19 IBP-3A-4-2 IBP-4B-1-9 IBP-4B-2-27 IBP-5A-1-2 IBP-9A-1-13
VIII	<i>SeSh</i>	BBP-4A-1-22 BBP-4B-2-13 BBP-6A-1-3 BBP-6B-1-19 BBP-7B-1-9 BBP-42A-1-9 IBP-3B-2-11 IBP-4B-1-1 IBP-4B-1-26 IBP-8B-1-2 IBP-10A-1-28 IBP-44B-1-2
X	<i>ShSk</i>	BBP-4B-1-10 IBP-15-8 IBP-3A-1-3 IBP-4A-1-30 IBP-5B-1-47

G.I.	Genotipo S	Accesiones
XI	<i>ScSe</i>	BBP-2B-5-3 BBP-4B-2-28 BBP-6B-1-5 BBP-8B-1-9 BBP-9A-1-12 IBP-14-5 IBP-15-12 IBP-4B-1-28 IBP-9B-1-7 IBP-32B-2-4 IBP-45A-1-20
XII	<i>SbSe</i>	BBP-3A-1-5 BBP-5B-1-35 BBP-8B-1-19 IberPlum 1 IberPlum 2 IberPlum 9 IBP-15-21 IBP-16-13 IBP-16-9 IBP-32-17 IBP-53-11
XIV	<i>SaSc</i>	IberPlum 10 IberPlum 11 IBP-15-16
XX	<i>SbSk</i>	BBP-16-19 IBP-15-6 IBP-16-14 IBP-6A-1-26
XXVIII ^a	<i>ScSk</i>	BBP-27B-2-2 IBP-6B-2-15 IBP-10A-1-1
XXIX ^a	<i>ShSo</i>	BBP-4A-1-19 IBP-3A-4-5
0	<i>ScSf</i> <i>SdSe</i> <i>SbScSeSh</i>	BBP-44B-2-44 IBP-3B-2-7 BBP-4B-2-24
Accesiones con al menos un alelo nuevo o sin identificar	<i>ScSe</i> <i>ShSa</i> <i>Sh</i> <i>Sθ</i>	IBP-15-15 Aprium 30-14 BBP-4B-1-5 IBP-26-1
Accesiones autocompatibles	<i>SeSr</i> <i>SeSr</i> <i>ScSh</i>	IberPlum 3 IBP-53-10 IBP-16-10

^aGrupos de Incompatibilidad descritos por primera vez en este trabajo.

En las 96 accesiones analizadas se amplificaron 13 alelos *S* diferentes, siendo los más frecuentes *Sb* (20 %), *Sc* (20 %), *Se* (21 %) y *Sh* (26%), seguidos de *Sk* (6 %). Los alelos *Sa*, *Sd*, *Sf*, *So*, *Sr*, *Sα* y los nuevos alelos (*Sε* y *Sθ*) presentaron frecuencias alélicas menores del 2 % (Figura 4).

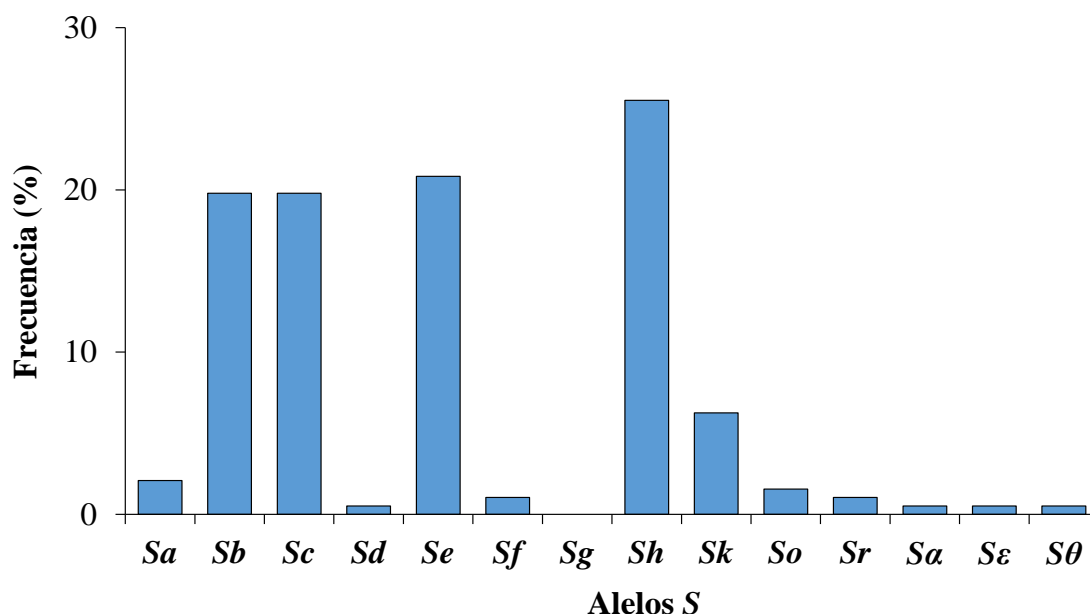


Figura 4. Frecuencia de los alelos *S* amplificados en 93 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen.

Determinación de las necesidades agroclimáticas

La acumulación de frío comenzó en la segunda mitad del mes de octubre, pero presentó variaciones a lo largo del invierno entre años. Durante noviembre y la primera mitad de diciembre la acumulación total de frío fue muy similar en los tres modelos (HF, UF, PF) y los dos años. Desde mediados de diciembre hubo diferencias en la dinámica de acumulación de frío, siendo más rápida en 2018-2019, por lo que se consideró el invierno más frío, con 1.352 HF, 1.742 UF y 85 PF acumuladas el 28 de febrero de 2019. El invierno 2019-2020 se consideró más cálido con 1.171 HF, 1.500 UF y 74 PF acumuladas el 28 de febrero de 2020 (Figura 5).

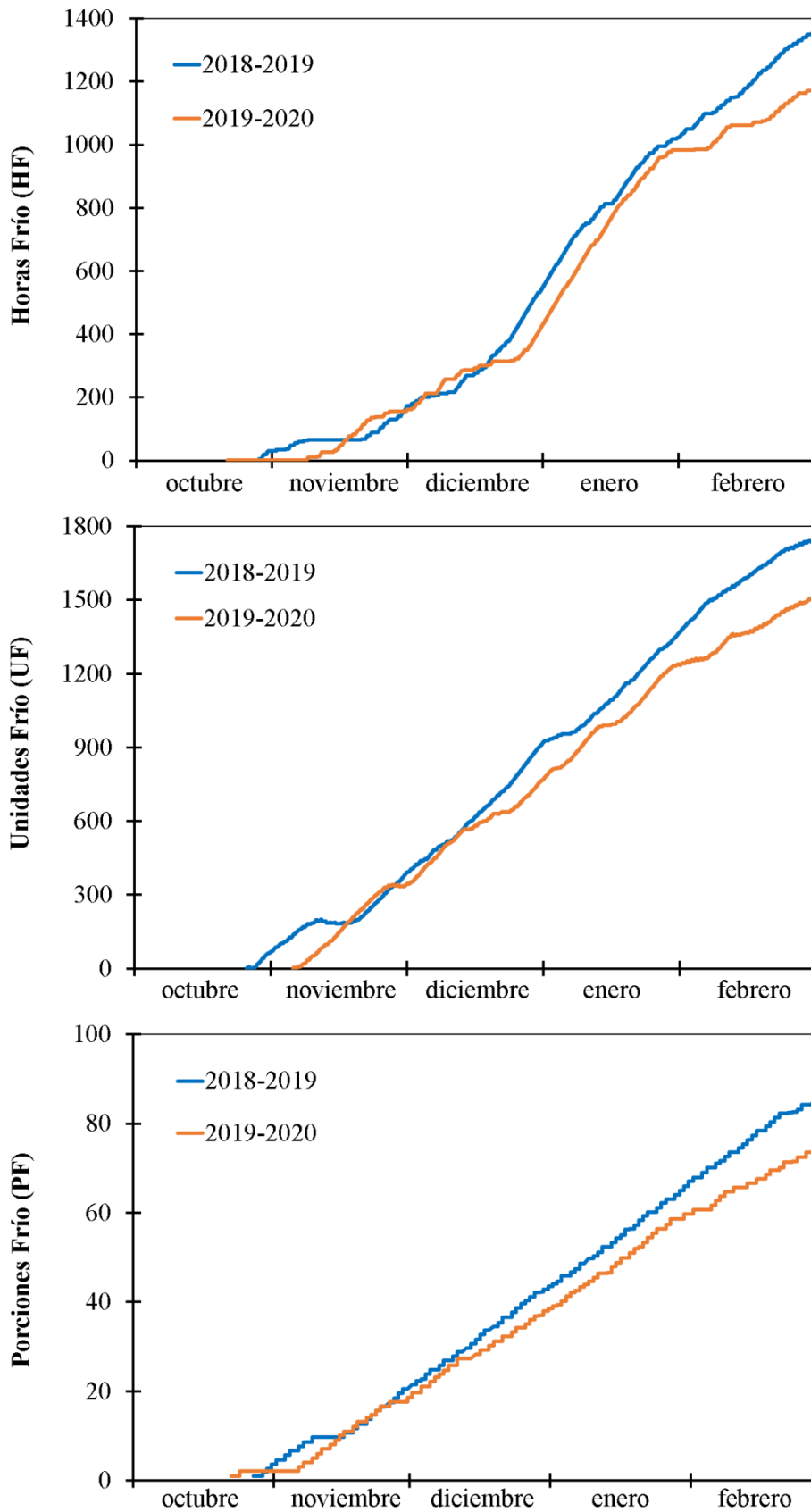


Figura 5. Acumulación de frío en Caspe, Zaragoza, según tres modelos (HF, UF y PF) durante dos años.

Las fechas de final de endodormancia fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,001$) entre accesiones y entre años para cada accesión. La salida de endodormancia ocurrió entre el 11 de diciembre y el 16 de enero en 2018-2019 y entre el 8 de diciembre y el 23 de enero en 2019-2020. La accesión IBP-15-19 fue la más temprana en cubrir sus necesidades de frío (8 de diciembre de 2020) y IBP-14-5 la más tardía (23 de enero de 2020) (Tabla 3).

Las necesidades de frío mostraron un amplio rango de necesidades de frío en los tres modelos: 249-890 HF, 527-1.146 UF y 27-55 PF (Tabla 3), con diferencias significativas entre accesiones ($p < 0,001$) en los os tres modelos. Se observó variabilidad para cada accesión entre los dos años, pero sólo hubo diferencias significativas en los modelos HF ($p < 0,01$) y UF ($p < 0,05$). La accesión con menos necesidades de frío fue IBP-15-19 (249 HF, 527 UF y 27 PF), y la más exigente IBP-14-5 (890 HF, 1.146 UF y 55 PF) (Tabla 3).

La plena floración (F50) ocurrió del 2 al 16 de marzo en 2019 y del 19 de febrero al 2 de marzo en 2020. Se observaron diferencias significativas entre accesiones ($p < 0,05$) y entre años para cada accesión ($p < 0,001$) (Tabla 3).

Las necesidades de calor variaron entre 5.471 ('IBP-53-10') y 7.876 GDH ('IBP-15-19'). No se observaron diferencias significativas entre accesiones, pero sí entre años ($p < 0,05$) (Tabla 3).

Las accesiones se clasificaron en los cuatro grupos de necesidades de frío [bajas, medias, altas, y muy altas (Tabla 4)] y los tres grupos de necesidades de calor [bajas, medias y altas (Tabla 5)] propuestos en el capítulo 3.

Tabla 3. Necesidades agroclimáticas para la salida de la endodormancia en 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza) y expresadas en horas frío, unidades frío, porciones frío y *growing degree hours* (GDH). Se muestran los valores anuales, la media y el coeficiente de variación (CV) (%) entre años (2018-2019).

Accesiones	Año	Fecha fin de endodormancia	Necesidades de frío									Fecha F50	Necesidades de calor		
			Horas frío			Unidades frío			Porciones frío				GDH		
			Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV		Valor	Media	CV
BBP-16-19	2018	20-dic	352	326	11	712	654	13	35,3	32,3	13	06-mar	6.545	6.965	9
	2019	16-dic	300			596			29,2			28-feb	7.384		
IberPlum 1	2018	11-dic	240	258	10	552	550	1	28,8	28	4	27-feb	5.766	6.414	14
	2019	11-dic	276			548			27,3			21-feb	7.062		
IberPlum 2	2018	11-dic	240	264	13	552	559	2	28,8	28	4	04-mar	6.834	7.098	5
	2019	12-dic	287			566			27,3			24-feb	7.363		
IberPlum 3	2018	11-dic	240	390	54	552	689	28	28,8	34,5	23	06-mar	7.233	6.164	25
	2019	03-ene	539			826			40,2			24-feb	5.096		
IberPlum 4	2018	12-dic	258	386	47	572	695	25	28,8	34	22	06-mar	7.191	6.507	15
	2019	02-ene	515			817			39,3			28-feb	5.823		
IberPlum 6	2018	11-ene	793	796	1	1.054	1.029	3	51,1	50	3	13-mar	7.104	6.706	8
	2019	15-ene	799			1.005			48,8			02-mar	6.307		
IberPlum 7	2018	28-dic	521	549	7	888	874	2	42,2	42,2	0	06-mar	6.261	6.019	6
	2019	05-ene	578			859			42,2			28-feb	5.777		
IberPlum 9	2018	03-ene	652	678	5	955	970	2	45,9	46,2	1	13-mar	7.415	6.536	19
	2019	11-ene	704			986			46,5			28-feb	5.658		
IberPlum 12	2018	11-dic	240	278	19	552	592	10	28,8	30	6	27-feb	5.766	6.242	11
	2019	20-dic	315			632			31,2			28-feb	6.718		
IBP-14-5	2018	16-ene	854	890	6	1.140	1146	1	55	55,2	0	13-mar	6.695	5.952	18
	2019	23-ene	927			1.152			55,4			28-feb	5.210		
IBP-15-4	2018	11-dic	240	366	49	552	684	27	28,8	33,9	21	13-mar	7.419	6.621	17
	2019	01-ene	491			815			39			28-feb	5.823		
IBP-15-8	2018	12-dic	258	314	26	572	646	16	28,8	32,4	16	13-mar	8.454	7.473	19
	2019	27-dic	371			720			36,1			02-mar	6.492		
IBP-15-19	2018	11-dic	240	249	5	552	527	7	28,8	26,7	11	06-mar	7.233	7.876	12
	2019	08-dic	258			501			24,7			28-feb	8.519		

Accesiones	Año	Fecha fin de endormancia	Necesidades de frío									Fecha F50	Necesidades de calor		
			Horas frío			Unidades frío			Porciones frío				GDH		
			Valor	Media	CV	Valor	Media	CV	Valor	Media	CV		Valor	Media	CV
IBP-15-21	2018	02-ene	628	690	13	949	970	3	44,6	45,6	3	13-mar	8.495	7.073	28
	2019	13-ene	752			991			46,6			28-feb	5.651		
IBP-16-9	2018	17-dic	301	476	52	661	794	24	33,7	38,8	19	13-mar	7.644	6.710	20
	2019	08-ene	650			928			44			28-feb	5.776		
IBP-16-10	2018	02-ene	628	651	5	949	949	0	44,6	44,7	0	13-mar	7.419	6.932	10
	2019	09-ene	674			949			44,7			02-mar	6.444		
IBP-16-13	2018	15-dic	280	292	6	626	622	1	31,6	30,9	3	06-mar	6.903	6.984	2
	2019	18-dic	305			618			30,2			28-feb	7.065		
IBP-16-14	2018	11-dic	240	445	65	552	740	36	28,8	36,7	31	02-mar	6.398	6.087	7
	2019	09-ene	650			928			44,7			28-feb	5.776		
IBP-16-18	2018	02-ene	628	603	6	949	904	7	44,6	43,4	4	13-mar	7.419	6.598	18
	2019	05-ene	578			860			42,2			28-feb	5.777		
IBP-17-11	2018	11-dic	240	251	6	552	540	3	28,8	27,3	8	06-mar	7.233	7.077	3
	2019	10-dic	262			527			25,7			19-feb	6.921		
IBP-21-22	2018	16-dic	289	366	30	641	711	14	32,6	35,3	11	04-mar	6.388	5.742	16
	2019	30-dic	443			781			38			24-feb	5.096		
IBP-53-10	2018	13-dic	270	296	12	594	629	8	29,6	31,9	10	27-feb	5.669	5.471	5
	2019	24-dic	322			664			34,3			24-feb	5.273		
IBP-53-11	2018	11-dic	240	264	13	552	559	2	28,8	28	4	23-feb	5.163	5.966	19
	2019	12-dic	287			566			27,3			19-feb	6.769		

ANOVA

Factor

Accesión	F	5,94	9,75	6,66	6,89	2,66	1,12
	p-value	2,0 ^{-04****}	6,3 ^{-06****}	9,9 ^{-05****}	7,8 ^{-05****}	0,022*	0,401 ns
Año	F	16,59	11,79	4,53	3,01	67,63	4,76
	p-value	7,0 ^{-04****}	0,002**	0,043*	0,099 ns	1,7 ^{-07****}	0,042*

Diferencias significativas: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; ns = no significativo.

Tabla 4. Clasificación de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen según sus necesidades de frío expresadas en porciones frío (PF), horas frío (HF) y unidades frío (UF).

Clasificación	Rango	Accesiones
Necesidades bajas	≤ 30 PF ≤ 300 HF ≤ 500 UF	IberPlum 1
		IberPlum 2
		IberPlum 12
		IBP-15-19
		IBP-17-11
		IBP-53-11
Necesidades medias	$31-40$ PF $301-500$ HF $501-700$ UF	BBP-16-19
		IberPlum 3
		IberPlum 4
		IBP-15-4
		IBP-15-8
		IBP-16-9
		IBP-16-13
		IBP-16-14
		IBP-21-22
		IBP-53-10
Necesidades altas	$41-50$ PF $501-700$ HF $701-900$ UF	IberPlum 6
		IberPlum 7
		IberPlum 9
		IBP-15-21
		IBP-16-10
		IBP-16-18
Necesidades muy altas	>50 PF >700 HF >900 UF	IBP-14-5

Tabla 5. Clasificación 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen según sus necesidades de calor expresadas en *growing degree hours* (GDH).

Clasificación	Rango	Accesiones
Necesidades bajas	≤6.000 GDH	IBP-14-5
		IBP-21-22
		IBP-53-10
		IBP-53-11
Necesidades medias	6.001-7.000 GDH	BBP-16-19
		IberPlum 1
		IberPlum 3
		IberPlum 4
		IberPlum 6
		IberPlum 7
		IberPlum 9
		IberPlum 12
		IBP-15-4
		IBP-16-9
		IBP-16-10
		IBP-16-13
		IBP-16-14
IBP-16-18		
Necesidades altas	>7.000 GDH	IberPlum 2
		IBP-15-8
		IBP-15-19
		IBP-15-21
		IBP-17-11

Las necesidades de frío estimadas en los tres modelos (HF, UF y PF) estuvieron correlacionadas con la fecha de salida de endodormancia, con coeficientes de correlación cercanos a 1,0 ($p < 0,01$). Las necesidades de calor se correlacionaron negativamente con las necesidades de frío ($R = -0,36^*$ a $-0,41^*$). La fecha de plena floración se correlacionó positivamente con las necesidades de calor (GDH) ($R = 0,50^{**}$), mientras que su correlación con las necesidades de frío no fue significativa ($R = 0,21$ a $0,28$) (Tabla 6, Figura 6).

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson e intervalos de confianza entre las necesidades de frío para salir de endodormancia [horas frío (HF), unidades frío (UF) y porciones frío (PF)], necesidades de calor para la floración [*growing degree hours* (GDH)], fechas de fin de endodormancia y fechas de plena floración (F50) de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora de ciruelo japonés Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza).

Variable	Horas frío (HF)	Unidades frío (UF)	Porciones frío (PF)	<i>Growing degree hours</i> (GDH)	Fecha de fin de endodormancia	Fecha F50
Horas frío (HF)	--					
Unidades frío (UF)	0,99** [0,97 - 0,99]	--				
Porciones frío (PF)	0,98** [0,97 - 0,99]	1,00** [0,99 - 1,00]	--			
<i>Growing degree hours</i> (GDH)	-0,36* [-0,61 - -0,04]	-0,39* [-0,63 - -0,08]	-0,41* [-0,64 - -0,10]	--		
Fecha de fin de endodormancia	0,97** [0,95 - 0,99]	0,98** [0,96 - 0,99]	0,97** [0,95 - 0,99]	-0,49** [-0,70 - -0,20]	--	
Fecha F50	0,21 ns [-0,12 - 0,49]	0,26 ns [-0,07 - 0,53]	0,28 ns [-0,04 - 0,55]	0,50** [0,21 - 0,70]	0,12 ns [-0,21 - -0,42]	--

Diferencias significativas: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. ns: no significativo

Los valores dentro de los corchetes representan el intervalo de confianza del 95 % para cada correlación.

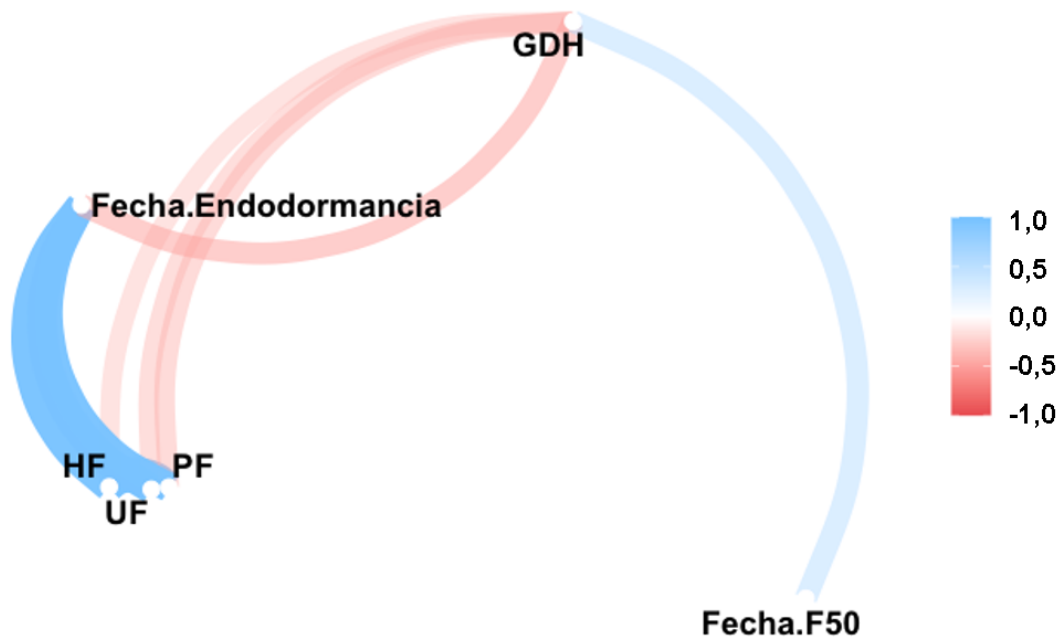


Figura 6. Red de correlaciones de Pearson entre: horas frío (HF), unidades frío (UF) y porciones frío (PF), *growing degree hours* (GDH), fecha de fin de endodormancia y fecha de plena floración (F50) de 23 accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen analizadas en Caspe (Zaragoza).

DISCUSIÓN

Se han analizado las necesidades de polinización (34 accesiones) y las necesidades agroclimáticas (23 accesiones) de un grupo de híbridos interespecíficos de ciruelo japonés pertenecientes al programa de mejora de Ibergen. Adicionalmente se establecieron las relaciones de inter-compatibilidad de 59 selecciones avanzadas del mismo programa de mejora.

Únicamente tres de las 34 accesiones analizadas resultaron ser autocompatibles, en una proporción similar a las variedades comerciales de ciruelo de tipo japonés (Capítulo 2; Guerra et al., 2009, 2020; Abdallah et al., 2019). Sin embargo, más de la mitad de las nuevas variedades de albaricoquero se han descrito como autocompatibles (Herrera et al., 2018a, 2018b; Lora et al., 2019). Conocer qué variedades han sido utilizadas como parentales en el programa de mejora permitiría establecer las causas que provocan que la mayoría de los híbridos interespecíficos analizados sean autoincompatibles, y relacionar si es debido a que los parentales son autoincompatibles o si hay algún mecanismo de incompatibilidad interespecífica como los descritos entre especies de *Prunus* (Morimoto et al., 2019). En tres accesiones se observaron muy pocos pistilos con tubos polínicos alcanzando la base del estilo, lo que hace necesario realizar más ensayos de autopolinización para determinar su auto(in)compatibilidad.

Los *primers* usados permitieron amplificar los alelos en la mayoría de las accesiones, mostrando buena transferibilidad entre especies. La mayoría de los alelos *S* identificados se corresponden con genotipos *S* ya descritos en ciruelo de tipo japonés (Beppu et al. 2003; Guerra et al. 2012; Guerra et al. 2009, 2011; Halász et al. 2007) y se han incluido en los grupos de incompatibilidad establecidos y en dos grupos nuevos que se han originado en este trabajo, XXVIII (*ScSk*) y XXIX (*ShSo*).

Aunque las accesiones se incluyeron en los grupos de incompatibilidad de ciruelo tipo japonés, es necesario confirmar las relaciones de inter-compatibilidad entre híbridos ciruelo × albaricoquero y variedades de ciruelo de tipo japonés mediante nuevos ensayos de polinización, para determinar si las relaciones filogenéticas entre especies influyen en los mecanismos de incompatibilidad interespecífica (Morimoto et al., 2019). La ausencia de estudios previos de incompatibilidad entre híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero hace necesaria la realización de nuevos estudios de fenotipado de la inter-compatibilidad para determinar si se mantienen las relaciones de compatibilidad inter-grupos y de incompatibilidad intra-grupos descritas en ciruelo japonés (Guerra et al., 2009, 2010, 2011, 2012, 2020) y albaricoquero (Herrera et al., 2018a, 2018b). Sin embargo, todos los cruzamientos utilizados como control mostraron intercompatibilidad cuando la accesión polinizada y las accesiones polinizadoras presentaban al menos un alelo diferente, lo que sugiere que estas relaciones se pueden mantener también en los híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero.

En la accesión BBP-4B-2-24 se identificó un genotipo *S* formado por cuatro alelos (*SbScSeSh*), lo que puede estar relacionado con el posible uso como parentales de otras especies de *Prunus* tetraploides, como *Prunus spinosa* L. o *Prunus cerasus* L. (Faust & Surányi, 2011). Ensayos adicionales con marcadores moleculares como *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Ahmad et al., 2004) permitirían establecer las relaciones genéticas de los híbridos interespecíficos con las especies de *Prunus* usadas como posibles parentales, y determinar si los híbridos analizados están más próximos al ciruelo o al albaricoquero.

La alta frecuencia de los alelos *Sb* y *Se* en los genotipos estudiados puede estar vinculada a la búsqueda de variedades autocompatibles, uno de los objetivos principales de los programas de mejora (Guerra et al., 2020; Herrera et al., 2021b). Estos dos alelos han sido relacionados con la autocompatibilidad en ciruelo japonés (Beppu et al., 2005,

2010; Guerra et al., 2009, 2011, 2020), aunque también están presentes en algunos de las accesiones autoincompatibles analizadas, así como en otras variedades de ciruelo de tipo japonés (Capítulo 2, Guerra & Rodrigo, 2015).

Para determinar si los dos nuevos alelos identificados ($S\epsilon$ y $S\theta$) son alelos de ciruelo japonés no descritos anteriormente o alelos de albaricoquero u otras especies de *Prunus*, sería necesario analizar su correspondencia con alelos de otras especies mediante el uso de primers específicos y/o trabajos adicionales de secuenciación. Por otro lado, el desarrollo de nuevos *primers* específicos en este tipo de híbridos facilitaría la identificación del segundo alelo en las accesiones en las que sólo se amplificó un alelo.

La acumulación de frío en los dos años fue suficiente para que todas las accesiones cubrieran sus necesidades de frío, mostrando una adaptación adecuada a la zona de estudio. Se observaron variaciones entre años en las necesidades de frío estimadas según los tres modelos (HF, UF y PF), pero sólo fueron estadísticamente significativas en los modelos de Weinberger (HF) y de Utah (UF). El modelo dinámico (PF) no presentó diferencias significativas entre años y por tanto fue el mejor adaptado a las condiciones del ensayo, confirmando que este modelo se adapta mejor a zonas de clima templado (Dennis, 2003; Campoy et al., 2012).

A pesar haber analizado pocas accesiones, las necesidades de frío presentaron un amplio rango de valores, posiblemente debido a su origen interespecífico. El rango fue similar al observado en ciruelo japonés (Capítulo 3, Tabuenca, 1967; Ruiz et al., 2018), pero menor que en albaricoquero (Tabuenca, 1968; Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2010, 2012; Viti et al., 2010; Razavi et al., 2011).

Las necesidades de calor resultaron similares a las determinadas en ciruelo de tipo japonés (Capítulo 3, Ruiz et al., 2018) y mayores que en albaricoquero (Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2012). La similitud de las necesidades agroclimáticas y la semejanza en la

morfología de las yemas florales entre híbridos interespecíficos y ciruelos de tipo japonés parece indicar que están más próximos al ciruelo que al albaricoquero.

En las accesiones estudiadas, las necesidades de frío más bajas se correspondieron con necesidades de calor altas, y viceversa, como se ha observado en las condiciones de Murcia tanto en ciruelo japonés (Ruiz et al., 2018) como en albaricoquero (Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2012). La fecha de plena floración estuvo determinada por las necesidades de calor, como lo observado en las accesiones de ciruelo de tipo japonés (Capítulo 3) y en variedades de almendro (Alonso et al., 2005) y cerezo (Fadón et al., 2021b) en las condiciones de Zaragoza. Sin embargo, en las condiciones más cálidas de Murcia, la fecha de plena floración en ciruelo japonés está más influenciada por las necesidades de frío (Ruiz et al., 2018).

La caracterización de las necesidades de polinización y las necesidades agroclimáticas de las accesiones de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero analizadas en este trabajo aporta información para la posible adaptación de las variedades a cada zona de cultivo, para la elección varietal en nuevas plantaciones y para la selección de parentales en los programas de mejora.

Las necesidades de polinización y necesidades agroclimáticas de los híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero determinadas en este capítulo parecen indicar que están más próximos al ciruelo que al albaricoquero. En los siguientes capítulos se va a estudiar la diversidad genética en accesiones de ciruelo de tipo japonés (capítulo 5) e híbridos interespecíficos (Capítulo 6) mediante microsatélites (*Simple Sequence Repeat*).

Tabla suplementaria 1. Comportamiento de los tubos polínicos en flores de 34 híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero del programa de mejora Ibergen polinizadas con mezcla de polen de otras accesiones. Pistilos con granos de polen germinados en el estigma, pistilos con tubos polínicos en la mitad y en la base del estilo, alcance máximo del estilo recorrido por el tubo polínico más largo y número de tubos polínicos alcanzando la base del estilo.

Accesiones	Pistilos con granos de polen germinados en el estigma (%)	Pistilos con tubos polínicos (%) en:		Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo (media)	Porcentaje de estilo recorrido por el tubo polínico más largo	Tubos polínicos en la base del estilo (media)
		mitad del estilo	base del estilo			
Aprium 30-14	100	100	100	100	100	3
BBP-16-19	100	87	40	72	100	2
IberPlum 1	100	100	100	100	100	1
IberPlum 2	80	92	92	96	100	2
IberPlum 4	100	86	29	64	100	3
IberPlum 7	90	100	100	100	100	2
IberPlum 9	90	100	100	100	100	3
IberPlum 10	100	100	100	100	100	3
IberPlum 11	100	100	100	100	100	3
IberPlum 12	100	70	70	87	100	2
IBP-14-5	82	89	89	88	100	3
IBP-15-4	95	81	76	85	100	2
IBP-15-8	82	100	94	99	100	2
IBP-15-16	100	100	100	100	100	3
IBP-15-19	86	94	33	78	100	2
IBP-15-21	73	94	81	88	100	2
IBP-16-9	100	100	100	100	100	1
IBP-16-13	100	70	50	62	100	1
IBP-16-14	90	100	33	78	100	3
IBP-16-17	100	100	100	100	100	2
IBP-19-14	100	100	100	100	100	3
IBP-21-1	100	100	46	85	100	4
IBP-21-22	90	100	100	100	100	4
IBP-26-1	100	100	100	100	100	4
IBP-32-17	100	70	70	88	100	1
IBP-32-18	100	100	100	100	100	1
IBP-53-11	100	100	100	100	100	2
IBP-3A-4-2	100	100	100	100	100	4
IberPlum 3	100	100	100	100	100	3
IBP-16-10	100	100	100	100	100	3
IBP-53-10	100	100	100	100	100	3
IberPlum 6	100	100	100	100	100	3
IBP-16-18	100	100	100	100	100	3
IBP-17-11	100	100	100	100	100	3



Objetivo 3. Diversidad genética.

CAPÍTULO 5

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF JAPANESE PLUM-TYPE (HYBRIDS OF *P. salicina*) ACCESIONS ASSESSED BY SSR MARKERS**Diversidad genética y estructura poblacional de accesiones de ciruelo de tipo japonés (híbridos de *P. salicina*) analizadas con marcadores SSR.**Publicado en *Agronomy* ¹**RESUMEN**





El ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) está ampliamente distribuido en zonas de clima templado de todo el mundo. Desde su introducción en Estados Unidos a finales del siglo XIX, esta especie se ha hibridado con más de 15 diferentes especies diploides de *Prunus*. El alto nivel de introgresión ha dado como resultado una amplia diversidad de características y comportamiento agronómico entre las variedades actualmente cultivadas. En este trabajo se analizaron 161 accesiones de ciruelo de tipo japonés mediante 8 marcadores *Single Sequence Repeats* (SSR) para determinar la diversidad genética y la estructura poblacional. Se detectaron un total de 104 alelos con una media de 13 alelos por locus. La media del Contenido de Información Polimórfica (PIC) para los marcadores SSR fue 0,75, indicando que los marcadores fueron altamente polimórficos. El dendrograma obtenido mediante *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic* (UPGMA) y los siete grupos inferidos mediante el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) revelaron una clara correlación de la estructura poblacional con el origen genealógico de las accesiones, respaldada por una significativa diferenciación genética entre grupos. Los resultados obtenidos en este trabajo proveen información útil para los mejoradores y para la conservación de recursos genéticos en bancos de germoplasma.

¹Este capítulo está publicado en:

Guerrero, B.I., Guerra, M.E., Herrera, S., Irisarri, P., Pina, A., Rodrigo, J. (2021) Genetic Diversity and Population Structure of Japanese Plum-Type (Hybrids of *P. salicina*) Accessions Assessed by SSR Markers. *Agronomy*, 11, 1748. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091748>.

Article

Genetic Diversity and Population Structure of Japanese Plum-Type (Hybrids of *P. salicina*) Accessions Assessed by SSR Markers

Brenda I. Guerrero ^{1,2,*} , M. Engracia Guerra ³, Sara Herrera ^{1,2}, Patricia Irisarri ^{1,2} , Ana Pina ^{1,2} 
and Javier Rodrigo ^{1,2} 

- ¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; sherreral@aragon.es (S.H.); pirisarri@aragon.es (P.I.); apina@aragon.es (A.P.); jrodrigo@aragon.es (J.R.)
² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
³ Departamento de Hortofruticultura, CICYTEX-Centro de Investigación 'Finca La Orden-Valdesequera', A-V, KM 372, 06187 Badajoz, Spain; mariaengracia.guerra@juntaex.es
* Correspondence: guerrero.bren@gmail.com; Tel.: +34-976-716-307

Abstract: Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) is widely distributed in temperate zones across the world. Since its introduction to USA in the late 19th century, this species has been hybridized with up to 15 different diploid *Prunus* species. This high level of introgression has resulted in a wide range of traits and agronomic behaviors among currently grown cultivars. In this work, 161 Japanese plum-type accessions were genotyped using a set of eight Simple Sequence Repeats (SSR) markers to assess the current genetic diversity and population structure. A total of 104 alleles were detected, with an average of 13 alleles per locus. The overall Polymorphic Informative Content (PIC) value of SSR markers was 0.75, which indicates that these SSR markers are highly polymorphic. The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic (UPGMA) dendrogram and the seven groups inferred by Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) revealed a strong correlation of the population structure to the parentage background of the accessions, supported by a moderate but highly significant genetic differentiation. The results reported herein provide useful information for breeders and for the preservation of germplasm resources.

Keywords: Japanese plum; DAPC; genetic structure; simple sequence repeat; microsatellites



Citation: Guerrero, B.I.; Guerra, M.E.; Herrera, S.; Irisarri, P.; Pina, A.; Rodrigo, J. Genetic Diversity and Population Structure of Japanese Plum-Type (Hybrids of *P. salicina*) Accessions Assessed by SSR Markers. *Agronomy* **2021**, *11*, 1748. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091748>

Academic Editor: Raffaele Testolin

Received: 30 July 2021

Accepted: 28 August 2021

Published: 30 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) belongs to the *Prunus* genus in the Rosaceae family [1], which includes around 430 species [2]. This crop was originated approximately in 300 B.C. in the Yangtze River basin in China, where wild populations can be currently found [3,4]. Japanese plum was introduced to Japan from China more than 2000 years ago [5]. In the late 19th century, it was introduced to California (USA) from Japan, so it was called “Japanese plum” [2,6]. Now, this crop is widely distributed in temperate zones across the world [4].

In California, Luther Burbank started Japanese plum modern breeding by intercrossing *P. salicina* with *Prunus simonii* Carr. and other native American diploid plums in order to improve its adaptation to local conditions [7]. A number of cultivars were released from these hybridizations, such as “Beauty”, “Burbank”, “Duarte”, “Eldorado”, “Formosa”, “Santa Rosa”, and “Wickson”, some of which are currently available and widely grown [2,5,6]. In these hybrids, *P. salicina* contributed to the improvement of fruit traits of size, flavor, color, and storability; *P. simonii* contributed to firm flesh and strong flavor; and the native American species such as *Prunus americana* Marsh. or *Prunus besseyi* Bailey contributed to disease resistance, tough skin, and aromatic quality [8]. In the southern United States, some of these cultivars were hybridized with the local *Prunus angustifolia*

Marsh., obtaining cultivars such as “Bruce” and “Six Weeks”. Later, breeding programs in the Southern Hemisphere used *Prunus cerasifera* Ehrh. as the parent to create early and cold-hardy hybrids, such as “Methley” in South Africa or “Wilson” in Australia [9].

At present, an important renewal of plant material is underway due to the introduction of a number of new Japanese plum-type cultivars from different breeding programs across the world. These efforts share goals such as productivity, fruit size and quality, extension of the harvest season, and adaptation to growing areas [6,10]. As result of breeding activity, the Community Plant Variety Office of the European Union (CPVO) registered 149 new Japanese plum cultivars from 1995 to 2020 [11]. The term “Japanese plum” now includes a heterogeneous group of interspecific hybrids [6] and few cultivars currently grown are pure *P. salicina*. The high variability generated by the interspecific crosses of *P. salicina* with up to 15 other *Prunus* species is reflected in the different behavior observed in the modern commercial cultivars [12–16].

The use of molecular markers for studies of diversity and population genetics on fruit tree species is steadily increasing [6] because they can be linked to specific alleles [17]. Genetic diversity can be analyzed using a wide array of molecular markers, such as Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), Amplification Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), Simple Sequence Repeats (SSR) [6], and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) [18,19]. During the past 20 years, SSR markers have emerged as a powerful tool for this type of study because they are highly informative, polymorphic, and codominant, and present transferability among close species [20,21].

Initial work with SSR markers in pome and stone fruits was carried out on the identification and the establishment of genetic relationships of apple (*Malus × domestica* Borkh.) genotypes [22–25]. The first SSR markers in *Prunus* species were developed in peach [*Prunus persica* (L) Batsch], verifying their transferability to other *Prunus* species [26]. Currently, most SSR markers available derive from cherry [27–30] and peach [26,31–33], although a small number have been developed in apricot [34] and Japanese plum [35]. They have been used to analyze the genetic diversity and to improve the management of plant genetic resources in almond [36–39], apricot [40,41], European plum [42,43], peach [44], and sweet cherry [45–47].

The significant variability observed in Japanese plum cultivars led to early diversity studies to estimate genetic relationships using isoenzymes [48], RAPDs [49,50], and SSR developed in Japanese plum [35] and other *Prunus* species [46,51–55]. However, the genetic diversity of the cultivars currently grown globally is unknown, because the previous studies were mainly focused on traditional cultivars. This study aims to determine: (i) the current genetic diversity, (ii) genetic relationships among cultivars, and (iii) population structure of a set of 161 Japanese plum-type accessions released from breeding programs from Israel, South Africa, Spain, and the United States.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

A total of 161 Japanese plum-type accessions, comprising traditional and modern commercial cultivars, advanced selections, and six reference genotypes of *P. salicina*, *P. cerasifera* and *P. simonii* from 27 breeding programs were evaluated. The plant material was obtained from different germplasm collections: the Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-La Orden) located in Badajoz (42 accessions); the Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) located in Zaragoza (74 accessions); the Asociación de Fruticultores de la Comarca de Caspe (AFRUCCAS) located in Caspe, Zaragoza (2 accessions); and the Viveros Mariano Soria located in La Almunia de Doña Godina, Zaragoza (43 accessions) (Table 1).

Table 1. Japanese plum-type accessions analyzed in this study.

Accessions	Origin	Accessions	Origin
606	Reedley Nursery, USA	P006	Provedo, Spain
A001	Unknown	P007	Provedo, Spain
A002	Unknown	Pioneer	ARC Infruitec, South Africa
Abundance	Imported from Japan	Plum Late	Unknown
African Pride	ARC Infruitec, South Africa	Prime Time	Wuhl, USA
African Rose	ARC Infruitec, South Africa	Queen Ann	USDA, USA
Alpha	Selected in New Jersey	Queen Rosa	USDA, USA
Ambra	Unknown	Red Beaut	Reedley Nursery, USA
Angeleno	Garabedian, USA	Redheart	Reedley Nursery, USA
AU Amber	Auburn University, USA	Royal Diamond	Kitahara Farms, USA
AU Road Side	Auburn University, USA	Royal Garnet	Reedley Nursery, USA
AU Rosa	Auburn University, USA	Royal Zee	Zaiger, USA
Autumn Giant	Zaiger, USA	Rubirosa	Zaiger, USA
Black Amber	USDA, USA	Ruby Crunch	ARC Infruitec, South Africa
Black Beaut	Reedley Nursery, USA	Ruby Queen	USDA, USA
Black Diamond	Superior Farming Co, USA	Ruby Star	ARC Infruitec, South Africa
Black Egg	Ben Dor, Israel	Ruby Sweet	USDA, USA
Black Gold	Superior Farming Co, USA	S001	Stargrow, South Africa
Black Late	Unknown	S002	Stargrow, South Africa
Black Ruby	USDA, USA	S003	Stargrow, South Africa
Black Satin	Zaiger, USA	S004	Stargrow, South Africa
Black Splendor	USDA, USA	S005	Stargrow, South Africa
Black Star	Unknown	S006	Stargrow, South Africa
Burmosa	USDA, USA	S007	Stargrow, South Africa
Byrongold	USDA, USA	S008	Stargrow, South Africa
Constante	Unknown	S009	Stargrow, South Africa
Crimson Glo	Zaiger, USA	S010	Stargrow, South Africa
D001	Unknown	S011	Stargrow, South Africa
D002	Unknown	S012	Stargrow, South Africa
D003	Unknown	S013	Stargrow, South Africa
D004	Unknown	S014	Stargrow, South Africa
D42	Ben Dor, Israel	S015	Stargrow, South Africa
Dapple Jack	Zaiger, USA	S016	Stargrow, South Africa
Earlmoon	Ben Dor, Israel	S017	Stargrow, South Africa
Earliqueen	Zaiger, USA	S018	Stargrow, South Africa
Early Fortune	Azienda Agricola Martelli, Italy	S019	Stargrow, South Africa
Ebony Rose	Zaiger, USA	S020	Stargrow, South Africa
Eldorado	Terry, USA	S021	Stargrow, South Africa
Emerald Drop	Zaiger, USA	S022	Stargrow, South Africa
Extremagold	Unknown	S023	Stargrow, South Africa
Formosa	Fancher Creek Nursery, USA	S024	Stargrow, South Africa
Fortune	USDA, USA	S025	Stargrow, South Africa
Freedom	USDA, USA	S026	Stargrow, South Africa
Friar	USDA, USA	S027	Stargrow, South Africa
Frontier	USDA, USA	S028	Stargrow, South Africa
Gaia	Azienda Agricola Martelli, Italy	S029	Stargrow, South Africa
GF81	INRA, Francia	S030	Stargrow, South Africa
Golden Globe	Zaiger, USA	S031	Stargrow, South Africa
Golden Japan	Imported from Japan	S032	Stargrow, South Africa
Golden Kiss	ARC Infruitec, South Africa	S033	Stargrow, South Africa
Golden Plumza	Vivai F.lli Zanzi, Italy	S034	Stargrow, South Africa
Green Sun	Chamberlin, USA	S035	Stargrow, South Africa
Grenadine	Zaiger, USA	S036	Stargrow, South Africa
HD	Ben Dor, Israel	S037	Stargrow, South Africa
Hiroimi Red	Zaiger, USA	S038	Stargrow, South Africa
Honey Crisp	Unknown	S039	Stargrow, South Africa
Honey Down	Stargrow, South Africa	S040	Stargrow, South Africa
Honey Lucas	Unknown	S041	Stargrow, South Africa
Honey Moon	Stargrow, South Africa	S042	Stargrow, South Africa

Table 1. Cont.

Accessions	Origin	Accessions	Origin
Honey Star	Stargrow, South Africa	Santa Rosa	Burbank, USA
Honey Sweet	INRA, Francia	Sapphire	ARC Infruitec, South Africa
Howard Sun	Agri Sun Nursery, USA	Simka	Coche D Simonian, USA
Joanna Red	Zaiger, USA	Simon	Simon Brothers, USA
John W	USDA, USA	Songold	ARC Infruitec, South Africa
Kelsey	Imported from Japan	Songria 10	Planasa, Spain
Laroda	USDA, USA	Songria 15	Planasa, Spain
Larry Ann	Topfruit, South Africa	Sordum	Imported from Japan
Late blue	Zaiger, USA	Souvenir	ARC Infruitec, South Africa
Mariposa	Armstrong Nursery, USA	Splash	Zaiger, USA
Mark	Ben Dor, Israel	Speckled Egg	Ben Dor, Israel
Methley	Burbank, USA	Sundew	ARC Infruitec, South Africa
Morris	Texas AM, USA	Sunkiss	ARC Infruitec, South Africa
Nubiana	USDA, USA	Sweet Treat	Zaiger, USA
October Red	Unknown	Tc Sun	Chamberlin, USA
Owen T	USDA, USA	Winner	Ben Dor, Israel
Ozark Premier	Missouri State Univ., USA	Z001	Zaiger, USA
P001	Provedo, Spain	Z002	Zaiger, USA
P002	Provedo, Spain	Z003	Zaiger, USA
P003	Provedo, Spain	Zanzi Sun	Unknown
P004	Provedo, Spain	Ziv	Ben Dor, Israel
P005	Provedo, Spain		

2.2. DNA Extraction and SSR Analysis

Young leaf samples were collected in spring and preserved in silica gel [56]. The dried leaves were ground on a TissueLysser (Qiagen, Hilden, Germany) prior to the DNA extraction. Genomic DNA was extracted following the protocol described by Hormaza [40] and using a Speedtools Plant DNA Extraction Kit (Biotools, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions [13,57,58]. Quantity and quality of DNA was assessed using a microvolume spectrophotometer NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Delaware, USA) and diluted at 10 ng/ μ L prior to PCR amplification [13].

A total of 13 SSR markers developed in Japanese plum, peach, and sweet cherry were used (Table 2). The DNA fragments were amplified using six sets of multiplex PCR reactions (M01 to M06). Each multiplex reaction was designed by combining the expected molecular size (pb) of the fragments amplified by each SSR primer pair and four fluorescent dyes (PET, 6-FAM, VIC, NED). Multiplex PCRs M01-M04 were performed in a final volume of 12.5 μ L, and M05 and M06 in a final volume of 11.5 μ L. A Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for all reactions according to the manufacturer's instructions, with different concentrations for each SSR marker (Table 2) and 10 ng of genomic DNA. The temperature profile used in M01 to M04 had an initial step of 15 min at 95 °C, 35 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 57 °C, and 2 min at 72 °C, and a final step of 30 min at 72 °C [31]. M05 and M06 were performed using the same conditions with modifications at the annealing temperature of 46 and 62 °C, respectively [35]. All PCR reactions were carried out using a SimplyAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were separated by capillary electrophoresis using a genetic analyzer ABI3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The amplified fragments were sized and scored with a size standard GeneScan 500LIZ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [57] on "Fragman" v. 1.0.9 [59], an R package [60] for fragment analysis and revised with the software PeakScanner v. 1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The genetic profiles were organized in a table in csv format for the subsequent analysis.

Table 2. Multiplex (Mp) design, SSR loci, linkage group (LG), fluorescent dyes, primer concentration (PC), PCR details, and characteristics of the 13 SSR markers analyzed in this study.

Mp	Locus	LG	Dye	PC (μ M)	Primer Sequence	SSR Motif	Size Range (bp)	Species
M01	CPPCT029 * [61]	G1	VIC	0.2	F: CCAAATTCCAAATCTCCTAACA R: TGATCAACTTTGAGATTTGTTGAA	(CT) ₂₄	170–194	Peach
	pchgms2 [30]	G4	6-FAM	0.2	F: GTCAATGAGTTCAGTGTACTACTC R: AATCATAACATCATTAGCCACTGC	(CT) ₂₄	130–200	Peach
	CPPCT033 [61]	G7	NED	0.2	F: TCAGCAAACACTAGAAACAAACC R: TTGCAATCTGGTTGATGTT	(CT) ₁₆	151	Peach
M02	UDP96-008 * [26]	G3	PET	0.3	F: TTGTACACACCCTCAGCCTG R: TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG	(CA) ₂₃	140–160	Sweet cherry
	UDP98-412 * [26]	G6	NED	0.15	F: AGGAAAAGTTTCTGCTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	(AG) ₂₈	100–140	Peach
	UDP98-409 * [26]	G8	6-FAM	0.3	F: GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC R: CGGACTCTTATCCTCTATCAACA	(AG) ₁₉	125–165	Peach
	UDP98-406 * [26]	G2	VIC	0.2	F: TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA R: ATGGGTCGTATGCACAGTCA	(AG) ₁₅	30–100	Peach
M03	BPPCT-007 [31]	G3	6-FAM	0.2	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	(AG) ₂₂ (CG) ₂ (AG) ₄	143–151	Peach
	UDP96-005 [26]	G1	VIC	0.3	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCACCCAG	(AC) ₁₆ TG(CT) ₂ CA(CT) ₁₁	100–250	Peach
M04	BPPCT-039 [31]	G3	PET	0.3	F: ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC R: GATGTCATGAAGATTGGAGAGG	(GA) ₂₀	148–158	Peach
	BPPCT-025 [31]	G6	VIC	0.3	F: TCCTGCGTAGAAGAAGGTAGC R: CGACATAAAGTCCAAATGGC	(GA) ₂₉	178–202	Peach
M05	CPSCT026 [35]	G7	6-FAM	0.3	F: TCTCACACGCTTTCGTCAAC R: AAAAAGCCAAAAGGGGTTGT	(CT) ₁₆	177–213	Japanese plum
M06	CPSCT005 [35]	G4	NED	0.3	F: CTGCAAGCACTGCGGATCTC R: CCCATATTCCCAACCCATTA	(CT) ₁₅	171–191	Japanese plum

* SSR excluded from subsequent analyses due to poor amplification.

2.3. Genetic Diversity Analysis and Genetic Relationships among Accessions

The analysis of genetic diversity and genetic relationships were performed using R software v. 3.6.0 (R Development Core and Team, 2020). For the genetic diversity and population structure analysis, the data of alleles generated by the SSR markers were converted to an object of the class *genind* using the “df2genind” function of the “adegenet” package v. 2.1.2 [62].

Number of alleles per locus (N_A), private alleles (P_A), Polymorphism Information Content (PIC), allelic richness (A_R), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and the F-statistics (F_{IS} and F_{ST}) were determined on the whole population and on each predetermined group using the packages: “adegenet” v. 2.1.2 [62]; “hierfstat” v. 0.5-7 [63]; “pegas” v. 0.13 [64]; and “PopGenReport” v. 3.0.4 [65]. The correlation matrix of the pairwise F_{ST} values was plotted with the package “corrplot” v. 0.90 [66].

A R script was developed to detect synonymies and homonymies in the data. Synonymies were identified by comparison of the allele data using the “duplicated” function to detect identical genetic profiles considered as synonymies. All accession names were also compared by the “duplicated” function to detect homonymies.

The genetic relationships among accessions were determined using an Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages (UPGMA) cluster analysis according to Nei and Li [67]. The “poppr” package v. 2.8.5 was used to generate an UPGMA dendrogram with a “bootstrap” supported by 1000 replicates [68]. The genetic structure was also analyzed using the “adegenet” package v. 2.1.2. [61] by a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC). The optimal number of groups (K) in the whole population was inferred using the “find.clusters” function according to the lowest Bayesian Information Criterion (BIC) value. A cross-validation function, “xvalDapc” [61], was used to determine the correct number of Principal Components (PCs) to be retained. An Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was conducted using the “poppr” package v. 2.8.5 to calculate the variance components among the inferred groups and among the accessions [68].

3. Results

3.1. SSR Genotyping

Eight of the 13 SSR primers pairs (62%) showed good amplification and were selected to evaluate the genetic diversity and population structure. The remaining five (CPPCT-029, UDP96-008, UDP98-406, UDP98-409, and UDP98-412) were excluded from the analysis due to null or poor amplification (Table 2). A total of 104 alleles were amplified using eight SSR primers across 161 Japanese plum-type accessions (155 commercial cultivars and selections, and six reference cultivars). The number of alleles per locus (N_A) ranged from nine (CPPCT033) to 16 (BPPCT007), with an average value of 13 and an allele size range of 93–208 pb. Polymorphism Information Content (PIC) values ranged between 0.56 (CPPCT033) and 0.84 (CPST005), with an average of 0.75 per locus. The lowest observed heterozygosity (H_o) was 0.45 for BPPCT039 and the highest was 0.85 for pchgms2 with a mean of 0.65 for all accessions. The values of expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.51 (CPPCT033) to 0.80 (CPST005), with an average of 0.68. The F statistics showed moderate population differentiations for each locus. F_{IS} varied from -0.13 (pchgms2) to 0.22 (BPPCT025) with a mean of 0.05, whereas F_{ST} ranged between 0.06 (CPST005 and UDP96005) to 0.30 for BPPCT039 with an average of 0.12 (Table 3).

Table 3. Number of alleles and allele size range in base pairs amplified by eight polymorphic SSR in Japanese plum-type accessions. Number of alleles (N_A), Polymorphism Information Content (PIC), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e), Inbreeding coefficient (F_{IS}), and Wright's Fixation index (F_{ST}).

Locus	N_A	Allele Size (bp)	PIC	H_o	H_e	F_{IS}	F_{ST}
pchgms2	11	130–170	0.77	0.85	0.75	−0.13	0.07
CPPCT033	9	129–147	0.56	0.47	0.51	0.07	0.15
BPPCT007	16	117–155	0.83	0.82	0.74	−0.11	0.13
BPPCT039	13	121–167	0.73	0.45	0.55	0.18	0.30
BPPCT025	13	140–194	0.75	0.52	0.67	0.22	0.13
CPSCT026	15	156–208	0.83	0.66	0.77	0.14	0.11
CPSCT005	13	165–193	0.84	0.76	0.80	0.05	0.06
UDP96005	14	93–153	0.67	0.68	0.68	0.00	0.06
Mean	13	-	0.75	0.65	0.68	0.05	0.12

3.2. Genetic Relationships among Accessions

The UPGMA dendrogram grouped the accessions into two major clusters supported by a strong bootstrap value (100) (Figure 1), allowing the identification of 159 genotypes and two pairs of synonymies (“Red Beaut” and “606”, “Fortune” and “Green Sun”). The clustering of the accessions by their SSR profile was consistent with the available parentage information (Supplementary Materials, Table S1), but weak correspondence with the program breeding or geographical origin was found. According to the dendrogram, “Black Satin” and the accession “S030” clustered separately, forming the smallest cluster (A). Cluster B was the largest cluster, comprising 152 accessions distributed in seven subclusters. The subcluster B1 comprised nine accessions, some of them derived from the same pedigree as “Methley”, “Morris”, and “AU Amber”, and the remaining accessions shared a common and known South African origin, with the exception of “Speckled Egg”. The subcluster B2 comprised a set of Californian cultivars of “Eldorado” (cultivar released by Luther Burbank), “Friar”, “Angeleno”, “Black Diamond”, “Royal Diamond”, and 19 other accessions, including “Alpha” (*Prunus maritima*). The subcluster B3 comprised 20 accessions, most of which were commercial cultivars and early selections from South Africa, such as “Sunkiss”, “Honey Sweet”, “Honey Down”, and “Honey Star”. The subcluster B4 comprised 22 accessions, including some commercial cultivars: “African Rose”, “Black Beaut”, “Crimson Glo”, “Earliqueen”, “Golden Kiss”, and “Souvenir”. The subcluster B5 was formed by two reference genotypes [“Abundance” (*P. salicina*) and “Simon” (*P. simonii*)] and 15 other accessions, including “Burmosa” and its descendants, “Red Beaut” and “606”. The subcluster B6 comprised eight accessions, including the reference genotypes of *P. salicina* “Kelsey” and “Formosa”, in addition to the traditional cultivars “Golden Japan” and “Songold”. The subcluster B7 encompassed 49 accessions and the reference genotype “Mariposa” (*P. salicina*). Finally, the cluster C comprised seven accessions, including two accessions from USA (“October Red” and “Sweet Treat”), four accessions from South Africa (“African Pride”, “Ruby Star”, “S018”, and “S026”), and the rootstock cultivar “GF81”.

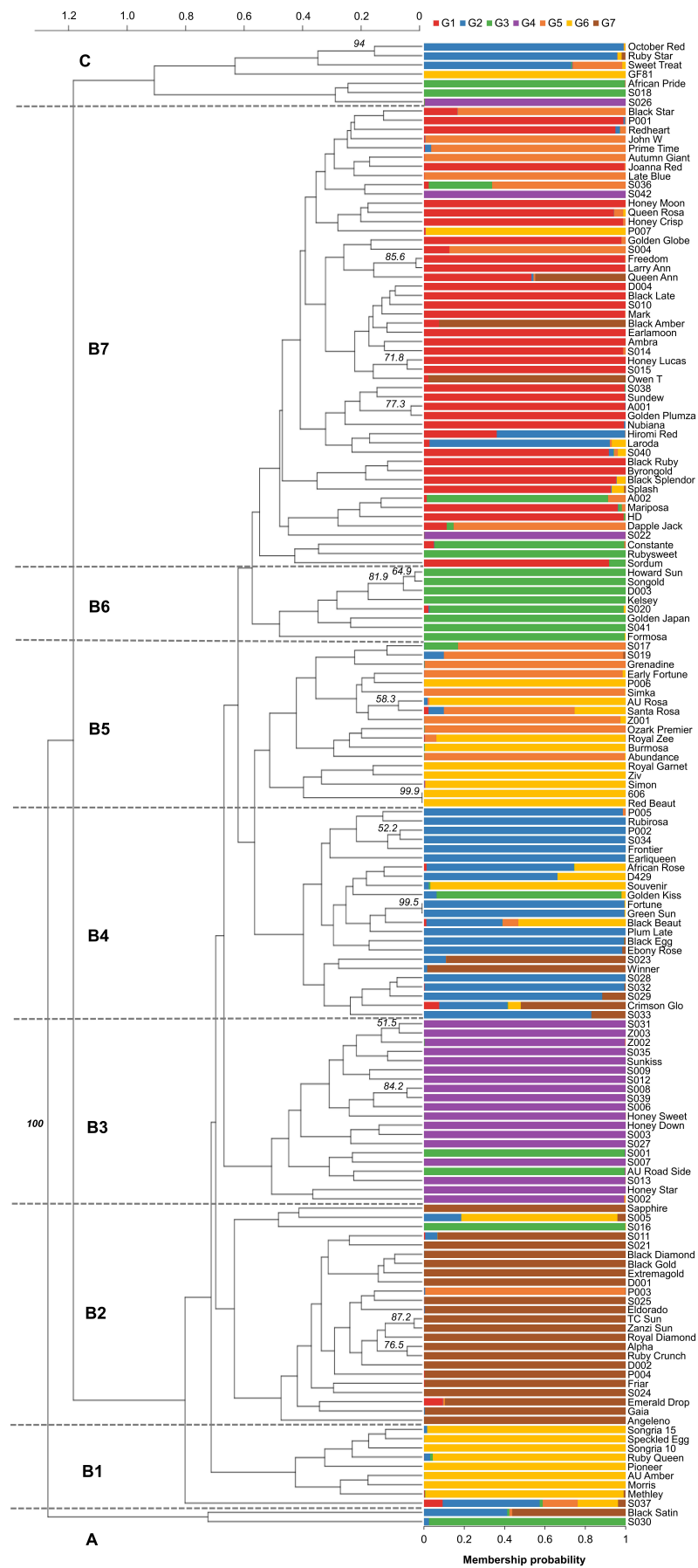


Figure 1. Genetic relationships and genetic structure from 161 Japanese plum-type accessions by

DAPC. The genetic relationships are represented by a UPGMA dendrogram created from 1000 bootstrap replications. Bootstrap values $>50\%$ are placed on the branches. The stacked bar charts represent different assigned groups with the following color codes: G1 = red, G2 = blue, G3 = green, G4 = purple, G5 = orange, G6 = yellow, and G7 = brown. The x -axis provides the probability of each accession belonging to the assigned group.

3.3. Analysis Genetic Structure

The genetic structure analyzed by DAPC showed a $K = 7$ value as the optimal clustering, according to the lowest BIC value. The optimal number of PCs to be retained for the subsequent analysis was 10 (Supplementary Materials, Figure S1). This scenario showed groups 1 to 3 and 5 to 7 (G1–G3 to G5–G7) overlapped, and group 4 (G4) clearly differentiated from them across the first two linear discriminant functions (LD1 and LD2) (Figure 2). The reports of the allele frequencies (loadings) in the dataset allowed determination of the contribution of alleles to the distribution of accessions in the DAPC scatterplot (Supplementary Materials, Figure S2).

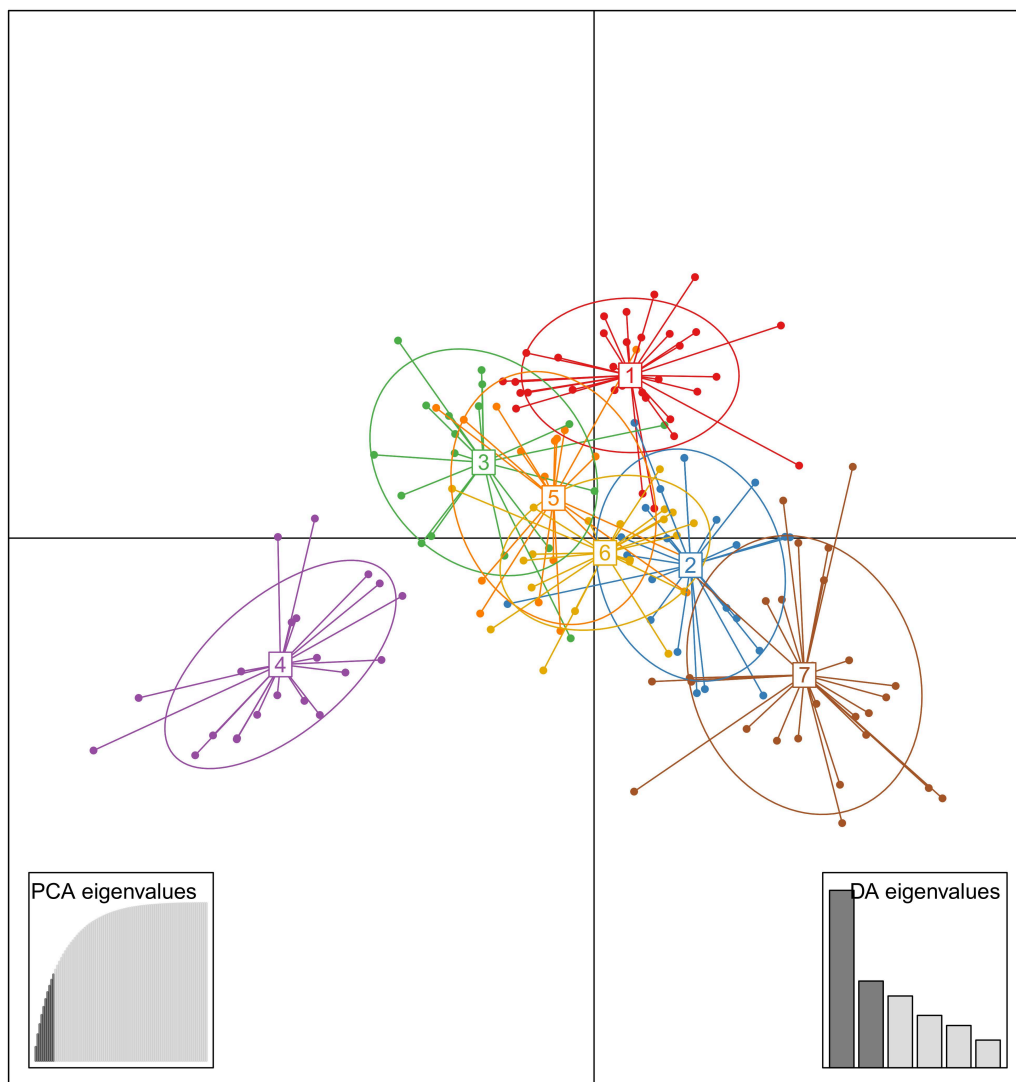


Figure 2. Scatterplot of DAPC of population structure of 161 Japanese plum-type accessions, showing the first two principal linear discriminants of the DAPC according to the optimal K value ($K = 7$). Each colored circle represents a group: G1 = red, G2 = blue, G3 = green, G4 = purple, G5 = orange, G6 = yellow, and G7 = brown. Each dot represents an accession. The insets represent the eigenvalues of the Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA).

The DAPC analysis allowed allocation of most of the accessions to their original group according to a membership probability up to 0.9, indicating clear-cut groups. However, some accessions showed lower membership probabilities, ranging from 0.3 to 0.7, which indicate some admixtures in the structured population (Figure 1). Group G1 comprised a set of 32 accessions (19.9%), including the *P. salicina* reference “Mariposa” and other commercial cultivars of “Black Splendor”, “Queen Rosa”, and “Queen Ann”. Group G2 comprised 23 accessions (14.3%), mostly cultivars from California (“Hiromi Red”, “Earliqueen”, “Frontier”, and “Green Sun”, among others) and South Africa (“African Rose”, “Ruby Star”, and some advanced selections). Group G3 ($n = 18$, 11.2%) included the two *P. salicina* genotype-references “Kelsey” and “Formosa”. Group G4 comprised 21 accessions (13%), most of modern cultivars (“Honey Down”, “Honey Star”, “Honey Sweet”, and “Sunkiss”), and some advanced selections from South Africa. A group of 18 accessions (11.2%) formed the group G5, including “Abundance” (*P. salicina*) and traditional cultivars of “John W”, “Santa Rosa” and “Simka”. The group G6 comprised 22 accessions (13.7%), including the genotype-reference “Simon” (*P. simonii*) and some accessions with *P. cerasifera* in their pedigree (“Methley”, “Morris”, and the rootstock “GF81”). Finally, group G7 was formed by 27 accessions (16.8%) and encompassed a high diversity of origins of the traditional cultivars “Angeleno”, “Black Diamond”, “Eldorado”, “Friar”, “TC Sun”, and “Zanzi Sun”.

3.4. Genetic Diversity among Groups

Significance variance differences ($p < 0.01$) were found within the accessions and the AMOVA showed that 81.8% of the total variance observed in the $K = 7$ scenario was also due to differences within accessions, 14.2% was due to differences among groups, and the remaining 4.0% was due to differences among accessions within groups (Table 4).

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) for 161 Japanese plum-type accessions clustered in seven groups.

Source of Variation	df	Sum of Square	Mean Sum of Square	% of the Variance	Phi
Among groups	6	281	46.9	14.2	0.182
Among accessions within groups	154	876	5.7	4.0	0.046
Within accessions	161	834	5.2	81.8 *	0.142
Total	321	1991	6.2	100.0	

* Significant values at $p < 0.01$ significance level.

The statistics of genetic diversity were calculated and summarized per group ($K = 7$) (Table 5). The number of alleles (N_A) per locus ranged from 6.25 (G4) to 7.63 (G2). The total number of alleles varied from 50 (G4) to 61 (G2). The allelic richness (A_R) ranged from 6.01 (G4) to 7.25 (G3). The highest number of private alleles (P_A), those present in only one group, was 10 (G2), and only one was observed in G5. Among the groups, the lowest H_o was determined in G1 (0.59), and the highest was observed in G3 and G7 (0.69). The lowest H_e was recorded in G1 (0.63), and the highest in G3 (0.73). All groups had Inbreeding Coefficient values (F_{IS}) close to zero, ranging from -0.01 (G7) to 0.15 (G6), showing no excess of homo- or hetero-zygotes.

To validate the genetic differentiation among the seven groups, the F_{ST} values based on Nei’s genetic distance among groups were determined (Figure 3). The overall pairwise F_{ST} values of 0.14 suggested a moderate differentiation between groups and varied from 0.11 (between G2 and G6) to 0.19 (between G4 and G7). Most of the groups with paired G4 exhibited higher F_{ST} values than the other pairs. All of these comparisons had non-zero lower and upper 99% confidence intervals (Supplementary Materials, Table S2).

Table 5. Statistics of genetic variation for 161 Japanese plum-type accessions clustered in seven groups. Number of accessions (n), Number of alleles (N_A), Number of private alleles (P_A), Allelic richness (A_R), Observed heterozygosity (H_o), Expected heterozygosity (H_e), Inbreeding coefficient (F_{IS}).

Group	n	N_A PER LOCUS	N_A TOTAL	A_R	P_A	H_o	H_e	F_{IS}
G1	32	7.38	59	6.06	3	0.59	0.63	0.04
G2	23	7.63	61	7.04	10	0.64	0.67	0.06
G3	18	7.25	58	7.25	2	0.69	0.73	0.05
G4	21	6.25	50	6.01	3	0.67	0.68	0.00
G5	18	7.13	57	7.13	1	0.66	0.66	0.00
G6	22	6.50	52	6.23	3	0.61	0.71	0.15
G7	27	6.75	54	6.17	4	0.69	0.69	−0.01

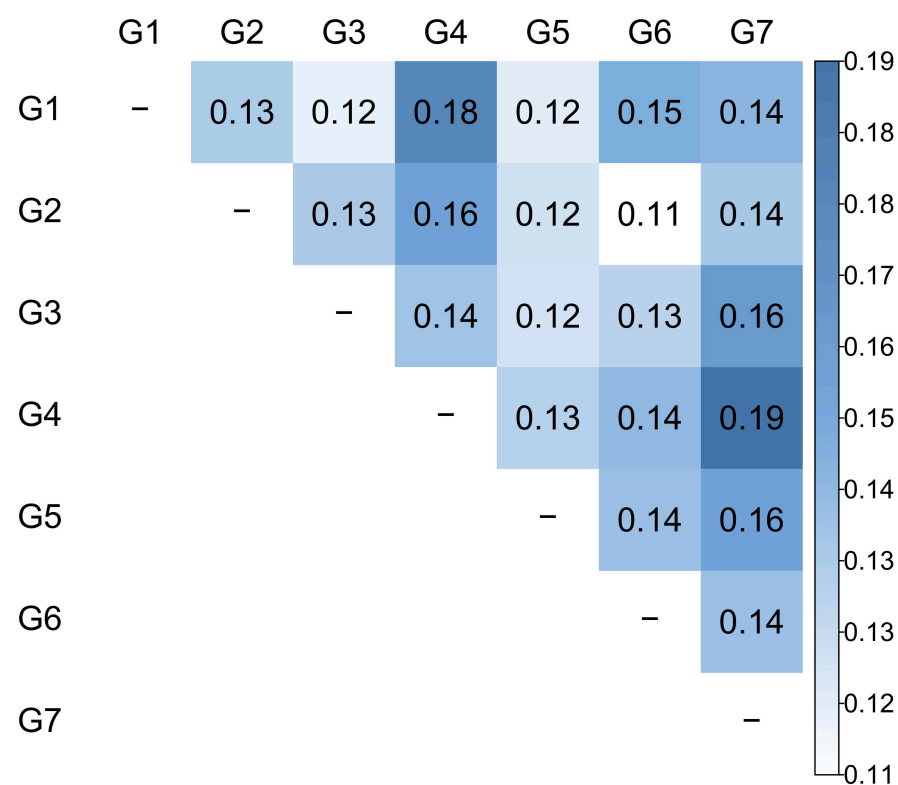


Figure 3. Weighted pairwise F_{ST} values estimated from the seven inferred groups ($K = 7$).

4. Discussion

The analysis of the genetic relationships and the genetic diversity in the germplasm analyzed, including 155 accessions and six Japanese plum-type reference-genotypes, by SSR markers, showed the correct amplification in eight of the 13 SSR markers used in this study, which were previously developed in Japanese plum [35], peach [26,30,31,61], and sweet cherry [26]. Although extrapolation of the results generated by this approach is complex due to the differences in the number of accessions and SSR markers used in the different studies [69], this approach has proven to be highly useful for cultivar identification because SSR are multi-allelic, codominant markers and most of them are transferable within *Prunus* species [31].

A total of 104 alleles were amplified by the set of SSR markers, emphasizing their high degree of polymorphism. Similar results were found in a previous study analyzing 47 accessions of Japanese plum using eight SSR markers ($N_{A\ TOTAL} = 104$, average of $N_{A\ PER\ LOCUS} = 13$) [51]. The PIC values for all loci found in this study were higher than 0.5, and therefore they were considered highly informative [70].

The observed heterozygosity found in this study was higher than that determined in previous reports in apricot ($H_o = 0.51$, 48 accessions, 31 SSR markers [40]), sweet cherry ($H_o = 0.49$, 76 accessions, 24 SSR markers [47]), and peach ($H_o = 0.47$, 50 accessions, 26 SSR markers [33]; $H_o = 0.45$, 28 accessions, 10 SSR markers [30]). This higher heterozygosity can be explained by the high number of accessions used in this study, and also by the high degree of introgression of the analyzed accessions, which mostly derived from interspecific crosses between the original species of *P. salicina* with up to 15 other *Prunus* species [12].

Genotypes were considered to be duplicated (synonymies) when they were paired on all alleles of the whole set of SSR markers. Two pairs of duplicates were found based on the SSR profile. "Red Beaut" showed 100% of similarity with "606" as expected, because "606" is a selection of cv. "Red Beaut" [15]. The other pair of duplicates was "Fortune" with "Green Sun", although both cultivars are well known and have different phenotypic characteristics [9]. Further research with samples of the same cultivars from other collections or additional SSR markers would be needed to distinguish them.

The UPGMA dendrogram arrangement indicated a stronger correlation with the parentage background (progenitors) of the accessions than their geographical or breeding program origin. The reference genotypes were allocated across the dendrogram, showing an introgression degree correlation. Two clusters (A and C) displayed a highly degree of admixture. The other cluster (B) was larger and divided into seven subclusters (B1 to B7). In subcluster B1, "Methley", "Morris", and "AU Amber" were allocated together, confirming their parentage with *P. cerasifera* [9]. In subcluster B2, several cultivars were closely related according to their pedigree, such as "Black Diamond" ("Angelino" \times OP), "Angelino" ("Eldorado" \times "Queen Ann") [55], and "Eldorado" (hybrid *P. salicina* \times *P. simonii*, [71]). The presence of "Royal Diamond" in this subcluster indicates its possible parentage with "Angelino", as has been previously suggested [9]. The closeness between "Alpha", a cultivar selected from wild trees of *P. maritima* Kerr. [72], and "Ruby Crunch" suggests possible common ancestry. The subcluster B3 was formed mostly by cultivars and selections from South Africa, where plum breeding represents a slightly different gene pool by the use of local cultivars as parents [9]. In B4, several cultivars with common genetic background were grouped: "African Rose", "Souvenir", and "Golden Kiss" from South Africa [13,73]; "Crimson Glo" and "Fortune" and their ancestors "Laroda" and "Queen Ann" [9]; "Rubirosa" and "Black Beaut" [74]. The subcluster B5 contained "Red Beaut" and its selection "606" [15] and comprised the reference genotypes "Mariposa" (*P. salicina*) and "Simon" (*P. simonii*), and their descendants "Santa Rosa" and its mutant "AU Rosa" [75]. "Red Beaut" and "Santa Rosa" were also grouped in the same subcluster in a previous report [76]. The closeness observed between "Burmosa" and "Red Beaut", in B5, and "Formosa", in B6, may be related to the use of "Formosa" as the parent of "Burmosa", which is the parent of "Red Beaut" [9]. Subcluster B6 comprises "Kelsey" (*P. salicina*) and its descendent "Songold", and "Howard Sun" and "Golden Japan", both cultivars with yellow flesh fruits, like "Songold" [6]. Subcluster B7 comprises a group of cultivars with common genetic background: "Laroda", "Black Amber", "Black Splendor" ("Black Amber" \times OP), and "Queen Rosa", descendants of "Santa Rosa" [9]; and "Mariposa", "Rubysweet" ("Mariposa" \times "Methley") [8], and "Byrongold", which are closely related to "Rubysweet" due to both having *P. cerasifera* in their parentage [9,49].

According to the DAPC clustering, the 161 accessions were distributed in seven groups, in which the main source of the total genetic variation was attributed to variance within accessions. The percentage variation among groups was low, resulting in high similarity among these groups. Six groups were clustered together and difficult to differentiate, which may be due to the use of the same cultivars as the parents in different breeding

programs, which could lead to a gene flow across the groups. Most genetic variation within groups rather than among groups has been also found in apricot accessions [41]. In almond, H_e values higher than H_o values, consistent with the results reported herein, have been attributed to the human selection and the exhausting breeding activity [37]. The highest values of P_A were found in G2, indicating that the cultivars in this group may have potential for use for breeding purposes to avoid bottleneck effects, and to be conserved in germplasm banks to maintain diversity [77–79]. In this study, moderate genetic diversity (H_e) was found in all groups and F_{IS} values ranged close to zero, indicating no excess of homo- or -hetero-zygotes. Similarly, F_{ST} values indicated a moderate degree of genetic differentiation [80], supporting the genetic structure obtained herein. The distribution of all accessions across the inferred seven groups corresponded with the genetic relationships observed in the UPGMA dendrogram, revealing a high correlation with the parentage background.

Further research is required to determine the optimal number of SSR markers needed for the analysis of genetic diversity and genetic structure. Although the addition of a new marker should not significantly affect the structure inferred by a sufficiently informative set of SSR [81], the optimal number of markers required to consistently infer the genetic structure in this and other fruit tree species remains unknown.

5. Conclusions

The SSR markers used herein were highly informative and revealed high genetic diversity within accessions. The entire population was structured in seven groups and confirmed the genetic relationships observed in the UPGMA dendrogram. Although a higher number of accessions were analyzed herein, the genetic diversity was similar to that of previous studies [46,51,53–55]. This may be due to the high number of modern cultivars and advanced selections of breeding programs analyzed, which reveal a bottleneck effect caused by the breeding system practices. The establishment of genetic relationships in Japanese plum-type accessions is highly complex due to their interspecific origin, but can be supported by the knowledge of the parentage lines in commercial cultivars. However, the genealogy of some of the ancestors widely used in most breeding programs is not available [5]. The use of chloroplast markers (cpDNA), and the application of next-generation sequencing technologies (NGS) and high-density SNP-based genotyping [19,76], may lead to additional insight into the degree of diversity among Japanese plum hybrids and the reconstruction of the genealogy of each cultivar.

The conservation of the native *Prunus* germplasm used in early plum breeding may help to maintain and improve the genetic diversity in Japanese plum-type cultivars. Unfortunately, only a few selections of this material are currently available for breeders [8]. The knowledge of the genetic diversity among Japanese plum-type accessions can enable more informed decisions by breeders for the selection of parents, to maintain biodiversity through germplasm conservation, and to find genotype–phenotype association patterns to be applied by producers and genetic research.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/agronomy11091748/s1>, Figure S1: Clustering and DAPC Cross-validation. (a) Inference of the optimal number of clusters in the 161 Japanese plum-type accessions and (b) DAPC cross-validation for the optimal number of Principal Components (PCs) retained for the analysis in the seven predefined groups. Figure S2: Loading plots for the alleles contributions to the (a) Linear Discriminant Function 1 (LD1) and (b) Linear Discriminant Function 2 (LD2) of the DAPC when $K = 7$. Each plot computes the most informative and contributing alleles to the discriminant analysis. Table S1. Genealogical information of the analyzed accessions in which it is available. Table S2. Lower limit (below the diagonal) and upper limit (above the diagonal) of the 99% confidence interval based on 1000 bootstrap replicates.

Author Contributions: Conceptualization, M.E.G., A.P. and J.R.; Data curation, B.I.G., S.H. and P.I.; Methodology, B.I.G. and P.I.; Writing—original draft, B.I.G., M.E.G., A.P. and J.R.; Writing—review & editing, B.I.G., M.E.G., S.H., P.I., A.P. and J.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RTA2017-00003-00); Agencia Estatal de Investigación (PID2020-115473RR-I00/AEI 436/10.13039/501100011033); Gobierno de Aragón—European Social Fund, European Union (Grupo Consolidado A12_17R), and Junta de Extremadura—Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Plan Regional de Investigación (IB16181), Grupo de Investigación (AGA001, GR18196). B.I. Guerrero was supported by a fellowship of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of México (CONACYT, 471839).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Rehder, A. *Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America: Exclusive of the Subtropical and Warmer Temperate Regions*, 2nd ed.; MacMillan: New York, NY, USA, 1940.
2. Faust, M.; Surányi, D. Origin and dissemination of plums. In *Origin and Dissemination of Prunus Crops: Peach, Cherry, Apricot, Plum and Almond*; Janick, J., Ed.; Horticultural Reviews: Gent-Oostakker, Belgium, 2011; pp. 139–186, ISBN 978-90-6605-436-3.
3. Yoshida, M. The origin of fruits. 2: Plums. *Fruit Japan* **1987**, *42*, 49–53. (In Japanese)
4. Okie, W.R.; Weinberger, J.H. Plums. In *Fruit Breeding. Volume 1: Tree and Tropical Fruits*; Janick, J., Moore, J.N., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, NY, USA, 1996; pp. 559–608.
5. Milošević, T.; Milošević, N. Plum (*Prunus* spp.) breeding. In *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*; Al-Khayri, J., Jain, S., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2018; Volume 3, pp. 165–215, ISBN 9783319919447.
6. Topp, B.L.; Russell, D.M.; Neumüller, M.; Dalbó, M.A.; Liu, W. Plum. In *Fruit Breeding*; Badenes, M.L., Byrne, D.H., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2012; pp. 571–621, ISBN 978-1-4419-0763-9.
7. Burbank, L. *Luther Burbank: His Methods and Discoveries and Their Practical Application*; Luther Burbank Press: New York, NY, USA, 1914; ISBN 3192400897.
8. Okie, W.R. Introgression of *Prunus* species in plum. *N. Y. Fruit Q.* **2006**, *14*, 29–37.
9. Okie, W.R.; Raming, D.W. Plum breeding worldwide. *Horttechnology* **1999**, *9*, 162–176. [[CrossRef](#)]
10. Batlle, I.; Iglesias, I.; Cantin, C.M.; Badenes, M.L.; Ríos, G.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J.; López-Corrales, M.; Guerra, M.E.; et al. Frutales de hueso y pepita. In *Influencia del Cambio Climático en la Mejora Genética de Plantas*; García-Brunton, J., Tornero, O., Cos-Terrer, J., Ruiz-García, L., Sanchez, E., Eds.; Sociedad Española de Ciencias Hortícolas: Murcia, Spain, 2018; pp. 79–132, ISBN 978-84-948233-8-1.
11. Community Plant Variety Office. CPVO Annual Statistics. Available online: <https://cpvo.europa.eu/> (accessed on 28 May 2021).
12. Guerra, M.E.; Rodrigo, J. Japanese plum pollination: A review. *Sci. Hortic.* **2015**, *197*, 674–686. [[CrossRef](#)]
13. Guerra, M.E.; Guerrero, B.I.; Casadomet, C.; Rodrigo, J. Self-(in)compatibility, S-RNase allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Sci. Hortic.* **2020**, *261*, 109022. [[CrossRef](#)]
14. Guerra, M.E.; Wunsch, A.; López-Corrales, M.; Rodrigo, J. Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* **2010**, *135*, 556–562. [[CrossRef](#)]
15. Guerra, M.E.; Rodrigo, J.; López-Corrales, M.; Wunsch, A. S-RNase genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breed.* **2009**, *128*, 304–311. [[CrossRef](#)]
16. Guerra, M.E.; Wunsch, A.; López-Corrales, M.; Rodrigo, J. Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2011**, *136*, 375–381. [[CrossRef](#)]
17. Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, A.M.; Fischer, M. Breeding apple (*Malus × domestica* Borkh). In *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*; Mohan, S., Priyadarshan, P.M., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 33–82, ISBN 978-0-387-71202-4.
18. Campoy, J.A.; Lerigoleur-Balsemin, E.; Christmann, H.; Beauvieux, R.; Girollet, N.; Quero-García, J.; Dirlwanger, E.; Barreneche, T. Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biol.* **2016**, *16*, 1–15. [[CrossRef](#)]
19. Mas-Gómez, J.; Cantín, C.M.; Moreno, M.; Prudencio, Á.S.; Gómez-Abajo, M.; Bianco, L.; Troggio, M.; Martínez-Gómez, P.; Rubio, M.; Martínez-García, P.J. Exploring genome-wide diversity in the national peach (*Prunus persica*) germplasm collection at CITA (Zaragoza, Spain). *Agronomy* **2021**, *11*, 481. [[CrossRef](#)]
20. Mason, A.S. SSR genotyping. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1245*, 77–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lucia, M.; Vieira, C.; Santini, L.; Diniz, A.L.; Munhoz, C.D.F. Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genet. Mol. Biol.* **2016**, *39*, 312–328. [[CrossRef](#)]
22. Guilford, P.; Prakash, S.; Zhu, J.M.; Rikkerink, E.; Gardiner, S.; Bassett, H.; Forster, R. Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* **1997**, *94*, 249–254. [[CrossRef](#)]

23. Hokanson, S.C.; Szewc-McFadden, A.K.; Lamboy, W.F.; McFerson, J.R. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* **1998**, *97*, 671–683. [[CrossRef](#)]
24. Pereira-Lorenzo, S.; Ramos-Cabrera, A.M.; Díaz-Hernández, M.B. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus × domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **2007**, *54*, 405–420. [[CrossRef](#)]
25. Cabe, P.R.; Baumgarten, A.; Onan, K.; Luby, J.J.; Bedford, D.S. Using microsatellite analysis to verify breeding records: A study of “Honeycrisp” and other cold-hardy apple cultivars. *HortScience* **2005**, *40*, 15–17. [[CrossRef](#)]
26. Cipriani, G.; Lot, G.; Huang, W.G.; Marrazzo, M.T.; Peterlunger, E.; Testolin, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: Isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* **1999**, *99*, 65–72. [[CrossRef](#)]
27. Cantini, C.; Iezzoni, A.F.; Lamboy, W.F.; Boritzki, M.; Struss, D. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2001**, *126*, 205–209. [[CrossRef](#)]
28. Downey, S.L.; Iezzoni, A.F. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, *125*, 76–80. [[CrossRef](#)]
29. Struss, D.; Ahmad, R.; Southwick, S.M.; Boritzki, M. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2003**, *128*, 904–909. [[CrossRef](#)]
30. Sosinski, B.; Gannavarapu, M.; Hager, L.D.; Beck, L.E.; Kling, J.J.; Ryder, C.D.; Rajapakse, S.; Baird, W.V.; Ballard, R.E.; Abbot, A.G. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* **2000**, *101*, 421–428. [[CrossRef](#)]
31. Dirlwanger, E.; Cosson, P.; Tavaud, M.; Aranzana, M.; Poizat, C.; Zanetto, A.; Arús, P.; Laigret, F. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2002**, *105*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ding, M.; Wang, K.; Wang, W.; Chen, M.; Wu, D.; Xu, C.; Chen, K. Development of high quality EST-SSR markers without stutter bands in peach and their application in cultivar discrimination and hybrid authentication. *HortScience* **2017**, *52*, 24–30. [[CrossRef](#)]
33. Testolin, R.; Marrazzo, T.; Cipriani, G.; Quarta, R.; Verde, I.; Dettori, M.T.; Pancaldi, M.; Sansavini, S. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* **2000**, *43*, 512–520. [[CrossRef](#)]
34. Messina, R.; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Cipriano, G.; Testolin, R. New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Mol. Ecol. Notes* **2004**, *4*, 432–434. [[CrossRef](#)]
35. Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Howad, W.; Badenes, M.L.; Arús, P. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Mol. Ecol. Notes* **2004**, *4*, 163–166. [[CrossRef](#)]
36. Sánchez-Pérez, R.; Ballester, J.; Dicenta, F.; Arús, P.; Martínez-Gómez, P. Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Sci. Hortic.* **2006**, *108*, 310–316. [[CrossRef](#)]
37. Halász, J.; Kodad, O.; Galiba, G.M.; Skola, I.; Ercisli, S.; Ledbetter, C.A.; Hegedűs, A. Genetic variability is preserved among strongly differentiated and geographically diverse almond germplasm: An assessment by simple sequence repeat markers. *Tree Genet. Genomes* **2019**, *15*, 12. [[CrossRef](#)]
38. Aranzana, M.; Pineda, A.; Cosson, P.; Dirlwanger, E.; Ascasibar, J.; Cipriani, G.; Ryder, C.D.; Testolin, R.; Abbot, A.; King, G.J.; et al. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor. Appl. Genet.* **2003**, *106*, 819–825. [[CrossRef](#)]
39. Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Audergon, J.M.; Arús, P. *Prunus* microsatellite marker transferability across Rosaceous crops. *Tree Genet. Genomes* **2010**, *6*, 689–700. [[CrossRef](#)]
40. Hormaza, J.I. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.* **2002**, *104*, 321–328. [[CrossRef](#)]
41. Bourguiba, H.; Scotti, I.; Sauvage, C.; Zhebentyayeva, T.; Ledbetter, C.; Krška, B.; Remay, A.; D’Onofrio, C.; Iketani, H.; Christen, D.; et al. Genetic structure of a worldwide germplasm collection of *Prunus armeniaca* L. reveals three major diffusion routes for varieties coming from the species’ center of origin. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 638. [[CrossRef](#)]
42. Urrestarazu, J.; Errea, P.; Miranda, C.; Santesteban, L.G.; Pina, A. Genetic diversity of Spanish *Prunus domestica* L. germplasm reveals a complex genetic structure underlying. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195591.
43. Gharbi, O.; Wunsch, A.; Rodrigo, J. Characterization of accessions of “Reine Claude Verte” plum using *Prunus* SSR and phenotypic traits. *Sci. Hortic.* **2014**, *169*, 57–65. [[CrossRef](#)]
44. Sittler, V.; Zhang, D.; Dhekney, S.A.; Harris, D.L.; Yadav, A.K.; Okie, W.R. Cultivar identification, pedigree verification, diversity analysis among peach cultivars simple sequence repeat markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2012**, *137*, 114–121. [[CrossRef](#)]
45. Wunsch, A. Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Sci. Hortic.* **2009**, *120*, 348–352. [[CrossRef](#)]
46. Öz, M.H.; Vurgun, H.; Bakir, M.; Büyük, I.; Yüksel, C.; Ünlü, H.M.; Çukadar, K.; Karadoğan, B.; Köse, Ö.; Ergül, A. Molecular analysis of East Anatolian traditional plum and cherry accessions using SSR markers. *Genet. Mol. Res.* **2013**, *12*, 5310–5320. [[CrossRef](#)]
47. Wunsch, A.; Hormaza, J.I. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* **2002**, *89*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Byrne, D.H.; Littleton, T.G. Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1988**, *113*, 918–924.
49. Boonprakob, U.; Byrne, D.H.; Graham, C.J.; Smith, B.R. Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2001**, *126*, 451–461. [[CrossRef](#)]
50. Qiao, Y.S.; Fang, J.G.; Cong, Y.; Zhou, J.; Zhang, Z. Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. *Acta Hortic.* **2007**, *763*, 177–183. [[CrossRef](#)]
51. Klabunde, G.H.F.; Dalbó, M.A.; Nodari, R.O. DNA fingerprinting of Japanese plum (*Prunus salicina*) cultivars based on microsatellite markers. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2014**, *14*, 139–145. [[CrossRef](#)]
52. Nyawo, T.A. Fingerprinting and Molecular Characterisation of ARC's Apricot and Plum Collection. Master's Thesis, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa, 2017.
53. Carrasco, B.; Díaz, C.; Moya, M.; Gebauer, M.; García-González, R. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. *Cienc. Investig. Agrar.* **2012**, *39*, 533–543. [[CrossRef](#)]
54. Abdallah, D.; Baraket, G.; Perez, V.; Ben Mustapha, S.; Salhi-Hannachi, A.; Hormaza, J.I. Analysis of self-incompatibility and genetic diversity in diploid and hexaploid plum genotypes. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 896. [[CrossRef](#)]
55. Ahmad, R.; Potter, D.; Southwick, S.M. Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2016**, *79*, 164–169. [[CrossRef](#)]
56. Pérez, V.; Larrañaga, N.; Abdallah, D.; Wünsch, A.; Hormaza, J.I. Genetic diversity of local peach (*Prunus persica*) accessions from La Palma Island (Canary Islands, Spain). *Agronomy* **2020**, *10*, 457. [[CrossRef](#)]
57. Guerra, M.E.; López-Corrales, M.; Wünsch, A. Improved S-genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum. *Euphytica* **2012**, *186*, 445–452. [[CrossRef](#)]
58. Guerrero, B.I.; Guerra, M.E.; Rodrigo, J. Establishing pollination requirements in Japanese plum by phenological monitoring, hand pollinations, fluorescence microscopy and molecular genotyping. *J. Vis. Exp.* **2020**, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Covarrubias-Pazarán, G.; Diaz-Garcia, L.; Schlautman, B.; Salazar, W.; Zalapa, J. Fragman: An R package for fragment analysis. *BMC Genet.* **2016**, *17*, 1–8. [[CrossRef](#)]
60. Team, R.C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2020. Available online: <https://www.r-project.org/> (accessed on 20 July 2021).
61. Aranzana, M.J.; García-Mas, J.; Carbó, J.; Arús, P. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breed.* **2002**, *121*, 87–92. [[CrossRef](#)]
62. Jombart, T. Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 1403–1405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Goudet, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Mol. Ecol. Notes* **2005**, *5*, 184–186. [[CrossRef](#)]
64. Paradis, E. Pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 419–420. [[CrossRef](#)]
65. Adamack, A.; Gruber, B. PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods Ecol. Evol.* **2014**, *5*, 384–387. [[CrossRef](#)]
66. Wei, T.; Simko, V. R Package “Corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix, Version 0.90. 2021. Available online: <https://github.com/taiyun/corrplot> (accessed on 25 July 2021).
67. Nei, M.; Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5269–5273. [[CrossRef](#)]
68. Kamvar, Z.N.; Tabima, J.F.; Grünwald, N.J. Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2014**, *2*, e281. [[CrossRef](#)]
69. Wünsch, A.; Hormaza, J.I. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* **2002**, *125*, 59–67. [[CrossRef](#)]
70. Botstein, D.; White, R.; Skolnick, M.; Davis, R. Construction of a linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **1980**, *32*, 314–331. [[PubMed](#)]
71. Howard, W.L. *Luther Burbank's Plant Contributions*; University of California: Berkeley, CA, USA, 1945.
72. Hedrick, U.P. *The Plums of New York*; J.B. Lyon Company, State Printers: Albany, NY, USA, 1911.
73. Agricultural Research Council. Product Catalogue. Available online: <https://www.arc.agric.za/arc-infruitec-nietvoorbij/Pages/Product-Catalogue.aspx> (accessed on 26 June 2021).
74. Okie, W.R. Register of new fruit and nut varieties. *HortScience* **2019**, *39*, 1509–1523. [[CrossRef](#)]
75. Jain, S.M.; Priyadarshan, P.M. *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*, 1st ed.; Springer: New York, NY, USA, 2009; ISBN 9780387712031.
76. García-Gómez, B.; Razi, M.; Salazar, J.A.; Prudencio, A.S.; Ruiz, D.; Dondini, L.; Martínez-Gómez, P. Comparative analysis of SSR markers developed in exon, intron, and intergenic regions and distributed in regions controlling fruit quality traits in *Prunus* species: Genetic diversity and association studies. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2018**, *36*, 23–35. [[CrossRef](#)]
77. Kalinowski, S.T. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* **2004**, *5*, 539–543. [[CrossRef](#)]
78. Lee, K.J.; Lee, J.R.; Sebastin, R.; Shin, M.J.; Kim, S.H.; Cho, G.T.; Hyun, D.Y. Genetic diversity assessed by genotyping by sequencing (GBS) in watermelon germplasm. *Genes* **2019**, *10*, 822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

-
79. Lee, K.J.; Lee, J.R.; Sebastin, R.; Cho, G.T.; Hyun, D.Y. Molecular genetic diversity and population structure of ginseng germplasm in RDA-geneBank: Implications for breeding and conservation. *Agronomy* **2020**, *10*, 68. [[CrossRef](#)]
 80. Wright, S. Evolution and the genetics of populations. In *Variability within and among Natural Populations*; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 1978.
 81. Urrestarazu, J.; Royo, J.B.; Santesteban, L.G.; Miranda, C. Evaluating the influence of the microsatellite marker set on the genetic structure inferred in *Pyrus communis* L. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0138417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

CAPÍTULO 6

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE NUEVAS VARIEDADES Y SELECCIONES AVANZADAS DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE CIRUELO × ALBARICOQUERO

RESUMEN

Existen numerosos programas de mejora en varios países que realizan hibridaciones interespecíficas entre especies del género *Prunus*. Los híbridos interespecíficos más extendidos son los ciruelo × albaricoquero, que incluyen plumcots, pluots y apriums. En este capítulo se analizaron 115 accesiones de híbridos interespecíficos de diferentes programas de mejora y 27 genotipos de referencia de albaricoqueros y ciruelos diploides mediante 8 marcadores *Single Sequence Repeats* (SSR). Se obtuvieron 149 alelos en total con una media de 19 alelos por locus y una media del Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 0,81, indicando un alto grado de polimorfismo de los SSR. El análisis genético ha permitido identificar 141 genotipos distintos y dos sinonimias. El dendrograma *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages* (UPGMA) y la estructura poblacional inferida en cinco grupos mediante el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) revelaron una diferenciación genética bastante marcada entre los albaricoqueros y el resto de las accesiones. La gran mayoría de híbridos interespecíficos se agruparon con los genotipos de referencia de ciruelo japonés. Los grupos inferidos, excepto el compuesto por albaricoqueros, mostraron una moderada diferenciación genética debido al flujo de genes entre ellos. Este alejamiento entre los híbridos interespecíficos y los albaricoqueros puede ser debido a la realización de reiterados retrocruzamientos con ciruelo de los híbridos simples ciruelo × albaricoquero en los programas de mejora. Esta información se corresponde con la morfología y el comportamiento agronómico observados en los híbridos interespecíficos, que son más parecidos al ciruelo que al albaricoquero.

INTRODUCCIÓN

El género *Prunus* es uno de los géneros más diversos dentro de la familia *Rosaceae*, con especies de gran interés comercial como *Prunus armeniaca* L. (albaricoquero), *Prunus avium* L. (cerezo), *Prunus domestica* L. (ciruelo europeo), *Prunus dulcis* Mill. (almendro), *Prunus persica* (L.) Batsch (melocotonero) y *Prunus salicina* Lindl. (ciruelo japonés) (Faust et al., 2011). La gran afinidad entre algunas especies de este género hace que se desarrollen hibridaciones interespecíficas sin mucha dificultad (Hedrick, 1911) e incluso de forma natural, ya que se han cultivado híbridos espontáneos de *Prunus* durante generaciones en varias regiones del mundo, como los híbridos *P. armeniaca* × *Prunus cerasifera* Ehrh, cultivados tradicionalmente en el suroeste de Asia (Okie, 2006). Estos híbridos, también conocidos como ‘albaricoques negros’, son tan abundantes que se han clasificado como una especie diferente, *P. dasycarpa* Ehrh.’ (Manaresi, 1950).

Entre finales del siglo XIX y principios del siglo XX, Luther Burbank obtuvo más de 100 variedades a partir de cruces interespecíficos entre *P. salicina* y al menos 15 especies diferentes, incluyendo híbridos y especies nativas de ciruelos diploides (Karp, 2015). Las variedades de ciruelo de tipo japonés que se cultivan en la actualidad no pertenecen a una sola especie, sino que se trata de las variedades procedentes de las primeras hibridaciones realizadas por Burbank y las posteriores realizadas por los programas de mejora de la actualidad (Okie, 2006). Burbank también realizó hibridaciones entre ciruelos y albaricoqueros, a cuyas descendencias denominó ‘plumcots’ [combinando los términos en inglés *plum* (ciruelo) y *apricot* (albaricoquero)] (Hedrick, 1911), introduciendo a inicios del siglo XX las primeras variedades comerciales, Apex (Okie, 2005) y Rutland (Hedrick, 1911).

En la actualidad, existen numerosos programas de mejora en varios países que realizan hibridaciones interespecíficas entre especies del género *Prunus*, para conseguir nuevas variedades autocompatibles y resistentes al virus del Sharka (Nicolás-Almansa et al., 2020) y frutos atractivos y con un contenido alto de azúcares (Brantley, 2004). Se suelen usar *P. salicina* y *P. cerasifera* como parentales femeninos, para asegurar el cuajado de fruto y obtener un mayor número de descendencias (Ramming, 1976; Nicolás-Almansa et al., 2021), y *P. armeniaca*, *P. persica* y *P. avium* como parentales masculinos (Milošević & Milošević, 2018). Los plumcots son los híbridos interespecíficos más extendidos, con variedades como Red Velvet, Royal Velvet, Flavor Supreme y Flavor Queen (Okie, 2005). Estos híbridos son muy apreciados porque combinan la firmeza de la pulpa del fruto, el amplio rango del periodo de floración y de maduración del ciruelo japonés con el aroma y el sabor de fruto del albaricoquero (Topp et al., 2012). Aunque presentaron buena la calidad sensorial, las primeras obtenciones de plumcots eran poco productivas y no se cultivaron a gran escala (Okie, 2005; Milošević & Milošević, 2018).

A través de retro- e inter-cruzamientos entre plumcots, albaricoqueros y ciruelos de tipo japonés se ha conseguido obtener variedades de interés comercial (Topp et al., 2012). En 1991, el programa de mejora Zaiger Genetics (California, EEUU) registró los términos ‘pluot’ y ‘aprium’, combinaciones, como plumcot, de los términos *plum* (ciruelo, en inglés) y *apricot* (albaricoquero, en inglés) (Brantley, 2004), y el término ‘pluerry’ para los híbridos ciruelo × cerezo, combinación de los términos *plum* y *cherry* (cerezo, en inglés) (Milošević & Milošević, 2018). En teoría, los pluots son resultado de cruzar un plumcot con un ciruelo, por lo que el nuevo híbrido tiene 75 % de ciruelo y 25 % de albaricoquero. Por otro lado, los apriums se obtienen del cruzamiento entre un plumcot y un albaricoquero, obteniendo híbridos con 75% de albaricoquero y 25 % de ciruelo (Okie, 2005). Sin embargo, se trata de híbridos complejos porque los ciruelos

empleados como parentales no pertenecen a una especie pura sino que son híbridos de varias especies de ciruelos diploides (Capítulo, 5; Faust & Surányi, 2011).

Los frutos de las variedades de plumcot tienen mayor contenido en azúcares, como glucosa y fructosa, que las ciruelas o los melocotones, aunque no superan el contenido de azúcares de los albaricoques (Bae et al., 2014). Los frutos de las variedades de pluot tienen una mayor concentración de sólidos solubles y menor acidez que las ciruelas (Crisosto et al., 2007), por lo que son muy apreciados por los consumidores. Los frutos de plumcots y pluots tienen apariencia de ciruelas de tipo japonés, por lo que son difíciles de distinguir por los consumidores (Brantley, 2004; Topp et al., 2012).

La introducción de un gran número de nuevas obtenciones de estos híbridos procedentes de varios programas de mejora ha provocado que se desconozca la diversidad genética del material vegetal disponible en la actualidad, ya que la caracterización genética de trabajos previos se ha centrado principalmente en la identificación de variedades de ciruelo tipo japonés y no incluyen híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero (Capítulo 5, Boonprakob et al., 2001; Ahmad et al., 2004; Qiao et al., 2007; Ferrero Klabunde et al., 2014; Merkouropoulos et al., 2017; Guerrero et al., 2021). Aunque todas las variedades de ciruelo de tipo japonés son híbridos (Okie, 2005), los programas de mejora genética de frutales de hueso han utilizado en los últimos años el término ‘híbridos interespecíficos’ para describir las variedades derivadas de cruzamientos entre ciruelo y albaricoquero, así como de retrocruzamientos de plumcots con otras especies del género *Prunus* (Okie, 2005).

En el capítulo anterior (Capítulo 5) se ha estudiado la diversidad genética de un grupo de accesiones de ciruelos de tipo japonés (híbridos de *P. salicina* y otros ciruelos diploides) y su relación con genotipos de referencia de diferentes especies puras de ciruelos diploides. El objetivo de este capítulo es determinar la variabilidad y estructura

genética de variedades comerciales y selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos de ciruelos con otras especies de *Prunus*, principalmente albaricoquero. Para ello, se han analizado mediante marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) 115 accesiones de variedades comerciales y selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos, junto a 12 genotipos de referencia pertenecientes a las especies de ciruelo *P. salicina*, *P. cerasifera* y *P. simonii*, tres híbridos interespecíficos (dos pluots y un pluerry), dos genotipos de *P. persica* y diez genotipos de *P. armeniaca*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se han evaluado 142 accesiones, incluyendo 27 genotipos de referencia (Tabla 1), 47 variedades (Tabla 2) y 68 selecciones avanzadas (Tabla 3) de híbridos interespecíficos de tres programas de mejora: Ibergen (62 accesiones), Provedo (7 accesiones) y Zaiger Genetics (46 accesiones). El material vegetal de los híbridos interespecíficos se obtuvo de las fincas experimentales de Ibergen ubicadas en Caspe, Zaragoza y San Rafael del Río, Castellón (72 accesiones), Viveros Mariano Soria, en La Almunia de Doña Godina, Zaragoza (36 accesiones) y Provedo, en Don Benito, Badajoz (7 accesiones) (Tablas 1 y 2). El material vegetal de los 27 genotipos de referencia se obtuvo de las colecciones de germoplasma del Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX-La Orden) en Guadajira, Badajoz (4 genotipos), Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) en Zaragoza, Zaragoza (14 genotipos) y Viveros Mariano Soria (9 genotipos) (Tabla 3).

Tabla 1. Nombre y origen de 27 genotipos de referencia.

Genotipos de referencia	
Almabar ⁴ (<i>P. armeniaca</i>)	Honey Top ¹⁵ (<i>P. persica</i> var. <i>nucipersica</i>)
Aprix ⁹ (<i>P. armeniaca</i>)	Kelsey ¹⁷ (<i>P. salicina</i>)
Charisma ¹ (<i>P. armeniaca</i>)	Mariposa ² (<i>P. salicina</i>)
Colorado ⁹ (<i>P. armeniaca</i>)	Methley ⁷ (<i>P. salicina</i> × <i>P. cerasifera</i>)
Katy ¹⁵ (<i>P. armeniaca</i>)	Mitard ¹⁶ (<i>P. cerasifera</i>)
Mirlo Naranja ³ (<i>P. armeniaca</i>)	Queen Ann ¹⁴ ('Gaviota' × 'Eldorado')
Monstercot ¹³ (<i>P. armeniaca</i>)	Queen Rosa ¹⁴ ('Queen Ann' × 'Santa Rosa')
Muñoz ¹⁸ (<i>P. armeniaca</i>)	Red Beaut ¹⁰ ('Burmosa' × 'Eldorado')
Rubisia ⁶ (<i>P. armeniaca</i>)	Santa Rosa ⁷ (<i>P. salicina</i>)
Sunnycot ¹¹ (<i>P. armeniaca</i>)	Simon ¹² (<i>P. simonii</i>)
Abundance ¹⁷ (<i>P. salicina</i>)	Songold ¹ ('Golden King' × 'Wickson')
Angeleno ⁵ ('Queen Ann' × Desconocido)	Splash ¹⁵ (Pluot)
Dapple Jack ¹⁵ (Pluot)	Sweet Treat ¹⁵ (Pluerry)
Honey Sun ¹⁵ (<i>P. persica</i> × <i>P. armeniaca</i>)	

¹: ARC-Infruitech, Sudáfrica; ²: Armstrong Nursery, Estados Unidos; ³: CEBAS-CSIC, España; ⁴: Frutaria, España; ⁵: Garabedian, Estados Unidos; ⁶: IPS, Francia; ⁷: Luther Burbank, Estados Unidos; ⁸: Proseplan, España; ⁹: PSB Producción Vegetal, España; ¹⁰: Reedley Nursery, Estados Unidos; ¹¹: SDR FRUIT LLC, Estados Unidos; ¹²: Simon Brothers, Estados Unidos; ¹³: SMS Unlimited, Estados Unidos; ¹⁴: USDA, Estados Unidos; ¹⁵: Zaiger Genetics, Estados Unidos; ¹⁶: Desconocido; ¹⁷: Japón; ¹⁸ Variedad tradicional prospectada por el CITA.

Tabla 2. Nombre, programa de mejora y ancestros de 47 variedades de híbridos interespecíficos.

Variedades	Ancestros
BBP-2B-5-3 ¹	3
BBP-3A-1-5 ¹	3
BBP-3A-1-7 ¹	3
BBP-3A-1-8 ¹	3
BBP-3A-5-5 ¹	3
BBP-4A-1-19 ¹	3
BBP-4B-1-5 ¹	3
BBP-4B-2-13 ¹	3
BBP-4B-2-24 ¹	3
BBP-5B-1-35 ¹	3
BBP-6A-1-3 ¹	3
BBP-6B-1-19 ¹	3
BBP-8B-1-10 ¹	3
BBP-8B-1-19 ¹	3
BBP-9A-1-12 ¹	3
BBP-10A-1-4 ¹	3
BBP-11B-1-19 ¹	3
BBP-13B-1-55 ¹	3
BBP-27B-2-2 ¹	3
Bella Gold ²	Geo Pride, Flavor Queen, Mariposa, Red Beaut, IS ³
Candy Heart ²	Autumn Giant, Black Kat, Red Beaut, IS ³ , cerezo ³
Crimson Heart ²	Friar, Flavorosa, Laroda, Plum Parfait, Queen Ann, IS ³
Crimson Kat ²	Flaming Gold, Flavor Treat, Mariposa, Red Beaut, IS ³
Emerald Drop ²	Friar, Flavor Queen, Red Beaut, IS ³
Fall Fiesta ²	Dapple Fire, IS ³
Flavor Fall ²	3
Flavor Finale ²	Caselman, King David, Queen Ann, Red Beaut, IS ³
Flavor Fusion ²	Bella sun, Con-N-Candy, Poppy, Red Beaut, IS ³
Flavor Grenade ²	Flavor Queen, Mariposa, Red Beaut, IS ³
Flavor King ²	Flavor Queen, Mariposa, Red Beaut, IS ³
Flavor Supreme ²	Red Beaut, IS ³
Glory Red ²	Burmosa, Flavor Fall, Mariposa, Red Beaut, IS ³
Honey Punch ²	Autumn Giant, Friar, Modesto, Red Beaut, Splash, IS ³
Honey Queen ²	Nectarina
IberPlum 1 ¹	3
IberPlum 2 ¹	3
IberPlum 3 ¹	3
IberPlum 4 ¹	3
IberPlum 5 ¹	3
IberPlum 6 ¹	3
IberPlum 7 ¹	3
IberPlum 9 ¹	3
IberPlum 10 ¹	3
IberPlum 12 ¹	3
Sweet Blaze ²	3
Sweet Pixie ²	Bing, Nadia, Royal Lee, Stella, ciruelo ³ , IS ³
Tasty Sweet ²	3

¹: Ibergen, España; ²: Zaiger Genetics, Estados Unidos; ³: Origen genealógico desconocido; IS: Híbridos interespecíficos.

Tabla 3. Nombre y programa de mejora de 68 selecciones avanzadas de híbridos interespecíficos.

Selecciones avanzadas				
Aprium 30-14 ¹	IBP-16-14 ¹	IBP-87-91 ¹	Z006 ³	Z021 ³
IBP-12-13 ¹	IBP-16-17 ¹	IBP-3A-4-2 ¹	Z007 ³	Z022 ³
IBP-14-5 ¹	IBP-16-18 ¹	IBP-3A-4-5 ¹	Z008 ³	Z023 ³
IBP-15-4 ¹	IBP-16-19 ¹	IBP-3B-2-7 ¹	Z009 ³	Z024 ³
IBP-15-8 ¹	IBP-19-14 ¹	IBP-5A-1-2 ¹	Z010 ³	Z025 ³
IBP-15-12 ¹	IBP-19-4 ¹	P008 ²	Z011 ³	Z026 ³
IBP-15-13 ¹	IBP-21-22 ¹	P009 ²	Z012 ³	Z027 ³
IBP-15-15 ¹	IBP-23-19 ¹	P010 ²	Z013 ³	Z028 ³
IBP-15-16 ¹	IBP-26-1 ¹	P011 ²	Z014 ³	Z029 ³
IBP-15-19 ¹	IBP-32-17 ¹	P012 ²	Z015 ³	Z030 ³
IBP-15-21 ¹	IBP-32-18 ¹	P013 ²	Z016 ³	Z031 ³
IBP-16-9 ¹	IBP-53-10 ¹	P014 ²	Z017 ³	Z032 ³
IBP-16-10 ¹	IBP-53-11 ¹	Z004 ³	Z018 ³	
IBP-16-13 ¹	IPB-700 ¹	Z005 ³	Z020 ³	

¹: Ibergén, España; ²: Provedo, España; ³: Zaiger Genetics, Estados Unidos.

Extracción y amplificación de ADN

El ADN genómico de cada variedad se obtuvo a partir de hojas jóvenes previamente congeladas o desecadas, que se molieron en un triturador automático TissueLysser (Qiagen, Alemania). El ADN se aisló a partir de una muestra de 20 mg (Hormaza, 2002) usando el kit de extracción Speedtools Plant DNA Extraction Kit (Biotools, España), se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) y se diluyó a una concentración de 10 ng/μl (Guerra et al., 2020).

Se utilizaron los 8 marcadores SSR seleccionados en el capítulo 5 debido a su buena amplificación y alto polimorfismo (Tabla 4). Los fragmentos se amplificaron en cinco reacciones de PCR múltiplex (M01, M02, M03, M04 y M05) (Capítulo 5). Las reacciones de PCR para las múltiplex M01 a M03 se llevaron a cabo en un volumen de 12,5 μl, y en un volumen de 11,5 μl para las múltiplex M04 y M05 (Urrestarazu et al., 2018). En las cinco reacciones se utilizó una concentración 10 ng/μl de ADN y el master

mix Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Alemania), con diferentes concentraciones de cada marcador (Tabla 4). En las reacciones M01, M02 y M03 se emplearon los perfiles de temperatura propuestos por Dirlwanger et al. (2002): un ciclo inicial de 15 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 57°C y 2 min a 72°C, y un paso final de 30 min a 72°C. Para las reacciones M04 y M05 se utilizó el mismo perfil de temperaturas pero modificando la temperatura de alineamiento a 46°C y 62°C, respectivamente (Mnejja et al., 2004). Todas las reacciones PCR se realizaron en un termociclador SimplyAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Tabla 4. Diseño multiplex (Mp), SSR loci (Locus), Grupo de Ligamiento (GL), fluorocromos, concentración de los *primers* y características de los marcadores SSR analizados en este trabajo.

Mp	Locus	GL	Fluoro-cromo	Concentración del SSR (μM)	Secuencia del SSR	SSR motif	Rango (bp)	Origen
M01	pchgms2 ^b	G4	6-FAM	0,2	F: GTCAATGAGTTCAGTGTTACACTC R: AATCATAACATCATTTCAGCCACTGC	(CT) ₂₄	130-200	Melocotonero
	CPPCT033 ^c	G7	NED	0,2	F: TCAGCAAACACTAGAAACAAACC R: TTGCAATCTGGTTGATGTT	(CT) ₁₆	151	Melocotonero
M02	BPPCT-007 ^d	G3	6-FAM	0,2	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	(AG) ₂₂ (CG) ₂₋ (AG) ₄	143-151	Melocotonero
	UDP96-005 ^a	G1	VIC	0,3	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCACCCAG	(AC) ₁₆ TG(CT) ₂₋ CA(CT) ₁₁	100-250	Melocotonero
M03	BPPCT-039 ^d	G3	PET	0,3	F: ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC R: GATGTCATGAAGATTGGAGAGG	(GA) ₂₀	148-158	Melocotonero
	BPPCT-025 ^d	G6	VIC	0,3	F: TCCTGCGTAGAAGAAGGTAGC R: CGACATAAAGTCCAAATGGC	(GA) ₂₉	178-202	Melocotonero
M04	CPSCT026 ^c	G7	6-FAM	0,3	F: : TCTCACACGCTTTCGTCAAC R: AAAAAGCCAAAAGGGGTTGT	(CT) ₁₆	177-213	Ciruelo japonés
M05	CPSCT005 ^c	G4	NED	0,3	F: CTGCAAGCACTGCGGATCTC R: CCCATATTCCCAACCCATTA	(CT) ₁₅	171-191	Ciruelo japonés

^a: Cipriani et al., 1999; ^b: Sosinski et al., 2000; ^c: Aranzana et al., 2002; ^d: Dirlewanger et al., 2002; ^e: Mnejja et al., 2004.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis capilar usando un secuenciador ABI3730 (Applied Biosystems, Estados Unidos) y un marcador de tamaño GeneScan 500LIZ (35-500 pb) (Applied Biosystems, Estados Unidos). Los fragmentos (alelos) se visualizaron y dimensionaron en el software PeakScanner versión 1.0 (Applied Biosystems, Estados Unidos) (Pina et al., 2014), y se organizaron en una tabla en formato csv para su posterior análisis (Guerrero et al., 2021).

Análisis de la diversidad genética

Para el análisis de la diversidad genética y la estructura poblacional de las accesiones, se utilizó el lenguaje de programación R v. 3.6.0 (R Core Team, 2021). Los datos de los alelos obtenidos por cada SSR para cada accesión en formato csv se convirtieron en un objeto de clase genind mediante la función 'df2genind' usando el paquete de R 'adegenet' v. 2.1.2 (Jombart, 2008).

El número de alelos por locus (N_A PER LOCUS) y totales (N_A TOTALES), la riqueza alélica (A_R), la heterocigosidad observada (H_o), la heterocigosidad esperada (H_e) y los estadísticos F de Wright (coeficiente de endogamia= F_{IS} e índice de fijación= F_{ST}) se calcularon para la población entera y para los diferentes grupos usando los paquetes 'adegenet' v. 2.1.2 (Jombart, 2008), 'hierfstat' v. 0.04-22 (Goudet, 2005), 'pegas' v. 0.13 (Paradis, 2010) y 'PopGenReport' v. 3.0.4 (Adamack & Gruber, 2014).

Se desarrolló un script para detectar sinonimias y homonimias mediante la función 'duplicated'. Para las sinonimias, se compararon los datos alélicos para detectar perfiles genéticos idénticos, y para las homonimias se compararon todos los nombres de las accesiones (Herrera et al., 2021a).

La relación genética entre los genotipos se calculó mediante un análisis de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*) (Nei

& Li, 1979). Se generó un dendrograma a través de un análisis ‘bootstrap’ con 1.000 repeticiones usando el paquete ‘poppr’ v. 2.8.5 (Kamvar et al., 2014). La estructura genética también se analizó con el paquete ‘adegenet’ v. 2.1.2 (Jombart, 2008; 2012). El número de grupos presentes en la población entera (K) se determinó mediante la función ‘find.clusters’. Se seleccionó K con el valor BIC (*Bayesian Information Criterion*) más bajo. El análisis de los diferentes valores de K se realizó con un DAPC (*Discriminant Analysis of Principal Components*). El número óptimo de componentes principales (PC) usados en el DAPC se determinó usando el comando ‘xvalDapc’ (Jombart, 2012). El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se realizó usando la función ‘poppr.amova’ del paquete ‘poppr’ v. 2.8.5. para calcular la proporción de varianza total entre grupos, entre las accesiones y entre accesiones dentro de un grupo (Kamvar et al., 2014).

La matriz de correlación de los valores de F_{ST} entre grupos se graficó con el paquete ‘corrplot’ v. 0.90 (Wei & Simko, 2021), y la matriz para establecer los límites inferior y superior del intervalo de confianza al 99% para las correlaciones de F_{ST} se determinó usando la función ‘boot.ppfst’ del paquete ‘hierfstat’ v. 0.04-22 con 1.000 repeticiones (Goudet, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad genética

Los ocho pares de marcadores SSR seleccionados para analizar la diversidad genética del grupo de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia mostraron una correcta amplificación (Tabla 5), obteniéndose 149 alelos en total y entre 12 (CPPCT033) y 21 (BPPCT007 y UDP96005) alelos por locus (N_A), con una media de 19, una diversidad alélica similar a trabajos previos realizados en un grupo de albaricoqueros de diferente origen geográfico [48 accesiones, 20 SSR, $N_A=2-8$ (Hormaza, 2002); 890 accesiones, 25 SSR, $N_A=18-32$ (Bourguiba et al., 2020)] y ciruelo japonés [47 accesiones, 8 SSR, $N_A=8-21$ (Ferrero Klabunde et al., 2014)]. Sin embargo, el número de alelos por locus fue mayor que en otro trabajo en variedades comerciales de albaricoquero (202 accesiones, 10 SSR, $N_A=6-9$), lo que puede estar relacionado con la disminución de la diversidad genética observada en este cultivo (Herrera et al., 2021a). El 35 % de los alelos ($n = 52$) se identificaron únicamente en una población y fueron establecidos como alelos privados (P_A) (Kalinowski, 2004). El alelo de menor tamaño se obtuvo con el marcador UDP6005 (95 bp) y el de mayor tamaño con el marcador CPSCT005 (229 bp). El rango del Contenido de Información Polimórfica (PIC) fue de 0,61 (CPPCT033) a 0,90 (CPSCT005), con un valor medio de 0,81, y se consideraron alelos altamente polimórficos, lo que muestra su utilidad para el estudio de la diversidad genética (Botstein et al., 1980). Los valores de heterocigosidad observada (H_o) oscilaron entre 0,48 (BPPCT039) y 0,85 (pchgms2), con un valor promedio de 0,70. La heterocigosidad esperada (H_e) tuvo un valor medio de 0,76, con valores entre 0,58 (CPPCT033) y 0,87 (CPSCT005). Estos valores fueron similares a lo observado en especies de ciruelo como *P. salicina* ($H_o = 0,71$; $H_e=0,67$), *P. domestica* ($H_o=0,73$; $H_e=0,69$) y *P. insititia* ($H_o=0,74$; $H_e=0,70$) (Abdallah et al., 2019), lo que indica que el

número de accesiones analizadas en este trabajo son una muestra representativa de la variabilidad genética actual. La heterocigosidad (H_o y H_e) de las accesiones analizadas fue menor que lo observado en variedades de albaricoquero, cultivo en el que se ha observado una disminución de la diversidad genética relacionada con el uso de los mismos parentales en los programas de mejora (Herrera et al., 2021a). Los valores de F_{IS} se determinaron en un rango de -0,13 (CPPCT033) a 0,37 (CPSCT026), con una media de 0,08, lo que indica que no existe endogamia en la población entera, ya que se observaron valores cercanos a cero. Mientras que el valor medio de F_{ST} fue 0,13, con un rango de 0,06 (BPPCT007) a 0,29 (BPPCT039), indicó una baja diferenciación genética debido al flujo de genes entre las accesiones (Weir & Cockerham, 1984) (Tabla 5).

Tabla 5. Número de alelos (N_A), rango de tamaño de los alelos amplificados, Contenido de Información Polimórfica (PIC), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e índice de fijación de Wright (F_{ST}) por locus en la población entera.

Locus	N_A	Rango (bp)	PIC	H_o	H_e	F_{IS}	F_{ST}
pchgms2	20	128-170	0,84	0,85	0,83	-0,03	0,07
CPPCT033	12	122-159	0,61	0,66	0,58	-0,13	0,21
BPPCT007	21	113-167	0,80	0,81	0,82	0,01	0,06
BPPCT039	20	121-173	0,78	0,48	0,60	0,20	0,29
BPPCT025	18	148-196	0,82	0,73	0,78	0,07	0,09
CPSCT026	17	156-210	0,87	0,49	0,78	0,37	0,14
CPSCT005	20	167-229	0,90	0,73	0,87	0,16	0,07
UDP96005	21	95-173	0,85	0,83	0,83	0,00	0,08
Media	19	-	0,81	0,70	0,76	0,08	0,13

Relaciones genéticas entre accesiones y genotipos de referencia

El script de R desarrollado para la detección de homonimias y sinonimias permitió la identificación de 141 genotipos distintos y dos sinonimias: IBP-53-10 e IberPlum 3, ambas del programa de mejora Ibergen, que se agruparon juntas en el subgrupo B6. El dendrograma mostró un primer nodo con un alto valor de ‘bootstrap’ (100), separando las accesiones en dos grupos: el grupo A, formado por 12 accesiones (8,5 %) y el grupo B,

formado por 130 accesiones (91,5 %) (Figura 1). Estos dos grupos a su vez se dividieron en nodos secundarios internos. El grupo A se dividió en dos subgrupos. El subgrupo A1 lo formaron los diez genotipos de referencia de la especie *P. armeniaca*. En el subgrupo A2 se agruparon dos accesiones de selecciones avanzadas, IBP-15-15 y Z029, pertenecientes a distintos programas de mejora, que podrían ser híbridos de tipo aprium, ya que tienen mayor relación genética con los genotipos de referencia de albaricoquero que con los de ciruelo (Milošević & Milošević, 2018).

El grupo B, el más grande de los dos, lo formaron todas las accesiones de híbridos interespecíficos, con excepción de las dos accesiones incluidas en el grupo A, y los genotipos de referencia de las especies de ciruelos diploides (*P. cerasifera*, *P. salicina* y *P. simonii*). Los híbridos interespecíficos de tipo plumcot y pluot, junto con los genotipos de referencia, no formaron subgrupos separados, sino que se distribuyeron en distintos grupos, mezclándose entre ellos y agrupándose principalmente según su origen genealógico. En trabajos previos se ha encontrado la misma tendencia de agrupamiento entre pluots, plumcots, ciruelos y albaricoqueros, sugiriendo que el agrupamiento se debe principalmente a la relación entre las accesiones y sus progenitores (Ahmad et al., 2004). Dentro del grupo B, el subgrupo B1 se separó con mayor distancia del resto, agrupando cinco accesiones de Zaiger Genetics. Dos de ellas son genotipos de referencia: Honey Top, una nectarina (*P. persica* var. *nucipersica*) de carne amarilla (IPS, 2021), y Honey Sun, un híbrido albaricoquero × melocotonero (Milošević & Milošević, 2018). Las tres accesiones restantes son Honey Queen, nectarina de carne amarilla, Bella Gold, un híbrido complejo (melocotonero × albaricoquero × ciruelo) denominado ‘peacotum’ (Milošević & Milošević, 2018), y la selección avanzada Z030, que podría tener en su genealogía algún genotipo de *P. persica*. El subgrupo B2 es un grupo de tamaño pequeño pero diverso, agrupando los genotipos de referencia Kelsey (*P. salicina*), Mitard (*P.*

cerasifera) y Songold [‘Golden King’ (de origen desconocido) × ‘Wickson’ *P. salicina*]. ‘Songold’ podría ser híbrido entre *P. salicina* y *P. cerasifera*, ya que se agrupa próximo a ‘Mitard’ (*P. cerasifera*). ‘Songold’ fue desarrollada por ARC-Infruitec, un programa de mejora público de origen sudafricano que usa frecuentemente ‘Methley’ (*P. salicina* × *P. cerasifera*) como parental (Okie & Ramming, 1999). El origen de las selecciones avanzadas incluidas en este subgrupo, Aprium 30-14 y Z017, podría estar relacionado con los genotipos de referencia con los que se encuentran agrupadas. En el subgrupo B3, ‘Methley’ se agrupó con ‘Angeleno’ (‘Queen Ann’ × Desconocido), ‘Abundance’ (*P. salicina*), algunas variedades de la serie ‘BBP’ de Ibergen, y los pluots de Zaiger Genetics Flavor Fusion, Flavor Finale y Flavor Grenade. Estos últimos se ubicaron cerca de ‘Red Beaut’ (‘Burmosa’ × ‘Eldorado’), situada en el subgrupo B4 junto a ‘Simon’ (*P. simonii*) y cuatro accesiones de Ibergen, entre ellas la variedad IberPlum 1. El subgrupo B5 se formó únicamente con variedades y selecciones avanzadas de Ibergen y Zaiger Genetics. En el subgrupo B6 se agruparon 16 accesiones, entre ellas el genotipo de referencia Sweet Treat (pluerry). Red Beaut es una de las variedades más utilizadas por Zaiger Genetics en sus hibridaciones (Google-Patents, 2021), lo que explica que las accesiones de Zaiger se posicionen en el dendrograma (subgrupos B5-B8) cerca de Red Beaut y de otras variedades utilizadas como parentales como Queen Ann (Gaviota × Eldorado) y Mariposa (*P. salicina*) (Zaiger et al., 2006; Okie, 2019a), agrupadas en el subgrupo B7 junto a tres pluots (Emerald Drop, Fall Fiesta y Flavor King) y 19 selecciones avanzadas. El subgrupo B8 fue el más numeroso de todos (n=35), incluyendo cuatro genotipos de referencia (Dapple Jack, Queen Rosa, Santa Rosa y Splash), 16 variedades y 15 selecciones avanzadas. Según la patente USPP23668P2 de ‘Glory Red’, en su genealogía se incluye ‘Queen Ann’ (Google-Patents, 2021), que a su vez también ha sido utilizada como parental de ‘Queen Rosa’ en un cruzamiento con ‘Santa Rosa’ (Okie & Ramming,

1999). Las tres variedades Glory Red, Queen Rosa y Santa Rosa están por tanto relacionadas genéticamente, lo que explica que se encuentren en el mismo subgrupo. Los pluots de referencia Splash y Dapple Jack también están relacionados genéticamente, ya que ‘Splash’ es ancestro de ‘Dapple Jack’ [patente USPP18178P3 (Google-Patents, 2021)]. Por último, en el subgrupo B9 se incluyeron una accesión del programa de mejora de Provedo (P014) y cinco accesiones de Zaiger Genetics (Crimson Heart, Z004, Z008, Z014 y Z025). Como en el subgrupo B6, el subgrupo B9 se formó únicamente de híbridos interespecíficos, que posiblemente compartan parentales entre ellos pero diferentes del resto de las accesiones analizadas en este trabajo.

Las relaciones genéticas entre plumcots, pluots, apriums, ciruelos y albaricoqueros han sido analizadas previamente en un pequeño grupo de híbridos interespecíficos formado por un plumcot y seis pluots, que mostraron mayor similitud con las variedades analizadas de ciruelo japonés (*P. salicina*) que con las de albaricoquero (*P. armeniaca*) (Ahmad et al., 2004). Por otro lado, el análisis previo de la estructura y la diversidad genética entre híbridos interespecíficos se limita a un estudio que incluyó 29 variedades de ciruelo de tipo japonés, cuatro híbridos interespecíficos, dos variedades de *P. domestica*, una de *P. cerasifera* y una de *P. armeniaca*, que mostró una baja diferenciación genética entre la estructura poblacional determinada (Carrasco et al., 2012).

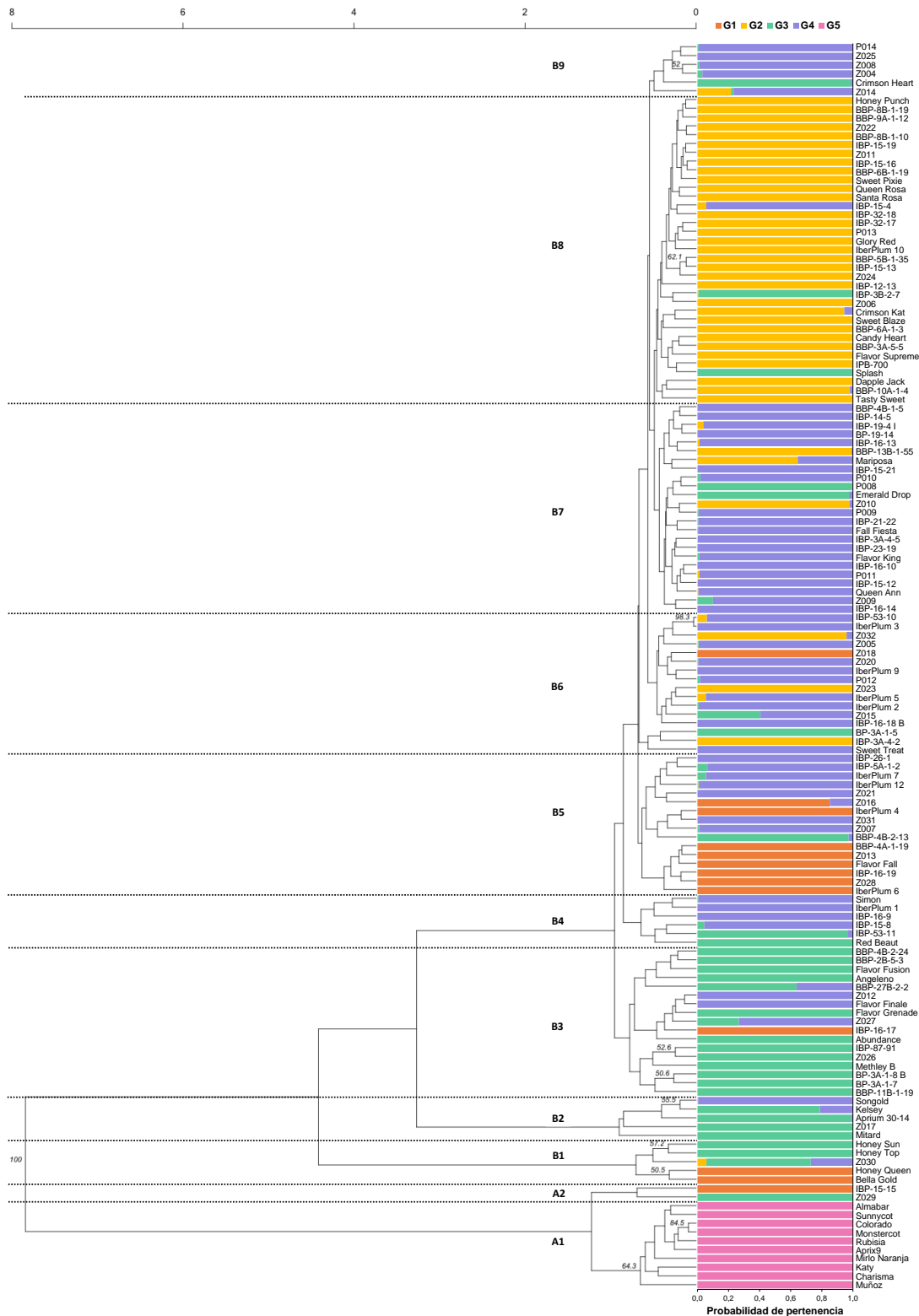


Figura 1. Relaciones genéticas y estructura genética inferida por DAPC de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia (ciruelos diploides y albaricoqueros). Las relaciones genéticas están representadas en un dendrograma UPGMA creado con 1000 repeticiones de bootstrap, cuyos valores mayores al 50 % se encuentran escritos en los nodos. El gráfico de barras representa las probabilidades que tiene cada accesión de pertenecer a los diferentes grupos: G1 = naranja, G2 = amarillo, G3 = verde, G4 = morado, G5= rosa.

Estructura genética

A pesar del alto grado de introgresión en este tipo de híbridos interespecíficos (Okie, 2005, 2006, 2019b; Milošević & Milošević, 2018), el análisis DAPC utilizado para analizar la estructura genética dio como resultado la formación de 5 grupos ($K = 5$), de acuerdo al valor más bajo de BIC (166,17) (Figura 2A). La validación del DAPC mostró que la proporción de éxito para la predicción de los grupos se obtendría con 25 componentes principales (PCs) (Figura 2B), por lo que para concluir el análisis DAPC se retuvieron 25 PCs (Figura 3-PCA eigenvalues) y cuatro valores propios del análisis discriminatorio (DA) (Figura 3-DA eigenvalues).

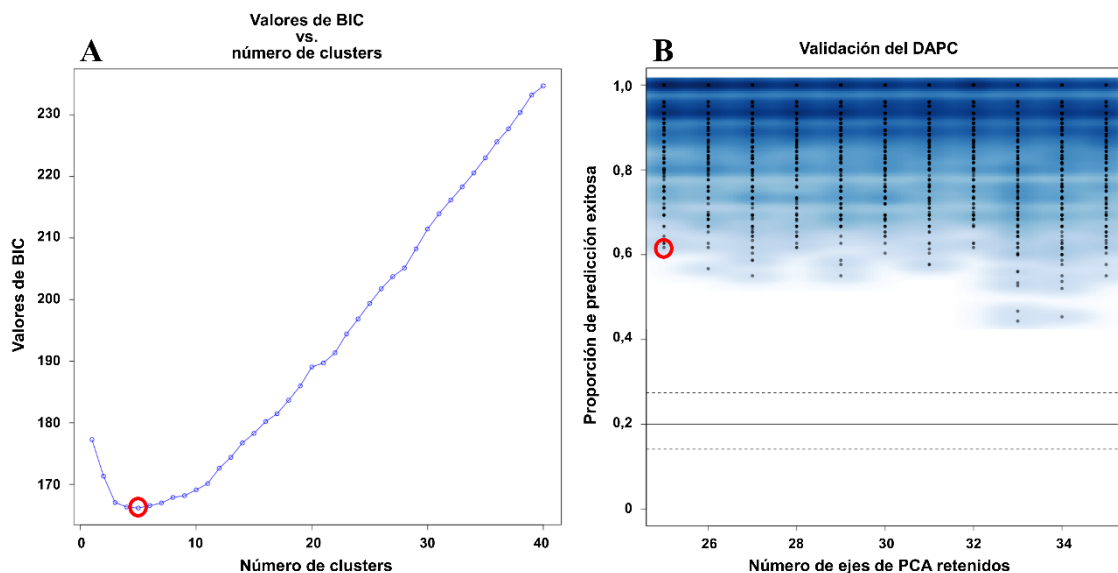


Figura 2. Criterios de agrupamiento y validación del DAPC. (A) Inferencia del número óptimo de grupos en la población entera. (B) Validación del DAPC para determinar el número óptimo de componentes principales (PCs) retenidos en el análisis de los cinco grupos inferidos.

En el gráfico de dispersión del DAPC (Figura 3), los grupos G2, G3 y G4 se solaparon próximos a la intersección de las primeras dos funciones lineales discriminantes (LD1 y LD2). Los grupos G1 y G5 se diferenciaron claramente del resto de los grupos a través de LD2 y LD1, respectivamente. Las probabilidades de las accesiones de pertenecer a cada grupo fueron 0,93 para el grupo 3 (G3) y 1,00 para el

resto de los grupos, lo que indica que la población se estructuró adecuadamente. Sin embargo, dentro de esos grupos, algunas accesiones, como Kelsey, BBP-27B-2-2 y BBP-13B-1-55, Z014, Z015 y Z030, mostraron probabilidades entre 0,59 y 0,85 (Figura 1). Este agrupamiento se correspondió con los resultados obtenidos en el dendrograma del análisis UPGMA, indicando que las accesiones se agruparon de acuerdo a su origen genealógico. El grupo G1 se formó con 13 accesiones (9 % del total de la población), incluyendo tres variedades de Ibergen (BBP-4A-1-19, IberPlum 4 e IberPlum 6), tres variedades de Zaiger Genetics (Bella Gold, Flavor Fall y Honey Queen) y siete selecciones avanzadas de los dos programas. En el grupo G2 (n = 38, 27 %) se agruparon los genotipos de referencia Dapple Jack (pluot), Mariposa (*P. salicina*), Queen Rosa y Santa Rosa, los dos últimos considerados híbridos simples de *P. salicina* (Okie, 2006). En este grupo también se incluyeron 17 variedades, 9 de la serie BBP de Ibergen, y Candy Heart, Crimson Kat, Flavor Supreme, Glory Red, Honey Punch, Sweet Blaze, Sweet Pixie y Tasty Sweet, de Zaiger Genetics, y 17 selecciones avanzadas de Ibergen, Provedo y Zaiger Genetics. El grupo G3 se formó con 32 accesiones (23 %), incluyendo genotipos de referencia de diferentes especies, como Abundance y Kelsey (*P. salicina*), Honey Sun y Honey Top (*P. persica*), Mitard (*P. ceracifera*), algunos híbridos de *P. salicina*, como Angeleno, Methley (*P. salicina* × *P. cerasifera*) y Red Beaut, ocho variedades de la serie BBP de Ibergen, cinco pluots y 11 selecciones avanzadas. En el grupo G4 se incluyó el mayor número de accesiones (n = 49, 35 %), incluyendo cuatro genotipos de referencia: Queen Ann, Simon (*P. simonii*), Songold y Sweet Treat (pluerry), 10 variedades de Ibergen y Zaiger Genetics, y 35 selecciones avanzadas de Ibergen (n = 19), Provedo (n = 5) y Zaiger Genetics (n = 11). Por último, el grupo G5 lo formaron exclusivamente los 10 genotipos de referencia de *P. armeniaca* (albaricoquero). La composición de los grupos del G1 al G4 resultó homogénea debido a que las accesiones se generaron de la selección

de cruces y retro-cruces en los que se utilizaron parentales comunes como Mariposa, Queen Ann, Queen Rosa, Friar y Red Beaut, siendo esta variedad la más utilizada (Okie & Weinberger, 1996; Okie & Ramming, 1999; Ahmad et al., 2004).

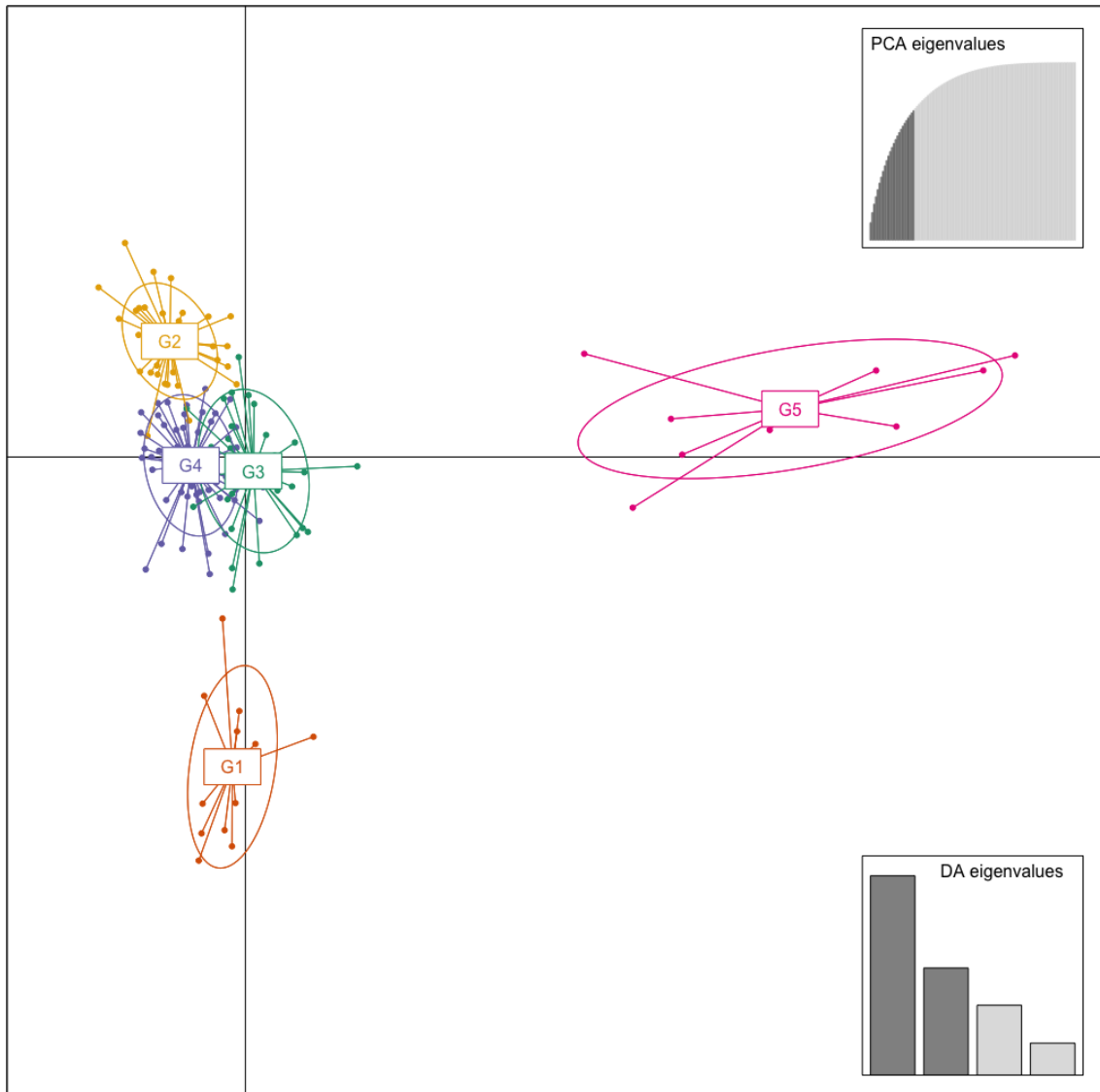


Figura 3. Gráfico de dispersión del DAPC definiendo la estructura genética de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia. El gráfico muestra las dos principales funciones discriminantes lineales (LD1 en horizontal y LD2 en vertical) del DAPC de acuerdo al valor óptimo de K obtenido ($K = 5$). Cada círculo de color diferente representa un grupo: G1 = naranja, G2 = amarillo, G3 = verde, G4 = morado, G5 = rosa. Cada punto representa una variedad, selección avanzada o genotipo de referencia.

Diversidad genética entre grupos poblacionales

En el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Tabla 6) sólo se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en la varianza dentro de las accesiones, que representó el 80 % del total de la varianza en la estructura genética ($K = 5$), porcentaje similar al observado en una población de ciruelos de tipo japonés (81,8** %) (Capítulo 5). La varianza entre los cinco grupos inferidos con el análisis DAPC representó un 11 % del total, y la varianza entre accesiones dentro de los cinco grupos inferidos representó el 9 % restante. En trabajos previos en albaricoquero (Bourguiba et al., 2020) y almendro (Halász et al., 2019), la varianza entre grupos aportó el 8 y el 29 % de la varianza total, siendo mucho menor que la varianza aportada por las diferencias entre las accesiones, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia estructurados en los 5 grupos inferidos según el DAPC.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	% de la varianza	Stat-Phi
Entre grupos inferidos ($K = 5$)	4	187	47	11	0,20
Entre accesiones dentro de grupos inferidos ($K = 5$)	137	913	7	9	0,10
Dentro de las accesiones	142	772	5	80**	0,11
<i>Total</i>	<i>283</i>	<i>1872</i>	<i>7</i>	<i>100</i>	<i>--</i>

**Estadísticamente significativo ($p < 0,01$).

Los estadísticos de diversidad genética se calcularon para cada uno de los cinco grupos ($K = 5$) (Tabla 7). El número de alelos por locus ($N_{A \text{ POR LOCUS}}$) osciló entre 6 (G5) y 12 (G3). El número de alelos total para cada grupo presentó un rango de 49 (G5) a 95 (G3). En la riqueza alélica (A_R) se observó la misma tendencia, con valores entre 6,25 (G5) y 8,14 (G3). Los alelos observados en un solo grupo se consideraron alelos privados (P_A), con el valor más pequeño (4) en el grupo G2 y el valor más grande (24) en el grupo G5. Estos resultados muestran niveles de diversidad genética moderados y relativamente

homogéneos, con excepción del grupo G3 que presentó un mayor número de alelos (N_A), una mayor riqueza alélica (A_R) y un valor del coeficiente de endogamia notablemente mayor que el resto ($F_{IS} = 0,21$), revelando un déficit de heterocigosidad, como lo observado en un grupo diverso de albaricoqueros de diferente origen geográfico (Bourguiba et al., 2020). Los valores de heterocigosidad observada (H_o) variaron entre 0,61 (G2) y 0,75 (G1 y G5), y la heterocigosidad esperada (H_e) entre 0,67 (G2) y 0,86 (G3). En los grupos G1, G2, G3 y G4, H_o fue ligeramente menor que H_e , lo que puede atribuirse a la exhaustiva actividad en la mejora genética desarrollada en este material. La heterocigosidad (H_o y H_e) del G5, que incluye las variedades de albaricoquero analizadas, fue similar a la observada en variedades tradicionales y nuevas obtenciones de albaricoquero (Herrera et al., 2021a).

Tabla 7. Estadísticos de diversidad genética en la estructura genética inferida para las 115 accesiones de híbridos interespecíficos y 27 genotipos de referencia. Número de accesiones en cada grupo (n), número de alelos por locus ($N_{A\text{ POR LOCUS}}$), número de alelos totales ($N_{A\text{ TOTAL}}$), riqueza alélica (A_R), número de alelos privados (P_A), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Grupo	n	$N_{A\text{ POR LOCUS}}$	$N_{A\text{ TOTAL}}$	A_R	P_A	H_o	H_e	F_{IS}
G1	13	9	69	7,75	11	0,75	0,78	0,04
G2	38	9	75	6,82	4	0,61	0,67	0,06
G3	32	12	95	8,14	8	0,68	0,86	0,21
G4	49	10	82	6,94	5	0,70	0,76	0,05
G5	10	6	49	6,25	24	0,75	0,75	-0,01

Con el objetivo de validar la diferenciación genética entre grupos, se determinaron los valores del índice de fijación (F_{ST}) (Figura 4). El valor medio observado fue $F_{ST} = 0,16$, indicando una moderada diferenciación entre grupos. Las correlaciones por pares de los valores de F_{ST} estimados en cada grupo oscilaron en un rango entre 0,05 (entre G3 y G4) y 0,28 (entre G2 y G5). Las correlaciones realizadas con el grupo G5, compuesto en su totalidad por variedades de albaricoquero, y el resto de grupos mostraron los valores más altos, revelando un restringido flujo de genes de las diez variedades que componen

este grupo (albaricoqueros) hacia las 132 accesiones que componen los grupos del G1 al G4 (ciruelos diploides, plumcots, pluots y otros híbridos), entre los que se observó una moderada pero significativa diferenciación genética ($p < 0,01$), con excepción de la correlación entre los grupos G3 y G4, que mostraron leve diferenciación genética entre ambos. Todas las correlaciones presentaron límites inferiores y superiores diferentes a cero dentro de un intervalo de confianza del 99% (Tabla 8).

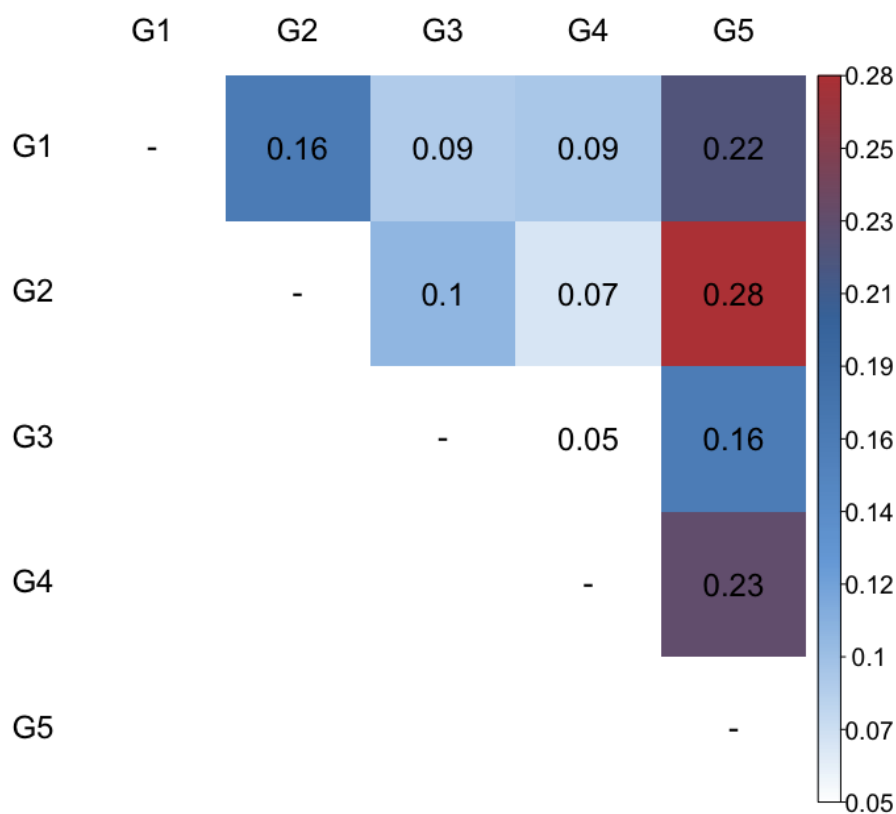


Figura 4. Correlaciones de los valores F_{ST} estimados entre los cinco grupos ($K = 5$).

Tabla 8. Límite inferior (debajo de la diagonal) y superior (sobre la diagonal) del intervalo de confianza del 99 % calculado con un bootstrap de 1.000 repeticiones para las correlaciones de los valores de F_{ST} estimados en los cinco grupos inferidos.

	G1	G2	G3	G4	G5
G1	--	0,42	0,19	0,19	0,30
G2	0,03	--	0,24	0,15	0,43
G3	0,02	0,01	--	0,12	0,18
G4	0,02	0,02	0,01	--	0,31
G5	0,15	0,17	0,13	0,17	--

Desde su introducción a principios del siglo XX, los híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero han generado controversia por la falta de claridad en catalogarlos como ciruelos, plumcots, pluots o apriums para su comercialización, debido a la confusión que genera la apariencia similar de sus frutos, así como por la dificultad en determinar los estándares de calidad que deben ser aplicados (Okie, 2005). La capacidad de distinguir estos híbridos no es sólo importante para vendedores y consumidores sino también para los mejoradores (Nicolás-Almansa et al., 2020) y productores, por el diferente manejo agronómico (Ahmad et al., 2004). En determinados mercados, como en EEUU, la catalogación como ciruelos o pluots puede incidir en el precio del fruto comercializado (Brantley, 2004).

Los grupos obtenidos que incluyeron accesiones de ciruelos e híbridos tuvieron una relación genética con el grupo de los albaricoqueros más débil de lo que se esperaría si fueran híbridos simples entre ciruelo y albaricoquero, como sugieren las denominaciones plumcot, pluot y aprium (Milošević & Milošević, 2018). En un trabajo previo también se ha encontrado que los pluots tienen una mayor relación genética con el ciruelo de tipo japonés que con el albaricoquero (Ahmad et al., 2004). Este alejamiento entre los híbridos interespecíficos y los albaricoqueros puede ser debido a varios retrocruzamientos, o nuevos cruzamientos con ciruelos, de las primeras descendencias de híbridos simples ciruelo × albaricoquero, para buscar frutos más parecidos a ciruelas de piel glabra que a albaricoques (Topp et al., 2012).

A pesar de haber muchas especies involucradas en la genealogía de los híbridos, la diversidad observada es menor de la esperada, probablemente debido a la utilización de los mismos parentales en distintos programas de mejora, como Friar, Mariposa, Queen Ann, Queen Rosa y Red Beaut (Google-Patents, 2021). Además, los ciruelos de tipo japonés usados como parentales son híbridos complejos que proceden directa o

indirectamente de las primeras hibridaciones realizadas por Burbank, quien usaba como parentales un reducido número de variedades de ciruelo japonés (Abundance, Burbank, Kelsey y Satsuma) (Hedrick, 1911), de otros ciruelos diploides [Maritima (*P. maritima*), Simon (*P. simonii*) y Robinson (*P. munsoniana*)], y de sus propios híbridos (Gaviota, Santa Rosa y Wickson) (Karp, 2015). En trabajos previos se han obtenido bajos porcentajes de cuajado en cruzamientos ciruelo × albaricoquero, y muy bajos o inexistentes en cruzamientos albaricoquero × ciruelo, lo que muestra la dificultad de obtener estos híbridos (Ramming, 1976; Nicolás-Almansa et al., 2021) y puede haber provocado que algunos de los híbridos considerados como plumcots, pluots y apriums sean en realidad ciruelos de tipo japonés. Sin embargo, es difícil determinar la genealogía de los híbridos, ya que en la mayoría se desconocen los parentales o los mejoradores no los hacen públicos.



Discusión general y conclusiones.

DISCUSIÓN GENERAL

Necesidades de polinización

En busca de la autocompatibilidad

Se han identificado muy pocas accesiones autocompatibles (Capítulos 2 y 4), en una proporción similar a lo observado en trabajos previos (Okie & Weinberger, 1996; Guerra et al., 2009, 2010, 2011, 2020; Guerra & Rodrigo, 2015). Las variedades autocompatibles presentan considerables ventajas agronómicas, ya que no necesitan variedades polinizadoras y facilitan el manejo de las plantaciones (Topp et al., 2012). Por ello, la autocompatibilidad es uno de los objetivos principales de los programas de mejora en frutales de hueso como el albaricoquero, almendro, cerezo y ciruelo (Okie & Hancock, 2008; Hartmann & Neümuller, 2009; Milošević & Milošević, 2018). Una de las estrategias de mejora es la introgresión de la autocompatibilidad desde albaricoquero a ciruelo, mediante el desarrollo de híbridos interespecíficos de tipo plumcot (Ruiz et al., 2019). Sin embargo, es difícil de conseguir, por el pequeño número de descendencias obtenidas y porque muchas son androestériles (Nicolás-Almansa et al., 2021), como se ha observado en algunas accesiones en este trabajo (Capítulo 2). La falta de conocimiento sobre la regulación genética del mecanismo de autocompatibilidad en este cultivo dificulta su determinación con marcadores moleculares, como ocurre en otras especies de *Prunus* como albaricoquero (Halász et al., 2005; Vilanova et al., 2005; Muñoz-Sanz et al., 2017), almendro (Kodad et al., 2010; Fernández i Martí et al., 2014) y cerezo (Bošković & Tobutt, 1996; Wunsch & Hormaza, 2004a; Cachi & Wunsch, 2014), en los que se ha encontrado algún alelo *S* ligado a la autocompatibilidad. Esto facilita la determinación del carácter en las nuevas variedades sin necesidad de realizar ensayos con flores y agiliza la selección precoz de descendencias en los programas de mejora, lo que todavía no es posible en ciruelo japonés. Aunque algunos alelos (*Se* y *Sb*) se relacionaron

inicialmente con la autocompatibilidad (Beppu et al., 2005, 2010, 2012b, 2012a; Watari et al., 2007; Guerra et al., 2009), su presencia en algunas variedades autoincompatibles (Capítulos 2 y 4, Halász et al., 2007; Hegedűs & Halász, 2007; Guerra et al., 2009, 2011, 2012) hace necesario profundizar en el estudio del control genético del carácter. Al no poder determinar la autocompatibilidad a través de marcadores moleculares, es necesario seguir observando al microscopio el crecimiento de los tubos polínicos en flores autopolinizadas en las nuevas variedades (Capítulos 1, 2 y 4, Guerra & Rodrigo, 2015; Abdallah et al., 2019).

No existen evidencias de que la causa de la autocompatibilidad en ciruelo japonés sea alguna delección o una disminución en la transcripción en los genes *S-RNasa* (Beppu et al., 2005) o *SFB* (Beppu et al., 2010). La caracterización de los promotores del gen *S-RNasa* en los haplotipos de las variedades autocompatibles podría esclarecer si contienen elementos que regulen su expresión en el pistilo, como ocurre en cerezo (Ishizaka et al., 2003). Adicionalmente, el estudio de la clonación y secuenciación de estos alelos facilitaría la detección de posibles mutaciones o errores de identificación. Cualquier avance en la clarificación de la autocompatibilidad tendrá impacto en el conocimiento de la regulación genética del carácter, pero también será de gran interés para la mejora genética y el manejo del cultivo.

Selección de variedades polinizadoras

En el cultivo de variedades autoincompatibles es necesario asegurar la presencia de polen compatible en las plantaciones. Con las variedades analizadas en este trabajo (Capítulo 2) y las analizadas previamente (Revisado en Guerra & Rodrigo, 2015; Abdallah et al., 2019; Guerra et al., 2020) se han determinado la auto(in)compatibilidad y la intercompatibilidad de la mayoría de las variedades comerciales cultivadas en la actualidad. Sin embargo, la intensa renovación varietal en este cultivo (Guerra & Rodrigo,

2017; Guerrero et al., 2018b; Milošević & Milošević, 2018; Okie, 2019a, 2019b) hace necesario continuar con el análisis de nuevas variedades cada año. En la actualidad ya existen herramientas para afrontar esta situación, ya que la metodología disponible para determinar las necesidades de polinización (Capítulos 1 y 2; Guerra et al., 2009, 2011, 2012, 2020) permite analizar con rapidez las nuevas obtenciones e incorporarlas a sus correspondientes grupos de incompatibilidad. Queda alguna incógnita por resolver, como la identificación de uno de los dos alelos en algunas variedades (Capítulo 2), que se podría solventar mediante el desarrollo de nuevos *primers* específicos.

En contraste, la situación con los híbridos interespecíficos es más compleja. Aunque la mayoría de los alelos *S* identificados se correspondieron con los descritos en ciruelo japonés (Capítulo 4), es necesaria la identificación de aquellos alelos que no se correspondieron con los de ciruelo japonés y que posiblemente provengan de otras especies, así como la comprobación de las relaciones de incompatibilidad de los híbridos entre sí y entre los híbridos y las especies utilizadas como parentales, para detectar posibles situaciones de incompatibilidad interespecífica (Morimoto et al., 2019).

Impacto del cambio climático en la floración y el cuajado

Disminución de frío invernal

Las necesidades agroclimáticas determinadas en los capítulos 3 y 4 han permitido establecer que todas las accesiones de ciruelo de tipo japonés y de híbridos interespecíficos cumplieron sus necesidades de frío en todas las zonas de estudio, mostrando la buena adaptación de todas las accesiones a las condiciones de Aragón y Extremadura. Aunque el número de años analizados no son suficientes para mostrar una tendencia, en otros trabajos se estima una disminución de frío invernal de hasta 40 porciones de frío (PF) en las regiones de clima mediterráneo a finales del siglo XXI (Luedeling et al., 2011). Para la Península Ibérica se ha proyectado una disminución de hasta 30 PF (Rodríguez et al., 2019). En este escenario, en Extremadura sólo se podrían cultivar variedades de necesidades de frío bajas, y en Aragón de necesidades bajas y medias (Capítulos 3 y 4), lo que realza la importancia de conocer las necesidades agroclimáticas de las nuevas variedades, así como de las variedades ya establecidas para prever problemas de producción en los años de inviernos más cálidos. El cultivo de las variedades más exigentes en frío se podría desplazar hacia zonas más frías, pero con mayor riesgo de heladas en floración (Rodrigo, 2000; Luedeling et al., 2011; Luedeling, 2012; Herrera et al., 2021b; Rodríguez et al., 2021). Por otro lado, las nuevas variedades con más posibilidades de adaptarse a las nuevas condiciones provocadas por el cambio climático en las zonas actuales de cultivo serían las de necesidades de frío bajas, siendo éste un objetivo común en varios programas de mejora (Topp et al., 2008; Agricultural Research Council, 2015; Ruiz et al., 2019; Guerrero et al., 2020). Es previsible que el cultivo de este tipo de variedades (*low chilling*) tenga una importancia creciente en las próximas décadas, tanto en las zonas tradicionales como en la expansión del cultivo a nuevas zonas más cálidas.

Adaptación de la fenología a las nuevas condiciones

Se ha observado gran variabilidad en la época de floración entre zonas y años para cada variedad, lo que provocó que muchas variedades coincidieran en floración solo algunos años (Capítulo 2), con la falta de producción que esto conlleva en el cultivo de variedades autoincompatibles (Rodrigo & Herrero, 2002; Sánchez-Pérez et al., 2014; Herrera et al., 2021b). El periodo de floración viene determinado por las condiciones meteorológicas de los meses previos (Alonso et al., 2005; Ruiz et al., 2007, 2018; Campoy et al., 2011; Zhuang et al., 2016; Fadón et al., 2021b). Las accesiones con menos necesidades de frío pueden florecer antes en zonas y/o años fríos, haciéndolas más vulnerables a heladas durante el periodo de floración (Scorza & Okie, 1991). Por otro lado, las accesiones más exigentes en frío pueden no cubrir adecuadamente sus necesidades en zonas o años cálidos, ocasionando floraciones irregulares que pueden resultar en flores estériles y bajos niveles de cuajado (Topp et al., 2008; Penso et al., 2020).

El conocimiento de las necesidades agroclimáticas de cada variedad (Capítulos 3 y 4) puede ser un factor determinante no solo para predecir la adaptación de cada variedad a una zona de cultivo, sino también para prever si las variedades de una plantación ya establecida presentan riesgo de no cubrir sus necesidades en el futuro. Las necesidades agroclimáticas pueden ser un factor a considerar para la selección de variedades polinizadoras para evitar la falta de coincidencia en el periodo de floración, especialmente en años con inviernos templados en variedades con necesidades de frío diferentes (Capítulos 2, 3 y 4), y también para prever un posible adelanto en la floración y tenerlo en cuenta en el manejo del cultivo para decidir cuándo introducir colmenas.

En la selección adecuada de variedades polinizadoras para el diseño de plantaciones, además de las consideraciones comerciales, se debe tener en cuenta que las

variedades sean (1) intercompatibles, (2) coincidentes en floración y (3) de necesidades agroclimáticas similares. El conocimiento de sus necesidades de polinización y de sus necesidades agroclimáticas es clave para asegurar la presencia de polen compatible y evitar pérdidas de producción por falta de polinización.

Limitaciones metodológicas en el estudio del reposo

La transición de ecodormancia a endodormancia

La importancia creciente de conocer las necesidades agroclimáticas contrasta con su desconocimiento en muchas de las variedades, debido a la falta de información suministrada por los programas de mejora en la mayoría de las nuevas obtenciones, así como por las limitaciones de los métodos disponibles (Dennis, 2003; Campoy et al., 2011; Fadón & Rodrigo, 2018). Uno de los factores clave en los ensayos experimentales es la determinación de cuándo se produce la salida de la endodormancia, para poder estimar el frío acumulado hasta entonces. La falta de estandarización en el diseño experimental en la frecuencia y tipo de muestreo, en las condiciones artificiales de las cámaras de cultivo y en los criterios para considerar que las yemas han cubierto las necesidades de frío, han provocado que en algunos casos las necesidades agroclimáticas no sean aplicables en zonas diferentes a las de estudio (Viti et al., 2010; Campoy et al., 2012; Gannouni et al., 2017; Fernandez et al., 2020; Fadón et al., 2021c).

Como alternativa, se han desarrollado aproximaciones estadísticas que determinan las necesidades de frío correlacionando fechas de floración y registros de temperatura de series largas de años en otras especies de *Prunus* como almendro (Tabuenca et al., 1972; Alonso et al., 2005; Benmoussa et al., 2017a; Díez-Palet et al., 2019), cerezo (Luedeling et al., 2013b, 2021; Fadón et al., 2021b) y melocotonero (Maulión et al., 2014; Kwon et al., 2015). Sin embargo, no existen trabajos con esta metodología en ciruelo japonés ni

en híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero, probablemente debido a los pocos años de datos fenológicos disponibles en las nuevas variedades (Guerra et al., 2020).

Otro factor que limita la utilidad de los datos de necesidades agroclimáticas es la mala adaptación de los modelos disponibles de cuantificación de frío a zonas climáticas diferentes a los que fueron desarrollados (Dennis, 2003; Campoy et al., 2011; Fernandez et al., 2020). Los modelos más utilizados se desarrollaron para relacionar las condiciones meteorológicas con la fenología de variedades de melocotonero bien adaptadas a cada zona de estudio: con un grupo de variedades de melocotonero en Georgia, EEUU en el modelo horas frío (Weinberger, 1950); con dos variedades de melocotonero en el modelo de unidades frío en Utah, EEUU (Richardson et al., 1974) y el modelo dinámico en Israel (Fishman et al., 1987). Sin embargo, su uso se ha extendido a zonas con diferentes condiciones climatológicas y a otros cultivos de muy diferente comportamiento fenológico. Esta situación ha provocado que en muchos casos las estimaciones obtenidas en una zona no sean extrapolables con garantía a otras zonas, tanto en ensayos experimentales (Dennis, 2003; Campoy et al., 2011; Gannouni et al., 2017; Fadón et al., 2020b) como en correlaciones estadísticas (Fadón et al., 2020b, 2021c; Fernandez et al., 2020).

Biomarcadores de las fases de reposo

Otra de las causas de las limitaciones de la metodología experimental disponible es la ausencia de un marcador biológico que permita identificar cuándo se produce la transición de endodormancia a ecodormancia en el material muestreado en condiciones de campo. Esto permitiría eliminar la variabilidad causada por los factores que regulan las condiciones de las cámaras de cultivo y por los criterios para considerar cuándo se han cubierto las necesidades de frío (Campoy et al., 2011; Fadón & Rodrigo, 2018; Quesada-Traver et al., 2020). Además, permitiría el desarrollo de nuevos métodos para determinar

si un árbol ha salido de endodormancia con el análisis de una única muestra, sin necesidad de hacer un seguimiento durante todo el reposo invernal, lo que tendría implicaciones en la toma de decisiones agronómicas. Aunque en ciruelo de tipo japonés no hay todavía información disponible, en otras especies se han identificado procesos fisiológicos que podrían ser aplicados como biomarcadores en los estudios de necesidades agroclimáticas en el futuro, como la meiosis del polen en albaricoquero (Julian et al., 2011, 2014; Fadón et al., 2021a), la acumulación de las reservas de almidón en los primordios florales en cerezo (Fadón et al., 2018b) y la acumulación de ácido ascórbico y prunasina en almendro (Guillamón et al., 2020). También se han propuesto varios genes cuya expresión varía durante el reposo, como los genes *DORMANCY-ASSOCIATED MAD BOX* (DAM) para la caracterización de la dormancia en albaricoquero (Balogh et al., 2019), cerezo (Vimont et al., 2019), ciruelo europeo (Quesada-Traver et al., 2020) y melocotonero (Bielenberg et al., 2008; Yamane et al., 2011). Otros genes también se han relacionado con la regulación del reposo, como *FT-like*, en melocotonero (Leida et al., 2010), *SAP* (*PpSAP1*) (Lloret et al., 2017a) y *S6PDH-like* (Lloret et al., 2017b), en melocotonero y ciruelo europeo (Quesada-Traver et al., 2020), y *TIP-like* en ciruelo europeo (Quesada-Traver et al., 2020).

La estandarización de las diferentes aproximaciones metodológicas, la identificación de un biomarcador ligado a la salida de endodormancia y el desarrollo de un modelo de acumulación de frío adaptado a la especie de estudio y las condiciones climatológicas de su cultivo, permitirían identificar de forma fiable la salida de la endodormancia y obtener una estimación más precisa de las necesidades agroclimáticas de los diferentes híbridos de ciruelo japonés.

Diversidad genética

Muchas especies, pero poca diversidad

Las variedades de ciruelo de tipo japonés actuales son híbridos complejos de hasta 15 especies de *Prunus*, resultado de cruzar los híbridos simples obtenidos por Luther Burbank (híbridos entre *P. salicina* y *P. simonii*, *P. geniculata*, *P. americana* o *P. besseyi*) con otras especies (*P. cerasifera*, *P. angustifolia*, *P. spinosa*) a medida que el cultivo se extendió a nuevos países (Okie & Ramming, 1999; Okie & Hancock, 2008). Que las variedades actuales sean híbridos, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de cultivos frutales que solo pertenecen a una especie, originó la gran variabilidad fenotípica y de comportamiento agronómico del cultivo (Ahmad et al., 2004; Okie & Hancock, 2008; Carrasco et al., 2012; Guerra & Rodrigo, 2017). Esto se ha reflejado en las grandes diferencias encontradas entre variedades en las necesidades de frío y de calor (Capítulo 3, Ruiz et al., 2018), ya que hay ancestros con necesidades de frío muy diferentes (muy bajas en *P. salicina* y *P. geniculata* y muy altas en *P. americana*, *P. besseyi* y *P. nigra*) y necesidades de calor (muy bajas en *P. nigra* y *P. subcordata* y muy altas en *P. maritima*) (Hedrick, 1911; Karp, 2015).

Sin embargo, la diversidad genética ha resultado ser menor de lo esperado (Capítulo 5), lo que puede estar relacionado con el uso reiterado de un grupo reducido de parentales desde el inicio de la mejora genética en el siglo XIX (Hedrick, 1911; Okie & Weinberger, 1996; Okie & Ramming, 1999; Okie & Hancock, 2008; Topp et al., 2012; Milošević et al., 2013; Karp, 2015; Google-Patents, 2021). Además, la endogamia producida por los retrocruzamientos durante el proceso de mejora puede dar lugar a pérdida de diversidad genética, como se ha observado en albaricoquero (Herrera et al., 2021a).

El análisis de la diversidad genética en ciruelo japonés está limitado por la falta de información sobre los parentales utilizados en la mayoría de programas de mejora. La aplicación de marcadores de ADN de cloroplastos podría esclarecer las relaciones filogenéticas entre las variedades de este cultivo, como se ha realizado en ciruelo europeo (Urrestarazu et al., 2018). Un mayor conocimiento de la genealogía permitiría correlacionar caracteres morfológicos o de comportamiento agronómico de interés de determinadas variedades con las diferentes especies presentes en sus ancestros para la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad y su aplicación a la mejora genética.

El futuro de los híbridos interespecíficos

Existe mucho interés en la obtención de nuevos híbridos interespecíficos de *Prunus* por su potencial comercial (Bae et al., 2014). La apariencia de los frutos los hacen muy atractivos para el consumidor y presentan características organolépticas y sensoriales novedosas (Crisosto et al., 2007). Además, los frutos pueden presentar mayor contenido de azúcar que las ciruelas, lo que puede adelantar la recolección comercial y alargar la vida postcosecha (Brantley, 2004).

Los híbridos simples ciruelo × albaricoquero son difíciles de obtener por el reducido número de descendencias que se suelen obtener (Ramming, 1976; Nicolás-Almansa et al., 2021). La mayoría de variedades se obtienen tras varios retrocruzamientos con ciruelo (Okie, 2005), lo que explicaría su mayor cercanía genética al ciruelo que al albaricoquero (Capítulo 6, Ahmad et al., 2004). Además, la apariencia de los frutos de la mayoría de accesiones, con piel glabra, es también más parecida a ciruelas que a albaricoques.

Una incógnita por resolver es si los híbridos ciruelo × albaricoquero y los ciruelos de tipo japonés pueden utilizarse como polinizadores entre sí. Aunque los cruces

Discusión general

analizados como control fueron intercompatibles (Capítulos 2 y 4), es necesario comprobar si las relaciones de incompatibilidad son las que se deducen de sus alelos en todos los casos o si existe incompatibilidad interespecífica entre algunas variedades, lo que condicionaría su cultivo.

CONCLUSIONES

1. Se han identificado 12 accesiones de ciruelo de tipo japonés autocompatibles y 91 autoincompatibles. La autoincompatibilidad de la mayoría de variedades cultivadas es un condicionante principal en el cultivo que hace necesario intercalar variedades polinizadoras adecuadas en las plantaciones.
2. El número de variedades autocompatibles es muy reducido y mucho menor que en otros frutales de hueso, lo que hace necesario profundizar en el estudio del mecanismo de autocompatibilidad para facilitar la obtención de nuevas variedades autocompatibles.
3. La determinación de los genotipos *S* permitió establecer las relaciones de incompatibilidad entre las accesiones autoincompatibles. Se han identificado cuatro nuevos alelos (*S α* , *S β* , *S δ* , *S γ*) y tres nuevos grupos de incompatibilidad (XXVII, XXVIII y XXIX).
4. Se han determinado las necesidades agroclimáticas de 95 accesiones, lo que suministra información sobre su adaptación a cada zona de cultivo y a las nuevas condiciones causadas por el cambio climático.
5. Para la determinación de las necesidades agroclimáticas, la evaluación del peso de las yemas es un criterio más fiable que el seguimiento del desarrollo de la fenología, que podría dar lugar a sobreestimaciones de necesidades de frío. El modelo dinámico de cuantificación de frío resultó el más adecuado para el material vegetal analizado y las zonas de ensayo en Aragón y Extremadura.

Conclusiones

6. Se ha encontrado gran variabilidad en las necesidades agroclimáticas de un grupo de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero. Se han identificado 3 autocompatibles y 31 autoincompatibles, por lo que la mayoría de híbridos necesitan polinización cruzada.
7. La variabilidad en la época de floración observada entre localizaciones y años destaca la importancia de considerar este factor en la selección de variedades en nuevas zonas de cultivo y en las condiciones cambiantes de los inviernos en plantaciones ya establecidas. Para la correcta selección de polinizadores en el diseño de plantaciones es necesario que las variedades sean intercompatibles, coincidentes en floración y con necesidades agroclimáticas similares.
8. Se detectó poca diversidad genética y la presencia de un reducido número de alelos *S* en la mayoría de accesiones de ciruelo de tipo japonés, que puede deberse al uso de los mismos parentales en los programas de mejora.
9. Los híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero están genéticamente más próximos al ciruelo japonés que al albaricoquero, lo que puede explicar sean más parecidos al ciruelo que al albaricoquero en la morfología de los frutos y en su comportamiento agronómico
10. El cultivo de ciruelo de tipo japonés y de híbridos interespecíficos ciruelo × albaricoquero presenta gran potencial por el interés de consumidores y productores. Aunque el manejo de su cultivo es más complicado que en otros frutales de hueso, la información disponible permite dar respuesta a la necesidad de polinización cruzada y a la adaptación a condiciones de poco frío invernal, dos de los principales condicionantes del cultivo.

REFERENCIAS

- Abdallah, D., Baraket, G., Perez, V., Ben Mustapha, S., Salhi-Hannachi, A., & Hormaza, J. I. (2019). Analysis of self-incompatibility and genetic diversity in diploid and hexaploid plum genotypes. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–14.
- Adamack, A., & Gruber, B. (2014). PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R. *Methods in Ecology and Evolution*, *5*, 384–387.
- Agricultural Research Council. (2015). The economic value of plum research in South Africa. In *ARC Impact Study Series* (4).
- Ahmad, R., Potter, D., & Southwick, S. M. (2004). Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *79*(1), 164–169.
- Akagi, T., Henry, I. M., Morimoto, T., & Tao, R. (2016). Insights into the *Prunus*-specific *S-RNase*-based self-incompatibility system from a genome-wide analysis of the evolutionary radiation of *S* locus-related F-box genes. *Plant and Cell Physiology*, *57*(6), 1281–1294.
- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., & Burgos, L. (2008). Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environmental and Experimental Botany*, *64*(2), 162–170.
- Alonso, J. M., Ansón, J. M., Espiau, M. T., & Socias i Company, R. (2005). Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *130*(3), 308–318.
- Alonso, J. M., Socias i Company, R. 2005. Differential pollen tube growth in inbred self-compatible almond genotypes. *Euphytica*. *144*, 207-213.
- Aranzana, M., García-Mas, J., Carbó, J., & Arús, P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, *121*(1), 87–92.
- Aranzana, M., Pineda, A., Cosson, P., Dirlewanger, E., Ascasibar, J., Cipriani, G., Ryder, C. D., Testolin, R., Abbot, A., King, G. J., Iezzoni, A. F., & Arús, P. (2003). A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*, 819–825.
- Bae, H., Yun, S. K., Jun, J. H., Yoon, I. K., Nam, E. Y., & Kwon, J. H. (2014). Assessment of organic acid and sugar composition in apricot, plumcot, plum, and peach during fruit development. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *87*, 24–29.

- Baggiolini, M. (1952). Les stades repérés des arbres fruitiers à noyau. *Revue Romande d'Agriculture et d'Arboriculture*, 8, 3–4.
- Balogh, E., Halász, J., Soltész, A., Erös-Honti, Z., Gutermuth, Á., Szalay, L., Höhn, M., Vágújfalvi, A., Galiba, G., & Hegedüs, A. (2019). Identification, structural and functional characterization of dormancy regulator genes in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–16.
- Batlle, I., Iglesias, I., Cantin, C. M., Badenes, M. L., Ríos, G., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., López-Corrales, M., Guerra, M. E., Alonso, J. M., Socias i Company, R., Rodrigo, J., García-Montiel, F., & García-Brunton, J. (2018). Frutales de hueso y pepita. En J. García-Brunton, O. Tornero, J. Cos-Terrer, L. Ruíz-García, & E. Sanchez (Eds.), *Influencia del cambio climático en la mejora genética de plantas* (pp. 79–132). Compobell, S.L.
- Benmoussa, H., Ghrab, M., Ben Mimoun, M., & Luedeling, E. (2017a). Chilling and heat requirements for local and foreign almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars in a warm Mediterranean location based on 30 years of phenology records. *Agricultural and Forest Meteorology*, 239, 34–46.
- Benmoussa, H., Luedeling, E., Ghrab, M., Ben Yahmed, J., & Ben Mimoun, M. (2017b). Performance of pistachio (*Pistacia vera* L.) in warming Mediterranean orchards. *Environmental and Experimental Botany*, 140, 76–85.
- Beppu, K., Komatsu, N., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Tao, R., & Kataoka, I. (2005). *Se*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(6), 760–764.
- Beppu, K., Konishi, K., & Kataoka, I. (2012a). *S*-haplotypes and self-compatibility of the Japanese plum cultivar ‘Karari.’ *Acta Horticulturae*, 929, 261–266.
- Beppu, K., Kumai, M., Yamane, H., Tao, R., & Kataoka, I. (2012b). Molecular and genetic analyses of the *S*-haplotype of the self-compatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) ‘Methley.’ *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(5), 493–498.
- Beppu, K., Syogase, K., Yamane, H., Tao, R., & Kataoka, I. (2010). Inheritance of self-compatibility conferred by the *Se*-haplotype of Japanese plum and development of *Se-RNase* gene-specific PCR primers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 85, 215–2018.
- Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., & Tao, R. (2003). Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(3), 315–318.

- Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., & Tao, R. (2002). Diversity of *S-RNase* genes and *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(6), 658–664.
- Bielenberg, D. G., Wang, Y., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., Scorza, R., & Abbott, A. G. (2008). Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics and Genomes*, 4(3), 495–507.
- Boonprakob, U., Byrne, D. H., Graham, C. J., & Smith, B. R. (2001). Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 126(4), 451–461.
- Bošković, R., & Tobutt, K. R. (1996). Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica*, 90(2), 245–250.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M., & Davis, R. (1980). Construction of a linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314–331.
- Bourguiba, H., Scotti, I., Sauvage, C., Zhebentyayeva, T., Ledbetter, C., Krška, B., Remay, A., D’Onofrio, C., Iketani, H., Christen, D., Krichen, L., Trifi-Farah, N., Liu, W., Roch, G., & Audergon, J. M. (2020). Genetic structure of a worldwide germplasm collection of *Prunus armeniaca* L. reveals three major diffusion routes for varieties coming from the species’ center of origin. *Frontiers in Plant Science*, 11(638), 1–17.
- Brantley, W. (2004). About Pluots. *Gastronomica*, 4(3), 84–89.
- Brown, D. S., & Kotob, F. A. (1956). Growth of flower buds of apricot, peach, and pear during rest period. *American Society for Horticultural Science*, 69, 158–164.
- Burbank, L. (1914). *Luther Burbank: His Methods and Discoveries and Their Practical Application*. Luther Burbank Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Burgos, L., Egea, J., Guerriero, R., Viti, R., Monteleone, P., & Audergon, J. M. 1997. The self-compatibility trait of the main apricot cultivars and new selections from breeding programmes. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 72(1), 147–154.
- Byrne, D. H., & Littleton, T. G. (1988). Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113, 918–924.

- Cabe, P.R., Baumgarten, A., Onan, K., Luby, J.J., & Bedford, D.S. (2005). Using microsatellite analysis to verify breeding records: A study of ‘Honeycrisp’ and other cold-hardy apple cultivars. *HortScience*, *40*, 15–17.
- Cachi, A. M., & Wunsch, A. (2014). Characterization of self-compatibility in sweet cherry varieties by crossing experiments and molecular genetic analysis. *Tree Genetics & Genomes*, *10*, 1205–1212.
- Campoy, J.A., Lerigoleur-Balsemin, E., Christmann, H., Beauvieux, R., Girollet, N., Quero-García, J., Dirlewanger, E., & Barreneche, T. (2016). Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biology*, *16*, 1–15.
- Campoy, J. A., Ruiz, D., Alderman, L., Cook, N., & Egea, J. (2012). The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). *European Journal of Agronomy*, *37*(1), 43–55.
- Campoy, J. A., Ruiz, D., & Egea, J. (2010). Effects of shading and thidiazuron+oil treatment on dormancy breaking, blooming and fruit set in apricot in a warm-winter climate. *Scientia Horticulturae*, *125*(3), 203–210.
- Campoy, J. A., Ruiz, D., & Egea, J. (2011). Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Scientia Horticulturae*, *130*(2), 357–372.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W.F., Boritzki, M., & Struss, D. (2001). DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *126*, 205–209.
- Carrasco, B., Díaz, C., Moya, M., Gebauer, M., & García-González, R. (2012). Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina*) using SSR and ISSR molecular markers. *Ciencia e Investigación Agraria*, *39*(3), 533–543.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W. G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E., & Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: Isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, *99*(1–2), 65–72.
- Citadin, I., Raseira, M. C. B., Herter, F. G., & Baptista Da Silva, J. (2001). Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience*, *36*(2), 305–307.
- Community Plant Variety Office. (2021). *CPVO Annual Statistics*. <https://cpvo.europa.eu/> (último acceso septiembre 2021).
- Covarrubias-Pazarán, G., Díaz-García, L., Schlautman, B., Salazar, W., & Zalapa, J. (2016). Fragman: An R package for fragment analysis. *BMC Genetics*, *17*, 1–8.

- Crisosto, C. H., Crisosto, G. M., Echeverria, G., & Puy, J. (2007). Segregation of plum and pluot cultivars according to their organoleptic characteristics. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 271–276.
- de Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants* (2nd ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Dennis, F. G. (2003). Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *HortScience*, 38(3), 347–350.
- Díaz, D. H. ., Rasmussen, H. P., & Dennis, F. G. (1981). Scanning electron microscope examination of flower bud differentiation in sour cherry. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 4, 513–514.
- Dicenta, F., Ortega, E., Cánovas, J. A., & Egea, J. (2002). Self- pollination vs. cross-pollination in almond: pollen tube growth, fruit set and fruit characteristics. *Plant Breeding*, 121, 163–167.
- Díez-Palet, I., Funes, I., Savé, R., Biel, C., Herralde, F. de, Miarnau, X., Vargas, F., Àvila, G., Carbó, J., & Aranda, X. (2019). Blooming under Mediterranean climate: Estimating cultivar-specific chill and heat requirements of almond and apple trees using a statistical approach. *Agronomy*, 9(11), 1–21.
- Ding, M., Wang, K., Wang, W., Chen, M., Wu, D., Xu, C., & Chen, K. (2017). Development of high quality EST-SSR markers without stutter bands in peach and their application in cultivar discrimination and hybrid authentication. *HortScience*, 52, 24–30.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., & Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 127–138.
- Downey, S.L., & Iezzoni, A.F. (2000). Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125, 76–80.
- Egea, J., Ortega, E., Martínez-Gómez, P., & Dicenta, F. (2003). Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 50(1), 79–85.
- Fadón, E., Fernandez, E., Behn, H., & Luedeling, E. (2020a). A conceptual framework for winter dormancy in deciduous trees. *Agronomy*, 10(2), 241.
- Fadón, E., Herrera, S., Guerrero, B. I., Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2020b). Chilling and

- Heat Requirements of Temperate Stone. *Agronomy*, 10(409), 1–32.
- Fadón, E., Herrera, S., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2021a). Male meiosis in sweet cherry is constrained by the chilling and forcing phases of dormancy. *Tree Physiology*, 41(4), 619–630.
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2015). Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. *Scientia Horticulturae*, 192, 141–147.
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2018a). Dormant flower buds actively accumulate starch over winter in sweet cherry. *Frontiers in Plant Science*, 9, 171.
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2019a). Anther and pollen development in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in relation to winter dormancy. *Protoplasma*, 256(3), 733–744.
- Fadón, E., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2019b). Flower bud development and winter dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Horticulturae*, 1231, 1–6.
- Fadón, E., & Rodrigo, J. (2018). Unveiling winter dormancy through empirical experiments. *Environmental and Experimental Botany*, 152, 28–36.
- Fadón, E., Rodrigo, J., & Herrero, M. (2018b). Is there a specific stage to rest? Morphological changes in flower primordia in relation to endodormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Trees*, 32(6), 1583–1594.
- Fadón, E., Rodrigo, J., & Luedeling, E. (2021b). Cultivar-specific responses of sweet cherry flowering to rising temperatures during dormancy. *Agricultural and Forest Meteorology*, 307, 108486.
- Fadón, E., Rodrigo, J., & Luedeling, E. (2021c). Site-specific agroclimatic requirements for sweet cherry cultivars in Bonn (Germany) and Zaragoza (Spain) reveal shortcomings in current methodologies and models. *Agricultural and Forest Meteorology*, Submitted.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- FAOSTAT. (2021). *Food and Agriculture Organization. Agricultural Statistics Database*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (último acceso abril 2021).
- Faust, M., & Surányi, D. (2011). Origin and dissemination of plums. En J. Janick (Ed.), *Origin and dissemination of Prunus crops: peach, cherry, apricot, plum and almond* (17th ed., pp. 139–186). Horticultural Reviews, Gent- Oostakker, Bélgica.
- Faust, M., Timon, B., Surányi, D., Nyujtó, F., & Gradziel, T. M. (2011). Origin and

- dissemination of *Prunus* crops: peach, cherry, apricot, plum and almond. In *Horticultural Reviews*, 17(11).
- Fernandez, E., Whitney, C., & Luedeling, E. (2020). The importance of chill model selection — a multi-site analysis. *European Journal of Agronomy*, 119, 126103.
- Fernández i Martí, A., Gradziel, T. M., & Socias i Company, R. (2014). Methylation of the *Sf* locus in almond is associated with *S-RNase* loss of function. *Plant Molecular Biology*, 86, 681–689.
- Ferrero Klabunde, G. H., Dalbó, M. A., & Nodari, R. O. (2014). DNA fingerprinting of Japanese plum (*Prunus salicina*) cultivars based on microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(3), 139–145.
- Fiol, A., García-Gómez, B. E., Jurado-Ruiz, F., Alexiou, K., Howad, W., & Aranzana, M. J. (2021). Characterization of Japanese plum (*Prunus salicina*) PsMYB10 alleles reveals structural variation and polymorphisms correlating with fruit skin color. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1–17.
- Fishman, S., Erez, A., & Couvillon, G. A. (1987). The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *Journal of Theoretical Biology*, 124(4), 473–483.
- Frutaria. (2021). *Frutaria*. <https://frutaria.com/marcas> (último acceso junio 2021).
- Gannouni, T. A., Campoy, J. A., Quero-García, J., Barreneche, T., Arif, A., Albouchi, A., & Ammari, Y. (2017). Dormancy related traits and adaptation of sweet cherry in Northern Africa: A case of study in two Tunisian areas. *Scientia Horticulturae*, 219, 272–279.
- García-Gómez, B., Razi, M., Salazar, J.A., Prudencio, A.S., Ruiz, D., Dondini, L., & Martínez-Gómez, P. (2018). Comparative analysis of SSR markers developed in exon, intron, and intergenic regions and distributed in regions controlling fruit quality traits in *Prunus* species: Genetic diversity and association studies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 36, 23–35.
- Gao, Z., Zhuang, W., Wang, L., Shao, J., Luo, X., Cai, B., & Zhang, Z. (2012). Evaluation of chilling and heat requirements in japanese apricot with three models. *HortScience*, 47(12), 1826–1831.
- Gharbi, O., Wunsch, A., & Rodrigo, J. (2014). Characterization of accessions of ‘Reine Claude Verte’ plum using *Prunus* SRR and phenotypic traits. *Scientia Horticulturae*, 169, 57–65.
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2–3), 377–388.

- Google-Patents. (2021). *Google Patents*.
<https://patents.google.com/patent/USPP16590P2/en> (último acceso agosto 2021).
- Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical *F*-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5, 184–186.
- Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y., & Bar-David, S. (2014). Allelic richness following population founding events - A stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. *PLoS ONE*, 9(12), 1–23.
- Griggs, W. H. (1953). *Pollination requirements of fruit and nuts*. College of Agriculture University of California.
- Guerra, M. E. (2011). *Polinización y cuajado en ciruelo japonés*. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura.
- Guerra, M. E., Guerrero, B. I., Casadomet, C., & Rodrigo, J. (2020). Self-(in)compatibility, *S-RNase* allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Scientia Horticulturae*, 261, 109022.
- Guerra, M. E., López-Corrales, M., & Wunsch, A. (2012). Improved *S*-genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum. *Euphytica*, 186(2), 445–452.
- Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2015). Japanese plum pollination: A review. *Scientia Horticulturae*, 197, 674–686.
- Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2016). Necesidades de polinización de las principales variedades de ciruelo japonés cultivadas en España. *Agrícola Vergel*, 147–150.
- Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2017). Ciruelo japonés. Renovación varietal y mejora genética. *Agricultura*, 573–576.
- Guerra, M. E., Rodrigo, J., López-Corrales, M., & Wunsch, A. (2009). *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding*, 128(3), 304–311.
- Guerra, M. E., Wunsch, A., López-Corrales, M., & Rodrigo, J. (2010). Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(6), 556–562.
- Guerra, M. E., Wunsch, A., López-Corrales, M., & Rodrigo, J. (2011). Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(6), 375–381.
- Guerrero, B. I., Guerra, M. E., Herrera, S., Irisarri, P., Pina, A., & Rodrigo, J. (2021). Genetic diversity and population structure of Japanese plum-type (hybrids of *P. salicina*) accessions assessed by SSR markers. *Agronomy*, 11, 1748.

- Guerrero, B. I., Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2018a). El ciruelo japonés, estructura varietal y necesidades de polinización. *Vida Rural*, 50–54.
- Guerrero, B. I., Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2018b). Situación y perspectivas del cultivo del ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.). *Revista de Fruticultura*, 2(1), 82–91.
- Guerrero, B. I., Guerra, M. E., & Rodrigo, J. (2020). Establishing pollination requirements in Japanese plum by phenological monitoring, hand pollinations, fluorescence microscopy and molecular genotyping. *Journal of Visualized Experiments*, 165, 1–21.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., & Forster, R. (1997). Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical Applied Genetics*, 94, 249–254.
- Guillamón, J. G., Prudencio, Á. S., Yuste, J. E., Dicenta, F., & Sánchez-Pérez, R. (2020). Ascorbic acid and prunasin, two candidate biomarkers for endodormancy release in almond flower buds identified by a nontargeted metabolomic study. *Horticulture Research*, 7(1), 203.
- Guimond, C. M., Andrews, P. K., & Lang, G. A. (1998). Scanning electron microscopy of floral initiation in sweet cherry. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 123(4), 509–512.
- Guo, L., Dai, J., Ranjitkar, S., Yu, H., Xu, J., & Luedeling, E. (2014). Chilling and heat requirements for flowering in temperate fruit trees. *International Journal of Biometeorology*, 58(6), 1195–1206.
- Halász, J., Hegedüs, A., Hermán, R., Stefanovits-Bányai, É., & Pedryc, A. (2005). New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis. *Euphytica*, 145(1), 57–66.
- Halász, J., Hegedus, A., Szabó, Z., Nyéki, J., & Pedryc, A. (2007). DNA-based S-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *HortScience*, 42(1), 46–50.
- Halász, J., Kodad, O., Galiba, G. M., Skola, I., Ercisli, S., Ledbetter, C. A., & Hegedüs, A. (2019). Genetic variability is preserved among strongly differentiated and geographically diverse almond germplasm: an assessment by simple sequence repeat markers. *Tree Genetics and Genomes*, 15(1), 12.
- Halász, J., Pedryc, A., Ercisli, S., Yilmaz, K., & Hegedüs, A. (2010). S-genotyping supports the genetic relationships between Turkish and Hungarian apricot germplasm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135 (5), 410–417.

Referencias

- Hartmann, W., & Neümuller, M. (2009). Plum breeding. En S. M. Jain & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops: Temperate species*. (pp. 161–231). Springer Science.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2005). The effect of temperature on pollen germination, pollen tube growth, and stigmatic receptivity in peach. *Plant Biology*, 7, 476–483.
- Hedhly, A., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2007). Warm temperatures at bloom reduce fruit set in sweet cherry. *Journal of Applied Botany*. 81, 158–164.
- Hedrick, U. P. (1911). *The Plums of New York*. J.B. Lyon Company, State Printers.
- Hegedűs, A., & Halász, J. (2007). Recent findings of the tree fruit self-incompatibility. *Studies. International Journal of Horticultural Science*, 13(2).
- Herrera, S., Hormaza, J. I., Lora, J., Ylla, G., & Rodrigo, J. (2021a). Molecular characterization of genetic diversity in apricot cultivars : current situation and future perspectives. *Agronomy*, 11(9), 1714.
- Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J. I., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2018a). Optimizing production in the new generation of apricot cultivars: self-incompatibility, *S-RNase* allele identification, and incompatibility group assignment. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–12.
- Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J. I., & Rodrigo, J. (2020). Determination of self- and inter-(in)compatibility relationships in apricot combining hand-pollination, microscopy and genetic analyses. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. (160), 1-12.
- Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J. I., & Rodrigo, J. (2021b). Pollination management in stone fruits crops. En M. M. Mir, U. Iqbal, & S. A. Mir (Eds.), *Production Technology of Stone Fruits* (pp. 75–102). Springer Nature.
- Herrera, S., Rodrigo, J., Hormaza, J. I., & Lora, J. (2018b). Identification of self-incompatibility alleles by specific PCR analysis and *S-RNase* sequencing in apricot. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1–14.
- Herrero, M., & Salvador, J. (1980). La polinización del ciruelo Red Beaut. *Información Técnica Económica Agraria*, 41, 3-7.
- Herrero, M., & Hormaza, J. I. (1996). Pistil strategies controlling pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 9(6), 343–347.
- Hervé, M. (2021). *R package RVAideMemoire: Testing and Plotting Procedures for Biostatistics* (0.9-80). <https://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire> (último acceso abril 2021)

- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F., & McFerson, J.R. (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 671–683.
- Hormaza, J. I. (2002). Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s001220100684>
- Hormaza, J. I., Pinney, K., & Polito, V. S. (1996). Correlation in the tolerance to ozone between sporophytes and male gametophytes of several fruit and nut tree species (Rosaceae). *Sexual Plant Reproduction.*, 9, 44–48.
- Howard, W. L. (1945). *Luther Burbank's plant contributions*. Universidad de California, Berkeley, California.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609–623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- IPS. (2021). *International Plant Selection*. <https://www.ips-plant.com/es/> (último acceso junio 2021).
- Ishizaka, T., Nakano, H., Suzuki, T., & Kitashiba, H. (2003). Characterization of the *S-RNase* promoters from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Genes and Genetic Systems*, 78(2), 191–194.
- Jain, S.M., & Priyadarshan, P.M. 2009. *Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species*, 1st ed.; Springer, Nueva York, Estados Unidos.
- Jia, H. J., He, F. J., Xiong, C. Z., Zhu, F. R., & Okamoto, G. (2008). Influences of cross pollination on pollen tube growth and fruit set in Zuili plums (*Prunus salicina*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 203–209.
- Johnston, H. R., Keats, B. J. B., & Sherman, S. L. (2019). 12 - Population Genetics. En R. E. Pyeritz, B. R. Korf, & E. Grody (Eds.), *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics* (7th Edition, pp. 359–373). Academic Press.
- Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405.
- Jombart, T. (2012). A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 1.3-4. 1–43. <https://github.com/thibautjombart> (último acceso abril 2021).

- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, *11*(1), 94.
- Julian, C., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2010). Flower bud differentiation and development in fruiting and non-fruiting shoots in relation to fruit set in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Trees*, *24*(5), 833–841.
- Julian, C., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2014). Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Environmental and Experimental Botany*, *100*, 20–25.
- Julian, C., Rodrigo, J., & Herrero, M. (2011). Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). *Annals of Botany*, *108*(4), 617–625.
- Jun, J., Kwon, J. H., & Chung, K. H. (2007). Identification of self-incompatibility genotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) by polymerase chain reaction and cross-pollination test. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, *48*, 228–234.
- Kalinowski, S. T. (2004). Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, *5*(4), 539–543.
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr : an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, e281.
- Karp, D. (2015). Luther Burbank ' s Plums. *HortScience*, *50*(2), 189–194.
- Kitashiba, H., Zhang, S. L., Wu, J., Shirasawa, K., & Nishio, T. (2008). *S* genotyping and *S* screening utilizing *SFB* gene polymorphism in Japanese plum and sweet cherry by dot-blot analysis. *Molecular Breeding*, *21*(3), 339–349.
- Kodad, O., Alonso, J. M., Fernández i Martí, A., Oliveira, M. M., & Socias i Company, R. (2010). Molecular and physiological identification of new *S*-alleles associated with self-(in)compatibility in local Spanish almond cultivars. *Scientia Horticulturae*, *123*(3), 308–311.
- Kwon, J. H., Jun, J. H., Nam, E. Y., Chung, K. H., Hong, S. S., Yoon, I. K., Yun, S. K., & Kwack, Y. B. (2015). Profiling diversity and comparison of Eastern and Western cultivars of *Prunus persica* based on phenotypic traits. *Euphytica*, *206*(2), 401–415.
- Lamp, B. M., Connell, J. H., Duncan, R. A., Viveros, M., & Polito, V. S. (2001). Almond flower development: Floral initiation and organogenesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *126*(6), 689–696.
- Lang, G., Early, J., Arroyave, N., Martin, G., Darnell, R., & Stutte, G. (1985). Dormancy:

- toward a reduced universal terminology. *HortScience*, 20, 809–812.
- Lang, G., Early, J., Martin, G., & Darnell, R. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22, 371–377.
- Lee, K.J., Lee, J.R., Sebastin, R., Cho, G.T., & Hyun, D.Y. (2020). Molecular genetic diversity and population structure of ginseng germplasm in RDA-geneBank: Implications for breeding and conservation. *Agronomy*, 10, 68.
- Lee, K.J., Lee, J.R., Sebastin, R., Shin, M.J., Kim, S.H., Cho, G.T., & Hyun, D.Y. (2019). Genetic diversity assessed by genotyping by sequencing (GBS) in watermelon germplasm. *Genes*, 10, 822.
- Leida, C., Terol, J., Martí, G., Agustí, M., Llácer, G., Badenes, M. L., & Ríos, G. (2010). Identification of genes associated with bud dormancy release in *Prunus persica* by suppression subtractive hybridization. *Tree Physiology*, 30(5), 655–666. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq008>
- Lloret, A., Conejero, A., Leida, C., Petri, C., Gil-Muñoz, F., Burgos, L., Badenes, M. L., & Ríos, G. (2017a). Dual regulation of water retention and cell growth by a stress-associated protein (*SAP*) gene in *Prunus*. *Scientific Reports*, 7(1), 1–15.
- Lloret, A., Martínez-Fuentes, A., Agustí, M., Badenes, M. L., & Ríos, G. (2017b). Chromatin-associated regulation of sorbitol synthesis in flower buds of peach. *Plant Molecular Biology*, 95(4), 507–517.
- López, M., Jose, F., Vargas, F. J., & Battle, I. (2006). Self- (in)compatibility almond genotypes: a review. *Euphytica*, 150, 1-16.
- Lora, J., Hormaza, J. I., & Herrero, M. (2016). The diversity of the pollen tube pathway in plants: toward an increasing control by the sporophyte. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–12.
- Lora, J., Hormaza, J. I., Herrero, M., & Rodrigo, J. (2019). Self-incompatibility and *S*-allele identification in new apricot cultivars. *Acta Horticulturae*, 1231, 171–176.
- Lucia, M., Vieira, C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328.
- Luedeling, E. (2012). Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: A review. *Scientia Horticulturae*, 144, 218–229.
- Luedeling, E., & Brown, P. H. (2011). A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees. *International Journal of Biometeorology*, 55(3), 411–421.

Referencias

- Luedeling, E., Girvetz, E. H., Semenov, M. A., & Brown, P. H. (2011). Climate change affects winter chill for temperate fruit and nut trees. *PLoS ONE*, 6(5), e20155.
- Luedeling, E., Guo, L., Dai, J., Leslie, C., & Blanke, M. M. (2013a). Differential responses of trees to temperature variation during the chilling and forcing phases. *Agricultural and Forest Meteorology*, 181, 33–42.
- Luedeling, E., Kunz, A., & Blanke, M. M. (2013b). Identification of chilling and heat requirements of cherry trees - a statistical approach. *International Journal of Biometeorology*, 57(5), 679–689.
- Luedeling, E., Schiffers, K., Fohrmann, T., & Urbach, C. (2021). PhenoFlex - an integrated model to predict spring phenology in temperate fruit trees. *Agricultural and Forest Meteorology*, 307, 108491.
- Luedeling, E., Zhang, M., Luedeling, V., & Girvetz, E. H. (2009). Sensitivity of winter chill models for fruit and nut trees to climatic changes expected in California's Central Valley. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 133(1–2), 23–31.
- Manaresi, A. (1950). On the origin and genetic constitution of the black apricot *Prunus dasycarpa* Ehrh. (In italian). *Memorie Accademia Scienze Istituto Di Bologna*, VII(X), 19.
- Mangiafico, S. S. (2016). Summary and analysis of Extension Program Evaluation in R. *Rcompanion.Org/Handbook/*, 5(2), 52–62.
- MAPA. (2021). *Superficies y Producciones Anuales de Cultivo. Datos Avances de Frutales Cítricos y Frutales Secos año 2020*. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (último acceso mayo 2021).
- Mas-Gómez, J., Cantín, C.M., Moreno, M., Prudencio, Á.S., Gómez-Abajo, M., Bianco, L., Troglio, M., Martínez-Gómez, P., Rubio, M., & Martínez-García, P.J. (2021). Exploring genome-wide diversity in the national peach (*Prunus persica*) germplasm collection at CITA (Zaragoza, Spain). *Agronomy*, 11, 481.
- Mason, A. S. (2015). SSR genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1245, 77–89.
- Matsumoto, D., & Tao, R. (2016). Distinct Self-recognition in the *Prunus S-RNase*-based Gametophytic Self-incompatibility System. *The Horticulture Journal*, 85(4), 289–305.
- Maulión, E., Hugo, G., Kovalevski, L., Prunello, M., Lucía, L., Elena, M., Quaglino, M., Domingo, G., & Cervigni, L. (2014). Comparison of methods for estimation of chilling and heat requirements of nectarine and peach genotypes for flowering.

- Scientia Horticulturae*, 177, 112–117.
- Mccubbin, A. G., & Kao, T. (2000). Molecular Recognition and Response in Pollen and Pistil Interactions. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 16, 333–364.
- Meier, U. (2001). *Growth Stages of Mono-and Dicotyledonous Plants: BBCH Monograph*. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Alemania.
- Merkouropoulos, G., Ganopoulos, I., Tsaftaris, A., Papadopoulos, I., & Drogoudi, P. (2017). Combination of high resolution melting (HRM) analysis and SSR molecular markers speeds up plum genotyping: Case study genotyping the Greek plum GeneBank collection. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 15(4), 366–375.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Cipriano, G., & Testolin, R. (2004). New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology Notes*, 4, 432–434.
- Milatović, D., & Nikolić, D. (2007). Analysis of self-(in)compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 170-174.
- Milošević, T., & Milošević, N. (2018). Plum (*Prunus* spp.) breeding. In J. D. Al-Khayri J., Jain S. (Ed.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (Vol. 3, pp. 165–215). Springer, Cham.
- Milošević, T., Milošević, N., & Glišić, I. (2013). Agronomic properties and nutritional status of plum trees (*Prunus domestica* L.) influenced by different cultivars. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 706–714.
- Minev, I., & Balev, M. (2002). Interspecific hybrids of the prunus genus bred at RIMSA, Troyan. *Acta Horticulturae*, 577, 195–198.
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Audergon, J. M., & Arús, P. (2010). Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics and Genomes*, 6(5),
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Badenes, M. L., & Arús, P. (2004). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes*, 4(2), 163–166.
- Morimoto, T., Kitamura, Y., Numaguchi, K., Akagi, T., & Tao, R. (2019). Characterization of post-mating interspecific cross-compatibility in *Prunus* (Rosaceae). *Scientia Horticulturae*, 246, 693–699.
- Muñoz-Sanz, J. V., Zuriaga, E., López, I., Badenes, M. L., & Romero, C. (2017). Self-(in)compatibility in apricot germplasm is controlled by two major loci, *S* and *M*.

BMC Plant Biology, 17(1), 82.

- Negueroles, J. (2019). Los híbridos interespecíficos frutales, ¿una realidad o una utopía? *Rica*. <http://rica.chil.me/post/los-hibridos-interespecificos-frutales-c2bfunarealidad-o-una-utopia-159275> (último acceso marzo 2021).
- Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269–5273.
- Neumüller, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1, 139–156.
- Nicolás-Almansa, M., Guevara, A., Rubio, M., Cos, J., Carrillo, A., García-Montiel, F., Salazar, J. A., Martínez-Gómez, P., & Ruiz, D. (2020). The apricot as a source of self-compatibility and Plum pox virus resistance in the generation of interspecific hybrids *Prunus salicina* Lindl. × *Prunus armeniaca* L. (plumcots). *Acta Horticulturae*, 1290, 115–118.
- Nicolás-Almansa, M., Guevara, A., Rubio, M., Cos, J., Carrillo, A., García-Montiel, F., Salazar, J. A., Martínez-Gómez, P., & Ruiz, D. (2021). Molecular and phenotypic characterization of interspecific *Prunus salicina* Lindl. × *Prunus armeniaca* L. (plumcot) hybrids. *Acta Horticulturae*, 1307, 267–274.
- Nyawo, T. A. (2017). *Fingerprinting and molecular characterisation of ARC 's apricot and plum collection*. Trabajo de fin de Master, Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica.
- Okie, W. R. (2005). 'Spring Satin' plumcot. *Journal of the American Pomological Society*, 59(3), 119–124.
- Okie, W. R. (2006). Introgression of *Prunus* species in plum. *New York Fruit Quarterly*, 14(1), 29–37.
- Okie, W. R. (2019a). Register of new fruit and nut varieties. List 41. *HortScience*, 39(6), 1509–1523.
- Okie, W. R. (2019b). Register of new fruit and nut varieties. List 42. *HortScience*, 39(6), 1509–1523.
- Okie, W. R., & Hancock, J. F. (2008). Plums. In J. F. Hancock (Ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding* (pp. 337–357). Springer.
- Okie, W. R., & Ramming, D. W. (1999). Plum breeding worldwide. *HortTechnology*, 9(2), 162–176.
- Okie, W. R., & Weinberger, J. H. (1996). Plums. In J. N. Janick, J., Moore (Ed.), *Fruit*

- breeding. Volume 1: Tree and tropical fruits* (pp. 559–608). John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, Estados Unidos.
- Öz, M. H., Vurgun, H., Bakir, M., Büyük, I., Yüksel, C., Ünlü, H. M., Çukadar, K., Karadoğan, B., Köse, Ö., & Ergül, A. (2013). Molecular analysis of East Anatolian traditional plum and cherry accessions using SSR markers. *Genetics and Molecular Research, 12*(4), 5310–5320.
- Paradis, E. (2010). Pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics, 26*(3), 419–420.
- Penso, G. A., Citadin, I., Scariotto, S., Magalhães dos Santos, C. E., Junior, A. W., Bruckner, C. H., & Rodrigo, J. (2020). Development of peach flower buds under low winter chilling conditions. *Agronomy, 10*(3), 1–20.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A.M., & Díaz-Hernández, M.B. (2007). Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus × domestica* Borkh.) from Spain using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution, 54*, 405–420.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A. M., & Fischer, M. (2009). Breeding apple (*Malus × domestica* Borkh). En S. Mohan & P. M. Priyadarshan (Eds.), *Breeding plantation tree crops: Temperate species*. (pp. 33–82). Springer, Nueva Delhi, India.
- Pérez, V., Larrañaga, N., Abdallah, D., Wunsch, A., & Hormaza, J. I. (2020). Genetic diversity of local peach (*Prunus persica*) accessions from La Palma Island (Canary Islands, Spain). *Agronomy, 10*(4), 457.
- Perry, T. O. (1971). Dormancy of Trees in Winter. *Science, 171*(3966), 29–36.
- Pina, A., Urrestarazu, J., & Errea, P. (2014). Analysis of the genetic diversity of local apple cultivars from mountainous areas from Aragon (Northeastern Spain). *Scientia Horticulturae, 174*(1), 1–9.
- Provedo. (2017). *Ciruelas que evocan al albaricoque*. <https://www.provedo.com/es/ciruelas-evocan-al-albaricoque/> (último acceso junio 2021).
- Qiao, Y. S., Fang, J. G., Cong, Y., Zhou, J., & Zhang, Z. (2007). Analysis of genetic diversity of Japanese plum cultivars based on RAPD, ISSR and SSR markers. *Acta Horticulturae, 763*, 177–183.
- Quesada-Traver, C., Guerrero, B. I., Badenes, M. L., Rodrigo, J., Ríos, G., & Lloret, A. (2020). Structure and Expression of Bud Dormancy-Associated MADS-Box Genes (DAM) in European Plum. *Frontiers in Plant Science, 11*, 1–16.
- R Core Team. (2021). *R: A language and environment for statistical computing*. (4.0.3).

- R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/> (último acceso enero 2021).
- Ramming, D. W. (1976). Diploid plum x apricot interspecific hybrids. *Fruit Variety Journal (APS)*, 30, 17–17.
- Ramming, D. W. (1995) Plum. Register of new fruit and nut varieties: Brooks and Olmo, List 37. *HortScience*, 30 (6), 1142-1144.
- Ramming, D. W., & Cociu, V. (1991). Plums (*Prunus*). *Acta Horticulturae* (290), 235–290).
- Razavi, F., Hajilou, J., Tabatabaei, S. J., & Dadpour, M. R. (2011). Comparison of chilling and heat requirement in some peach and apricot cultivars. *Research in Plant Biology*, 1(2), 40–47.
- Rehder, A. (1940). Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America: Exclusive of the subtropical and warmer temperate regions (2nd ed). MacMillan, Nueva York, Estados Unidos.
- Richardson, E. A., Seeley, S. D., & Walker, D. R. (1974). A model for estimating the completion of rest for ‘Redhaven’ and ‘Elberta’ peach trees. *HortScience*, 9(4), 331–332.
- Rodrigo, J. (2000). Spring frosts in deciduous fruit trees. Morphological damage and flower hardiness. *Scientia Horticulturae*, 85(3), 155–173.
- Rodrigo, J., & Herrero, M. (1996). Evaluation of pollination as the cause of erratic fruit set in apricot 'Moniqui'. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 71(5), 801–805.
- Rodrigo, J., & Herrero, M. (2002). Effects of pre-blossom temperatures on flower development and fruit set in apricot. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 125–135.
- Rodríguez, A., Pérez-López, D., Centeno, A., & Ruiz-Ramos, M. (2021). Viability of temperate fruit tree varieties in Spain under climate change according to chilling accumulation. *Agricultural Systems*, 186, 102961.
- Rodríguez, A., Pérez-López, D., Sánchez, E., Centeno, A., Gómara, I., Dosio, A., & Ruiz-Ramos, M. (2019). Chilling accumulation in fruit trees in Spain under climate change. *Natural Hazards and Earth System Sciences*, 19(5), 1087–1103.
- RStudio-Team. (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. (1.2.5033). RStudio Inc. <http://www.rstudio.com/> (último acceso enero 2021).
- Ruiz, D., Campoy, J. A., & Egea, J. (2007). Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environmental and Experimental Botany*, 61(3), 254–263.

Referencias

- Ruiz, D., Campoy, J. A., & Egea, J. (2010). Ovule development at anthesis in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(1), 151–158.
- Ruiz, D., Cos, J., Egea, J., García, F., Nortes, M. D., Carrillo, A., & Guevara, A. (2019). Progress in the Japanese plum (*Prunus salicina* L.) breeding program developed by CEBAS-CSIC and IMIDA in Murcia, Spain. *Acta Horticulturae*, 1260, 47–48.
- Ruiz, D., Cos, J., Nicolás-Almansa, M., Egea, J., García, F., Carrillo, A., Rubio, M., López, D., Salazar, J. A., & Guevara, A. (2021). New promising Japanese plum cultivars for warm areas from CEBAS-CSIC/IMIDA breeding programme. *Acta Horticulturae*, 1322, 55–60.
- Ruiz, D., Egea, J., Salazar, J. A., & Campoy, J. A. (2018). Chilling and heat requirements of Japanese plum cultivars for flowering. *Scientia Horticulturae*, 242, 164–169.
- Ruml, M., Milatović, D., Đurđević, M., & Boškov, Đ. (2021). Heat requirements for flowering of European and Japanese plum cultivars in the Belgrade region. *Acta Horticulturae*, 1322, 215–220.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Sánchez-Pérez, R., Ballester, J., Dicenta, F., Arús, P., & Martínez-Gómez, P. (2006). Comparison of SSR polymorphisms using automated capillary sequencers, and polyacrylamide and agarose gel electrophoresis: Implications for the assessment of genetic diversity and relatedness in almond. *Scientia Horticulturae*, 108(3), 310–316.
- Sánchez-Pérez, R., Del Cueto, J., Dicenta, F., & Martínez-Gómez, P. (2014). Recent advancements to study flowering time in almond and other *Prunus* species. *Frontiers in Plant Science*, 5(334), 1–7.
- Sapir, G., Stern, R. A., Eisikowitch, D., & Goldway, M. (2004). Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(2), 223–227.
- Sapir, G., Stern, R. A., Shafir, S., & Goldway, M. (2008). *S*-*RNase* based *S*-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. *Scientia Horticulturae*, 118, 8–13.
- Scorza, R., & Okie, W. R. (1991). Peaches (*Prunus*). *Acta Horticulturae*, 290, 177–231.
- Sitther, V., Zhang, D., Dhekney, S. A., Harris, D. L., Yadav, A. K., & Okie, W. R. (2012). Cultivar identification, pedigree verification, diversity analysis among peach

- cultivars simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(2), 114–121.
- Sneath, P., & Sokal, R. . (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. A series of books in Biology. En W. H. Freeman (Ed.), *A series of books in Biology*.
- Socias i Company, R., Kodad, O., Fernández i Martí, A., & Alonso, J. M. (2015). Mutations conferring self-compatibility in *Prunus* species: from deletions and insertions to epigenetic alterations. *Scientia Horticulturae*, 192, 125-131.
- Sonneveld, T., Robbins, T. P., & Tobutt, K. R. (2006). Improved discrimination of self-incompatibility *S-RNase* alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. *Plant Breeding*, 125(3), 305–307.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L. D., Beck, L. E., King, J. J., Ryder, C. D., Rajapakse, S., Baird, W. V., Ballard, R. E., & Abbot, A. G. (2000). Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(3), 421–428.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S.M., & Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 904–909.
- Sutherland, B. G., Tobutt, K. R., & Robbins, T. P. (2008). Trans-specific *S-RNase* and *SFB* alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(1), 95–106.
- Tabuenca, M. C. (1967). Necesidades de frío invernal de variedades de ciruelo. *Annals Estación Experimental Aula Dei*, 8, 383–391.
- Tabuenca, M. C. (1968). Winter chilling requirements of apricot varieties. *Annals Estación Experimental Aula Dei*, 9, 10–24.
- Tabuenca, M. C., Mut, M., & Herrero, J. (1972). The effect of temperature on flowering date in almond varieties. *Annals Estación Experimental Aula Dei*, 11, 378–395.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M., & Sugiura, A. (1997). Identification of stelar *RNases* associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant and Cell Physiology*, 38(3), 304–311.
- Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., & Mori, H. (1999). Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S-RNases* in sweet cherry. *Journal of the American Society for*

Horticultural Science, 124(3), 224–233.

- Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M.T., Pancaldi, M., & Sansavini, S. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43, 512–520.
- Topp, B. L., Russell, D. M., Neumüller, M., Dalbó, M. A., & Liu, W. (2012). Plum. En M. L. Badenes & D. H. Byrne (Eds.), *Fruit breeding* (pp. 571–621). Springer, Estados Unidos.
- Topp, B. L., Sherman, W. B., & Raseira, M. C. B. (2008). Low-chill cultivar development. En D. R. Layne & D. Bassi (Eds.), *The peach botany, production and uses* (pp. 106–138). CABI.
- Urrestarazu, J. (2012). Análisis de la variabilidad del material autóctono de manzano, peral y vid conservado en Bancos del Noreste español. Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Navarra.
- Urrestarazu, J., Errea, P., Miranda, C., Santesteban, L. G., & Pina, A. (2018). Genetic diversity of Spanish *Prunus domestica* L. germplasm reveals a complex genetic structure underlying. *PLoS ONE*, 13(4), 1–20.
- Urrestarazu, J., Royo, J.B., Santesteban, L.G., & Miranda, C. (2015). Evaluating the influence of the microsatellite marker set on the genetic structure inferred in *Pyrus communis* L. *PLoS ONE*, 10, e0138417.
- Vilanova, S., Romero, C., Llácer, G., Badenes, M. L., & Burgos, L. (2005). Identification of self-(in)compatibility alleles in apricot by PCR and sequence analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(6), 893–898.
- Vimont, N., Fouché, M., Campoy, J. A., Tong, M., Arkoun, M., Yvin, J. C., Wigge, P. A., Dirlewanger, E., Cortijo, S., & Wenden, B. (2019). From bud formation to flowering: transcriptomic state defines the cherry developmental phases of sweet cherry bud dormancy. *BMC Genomics*, 20(1), 974.
- Viti, R., Andreini, L., Ruiz, D., Egea, J., Bartolini, S., Iacona, C., & Campoy, J. A. (2010). Effect of climatic conditions on the overcoming of dormancy in apricot flower buds in two Mediterranean areas: Murcia (Spain) and Tuscany (Italy). *Scientia Horticulturae*, 124(2), 217–224.
- Watari, A., Hanada, T., Yamane, H., Esumi, T., Tao, R., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Beppu, K., & Kataoka, I. (2007). A low transcriptional level of *Se-RNase* in the *Se*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(3), 396–406.

- Wei, T., & Simko, V. (2021). *R package 'corrplot': Visualization of a correlation matrix. (Version 0.90)*. <https://github.com/taiyun/corrplot> (último acceso junio 2021).
- Weinberger, J. H. (1950). Chilling requirements of peach varieties. *Proceedings. American Society for Horticultural Science*, 56, 122–128.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370.
- 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(5), 700–708.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics.*, 15(4), 323–354.
- Wright, S. (1978). Evolution and the genetics of populations. En variability within and among natural populations; Universidad de Chicago Press: Chicago, Illinois, Estados Unidos.
- Wünsch, A. (2009). Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 120(3), 348–352.
- Wünsch, A., & Hormaza, J.I. (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125, 59–67.
- Wünsch, A., & Hormaza, J. I. (2002). Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89(1), 56–63.
- Wünsch, A., & Hormaza, J. I. (2004a). Genetic and molecular analysis in Cristobalina sweet cherry, a spontaneous self-compatible mutant. *Sexual Plant Reproduction*, 17(4), 203–210.
- Wünsch, A., & Hormaza, J. I. (2004b). S-allele identification by PCR analysis in sweet cherry cultivars. *Plant Breeding*, 123(4), 327–331.
- Yamane, H., Ikeda, K., Hauck, N. R., Iezzoni, A. F., & Tao, R. (2003). Self-incompatibility (*S*) locus region of the mutated *S*₆- haplotype of sour cherry (*Prunus cerasus*) contains a functional pollen *S* allele and a non-functional pistil *S* allele. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2431–2437.
- Yamane, H., Tao, R., Ooka, T., Jotatsu, H., Sasaki, R., & Yonemori, K. (2011). Comparative analyses of dormancy-associated *MADS-box* genes, *PpDAM5* and *PpDAM6*, in low- and high-chill peaches (*Prunus persica* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80(3), 276–283.

- Yamane, H., Tao, R., & Sugiura, A. (1999). Identification and cDNA Cloning for *S-RNases* in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). *Plant Biotechnology*, 16(5), 389–396.
- Yamane, H., Tao, R., Sugiura, A., Hauck, N. R., & Iezzoni, A. F. (2001). Identification and characterization of *S-RNases* in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 661–667.
- Yoshida, M. (1987). The origin of fruits. 2: Plums. *Fruit Japan*, 42(2), 49–53.
- Zaiger, Gary, Gardner, L., & Zaiger, Grant. (2006). *United States Plant Patent*. <https://patents.google.com/patent/USPP16590P2/en> (último acceso agosto 2021)
- Zhang, S.-L., Huang, S.-X., Heng, W., Wu, H. Q., & Wu, J. (2008). Identification of *S*-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterisation of 13 novel *S*-alleles. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(5), 635–640.
- Zhang, S.-L., Huang, S.-X., Kitashiba, H., & Nishio, T. (2007). Identification of *S*-haplotype-specific F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sexual Plant Reproduction*, 20(1), 1–8.
- Zhuang, W., Cai, B., Gao, Z., & Zhang, Z. (2016). Determination of chilling and heat requirements of 69 Japanese apricot cultivars. *European Journal of Agronomy*, 74, 68–74.

ANEXO 1

Guerrero, B., Rodrigo, J., Guerra, M.E. (2018). Situación y perspectivas del cultivo del ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.). La marca de calidad CiEx® en Extremadura. *Revista de Fruticultura*, 65, 82-91.



Situación y perspectivas del cultivo del ciruelo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.). La marca de calidad CiEx® en Extremadura

B. GUERRERO¹, J. RODRIGO¹, M.E. GUERRA²

(1) Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2 (CITA–Universidad de Zaragoza).

(2) Departamento de Hortofruticultura. CICYTEX–Centro de Investigación ‘Finca La Orden–Valdesequera’.

RESUMEN

La producción de ciruelas a nivel nacional se ha mantenido en los últimos años alrededor de las 200.000 t, colocando a España como uno de los principales productores de la Unión Europea. A nivel nacional Extremadura y Andalucía son las principales CC. AA. en producción y superficie de cultivo. El aumento de las exigencias de los consumidores respecto al sabor y calidad de la fruta es uno de los factores que ha provocado la renovación varietal en que está inmerso el cultivo. La necesidad de garantizar la calidad y fidelizar a los consumidores ha propiciado la aparición de la marca de calidad CiEx® (Ciruela de Extremadura) que garantiza el origen y calidad de la fruta de las variedades incluidas en el sello: 'Angeleno', 'Black Splendor', 'Crimson Globe', 'Fortune', 'Golden Globe', 'Larry Ann', 'Owen-T' y 'Primetime'. En este trabajo se describen la situación y tendencias del cultivo y las principales características de las variedades incluidas en la nueva marca de calidad.

Palabras clave: Ciruelas, Ciruelo japonés, Época de maduración, Fruto, Marca de calidad.

ABSTRACT

Situation and trends of Japanese plum (hybrids of *Prunus salicina* Lindl.). The CiEx® territorial brand in Extremadura. The average production of plums in Spain is around 200.000 t/year, placing Spain as one of the main producers in the European Union. Extremadura and Andalucía are the main regions in production and cultivated area. The increase in the demands of consumers regarding the flavour and quality of the fruit is one of the main factors that is causing the varietal renewal of the crop. The need to guarantee quality and consumer loyalty has led to the appearance of the territorial brand CiEx® (*Ciruela de Extremadura*) that guarantees the origin and quality of the fruit from the cultivars included: 'Angeleno', 'Black Splendor', 'Crimson Globe', 'Fortune', 'Golden Globe', 'Larry Ann', 'Owen-T' and 'Primetime'. In this work, the situation and trends of the crop are described, as well as the main characteristics of the cultivars.

Key words: Plum, Japanese plum, Ripening time, Fruit, Territorial brand.

Foto entrada: Variedad 'Golden Globe'.

Situación del cultivo del ciruelo

El ciruelo, con una producción de unas 12.000.000 t, es el frutal de hueso más cultivado a nivel mundial, por delante del grupo melocotonero-nectarino, albaricoquero y cerezo (FAOSTAT, 2018). Los principales países productores son China, con un 55,4% de la producción mundial, seguida de Rumanía (4,3%), Serbia (3,8%), EE. UU. (3,3%), Turquía (2,5%), Chile (2,4%), Irán e India (ambos con 2,2%) y España, Francia e Italia (1,8%, cada uno) (FAOSTAT, 2018). En las estadísticas oficiales no se diferencia entre ciruelo de tipo europeo (*Prunus domestica* L.) y de tipo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.), por lo que los datos incluyen ambos cultivos. En países como Rumanía, Serbia y EE. UU., un importante porcentaje de la producción corresponde a la ciruela de tipo europeo (NEUMÜLLER, 2011), mientras que en otros países como Chile, España, Francia e Italia se cultivan ambos tipos de ciruelo.

A nivel nacional la producción media de ciruelas en los últimos 11 años ha superado las 200.000 t anuales, aunque la producción varía mucho de un año a otro; no se alcanzaron 180.000 t en 2006 y 2013, mientras que fue superior a 230.000 t en 2009, 2011 y 2014 (Figura 1). La superficie de cultivo es aproximadamente 16.000 ha, lo que coloca al cultivo del ciruelo como el 4º frutal de hueso más cultivado en España (MAPAMA, 2018). El cultivo ciruelo japonés representa el 60% del

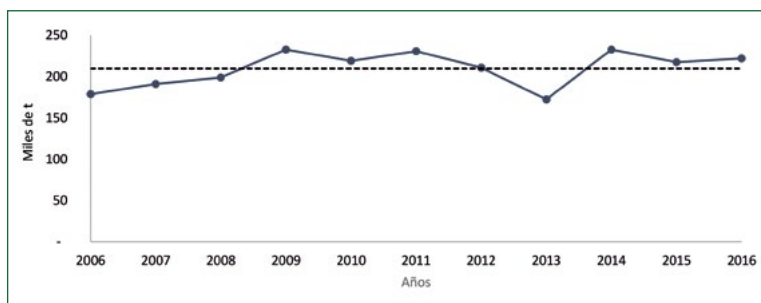


Figura 1. Evolución de la producción de ciruelo en España durante el periodo 2006–2016 (FAOSTAT, 2018). La línea punteada representa el valor medio durante el periodo.

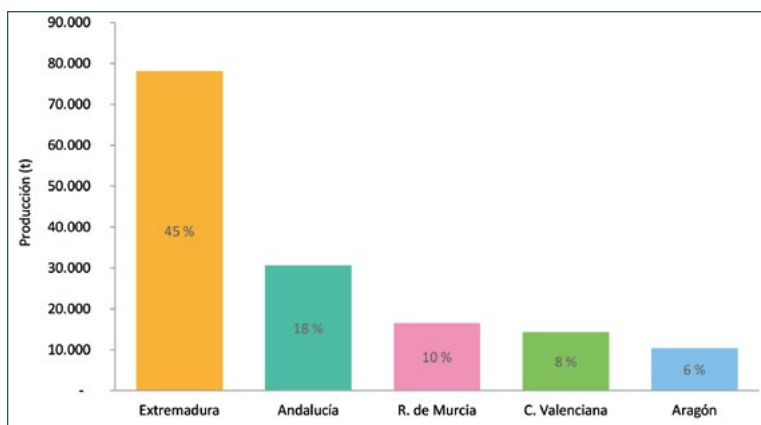


Figura 2. Producción de ciruelo de las principales CC. AA. productoras en 2017 (MAPAMA, 2018).

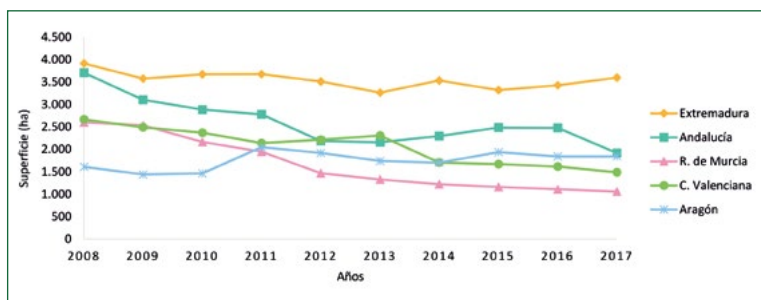


Figura 3. Evolución de la superficie de cultivo de ciruelo en los últimos once años en las principales CC. AA. productoras (MAPAMA, 2018).

total del cultivo de ciruelo nacional (MAPAMA, 2018). Las principales comunidades autónomas productoras de ciruelo son Extremadura (80.000 t en 6.700 ha), Andalucía (30.600 t en 2.300 ha), Región de Murcia (16.500 t con 800 ha) y Comunidad Valenciana (14.300 t en 1.700 ha), donde se cultivan principalmente variedades de tipo japonés, y Aragón (10.400 t en 1.100 ha), donde también se cultivan ciruelas europeas (MAPAMA, 2018) (Figura 2). La producción a nivel nacional ha aumentado en los últimos diez años, aunque la superficie ha disminuido un 28%. La tendencia

varía entre comunidades autónomas; ha crecido en Aragón y Extremadura y descendido en Andalucía, Comunidad Valenciana y Región de Murcia (MAPAMA, 2018) (Figura 3).

En los últimos años se ha producido una importante renovación varietal que ha provocado la introducción de un gran número de variedades, con lo que se ha ampliado el periodo de recolección, que comienza en mayo, con las variedades más tempranas, y termina en septiembre, con las variedades de maduración tardía (GUERRA y RODRIGO, 2017). La mayoría de las variedades son au-



¡MÁRCATE UN TRIPLE EN TU CAMPO!

Sunde ®

Metil clorpirifos 22,4% p/v (EC)

**UN INSECTICIDA DE GRAN EFICACIA
CON TRIPLE MODO DE ACCIÓN**

 tradecorp

www.tradecorp.es



Abeja polinizando flores de ciruelo japonés.



Variedad 'Black Splendor'.



Variedad 'Primetime'.

toincompatibles y necesitan polinización cruzada (RODRIGO y GUERRA, 2014), por lo que necesitan cultivarse junto a otras variedades compatibles y coincidentes en floración. En la actualidad se dispone de mucha información para la elección de variedades polinizadoras. Las tablas de grupos de incompatibilidad permiten conocer las variedades compatibles entre sí, lo que facilita la elección

de variedades polinizadoras coincidentes en floración en cada zona de cultivo (GUERRA y RODRIGO, 2015). Es recomendable introducir más de una variedad polinizadora, ya que la época de floración de cada variedad puede presentar variaciones de un año a otro. Para asegurar el transporte del polen al pistilo de las flores, es importante asegurar la presencia de insectos polinizadores, con la intro-



Variedad 'Owen T'.



Variedad 'Larry Ann'.

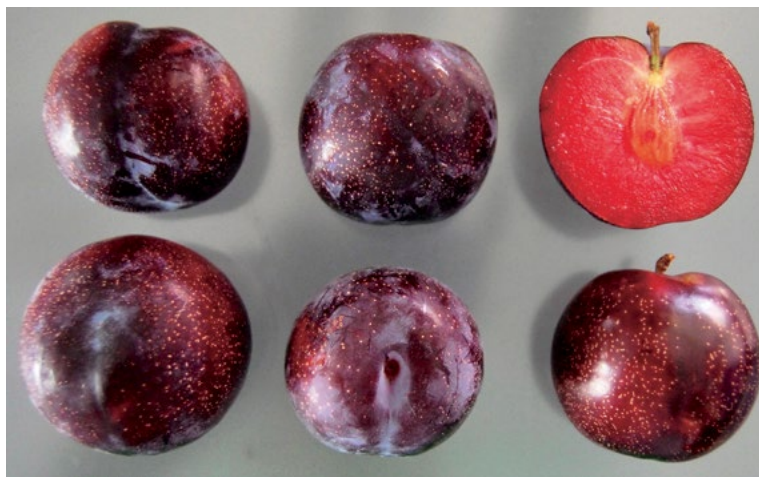
ducción de abejas o abejorros. La actividad de los insectos puede verse afectada durante la floración por temperaturas frías y otros factores meteorológicos adversos como lluvia, viento o niebla.

La ciruela de tipo japonés

Las ciruelas de tipo japonés presentan unas características propias de tamaño, apariencia y sabor que las diferencian de otras frutas de hueso. En general, son frutos redondeados, grandes y firmes, con el hueso pequeño en relación al tamaño del fruto, y buena aptitud para la conservación postcosecha y el transporte, lo que facilita su exportación. También presentan gran diversidad en el color de la piel y la pulpa. En la actualidad se valoran más las ciruelas de piel negra o muy oscura y con pulpa amarilla. La piel oscura facilita que no se aprecien magulladuras ni imperfecciones y hace que las ciruelas sean muy atractivas. Sin embargo, el exceso de producción en algunas campañas de las variedades de piel negra más cultivadas ha provocado un aumento del interés en otros colores de piel, como el amarillo o verde-amarillo, y en variedades de piel negra y pulpa roja. Cerca de la mitad de la producción nacional se genera en Extre-

madura donde más de la mitad de la producción total corresponde a variedades de piel roja como 'Larry Ann', 'Fortune', 'Primetime' o 'Laetitia' destacando también la presencia de 'Angeleno', de piel negra y 'Songold', de piel amarilla.

El ciruelo japonés se ha considerado tradicionalmente una especie climatérica, en la que los frutos pueden continuar su proceso de maduración una vez recolectados, lo que a menudo ha provocado una recolección prematura que afecta a la calidad del fruto, especialmente en las variedades de piel oscura, algunas de las cuales adquieren el color definitivo en los primeros estadios de maduración cuando aún no han alcanzado los niveles adecuados de concentración de sólidos solubles. En los últimos años se ha evidenciado que no todas las variedades se comportan de igual forma, existiendo variedades que no son climatéricas. Aunque todavía falta por estudiar el carácter climatérico en muchas de las variedades que se cultivan en la actualidad, es un aspecto que cada vez cobra más importancia, y se está trabajando para determinar el comportamiento de los frutos de diferentes variedades para poder caracterizar el carácter climatérico que permita destinar cada va-



Variedad 'Crimson Globe'.



Variedad 'Fortune'.

riedad a los mercados más adecuados a su comportamiento (VELARDO *et al.*, 2018). Las preferencias del consumidor están provocando que cada vez se tengan más en cuenta la calidad del fruto, siendo este aspecto uno de los principales objetivos en la mayoría de los programas de mejora actuales (GUERRA y RODRIGO, 2017).

Marca de calidad CiEx®

La importancia de la calidad de la fruta y los beneficios para la salud han propiciado que cada vez se estén buscando más sellos de identidad ligados al sabor y a las características nutricionales del fruto. Mientras que en otros frutales exis-

ten distintas marcas de calidad a nivel nacional, en ciruelo es un aspecto novedoso. Recientemente se ha creado en Extremadura la marca de calidad CiEx® (Ciruela de Extremadura), impulsada por el colectivo Afruex (Asociación de Fruticultores de Extremadura), puesta en marcha en 2017. Afruex engloba al 90% de los productores de fruta de Extremadura. Las empresas participantes en la marca CiEx® son Acopaex, Agrícola Castillo, Alanfruit, Catafruit, Caver, Explum, Exveal, Jarcha, Landfruit, Naturcrex, Nogalfruit, Pecas Nature, Sol de Badajoz y Tany Nature, que acumulan el 80% de la producción de ciruela de la región. Las primeras empresas en etiquetar ciruelas bajo

Protégete de las heladas



CONTROL de heladas

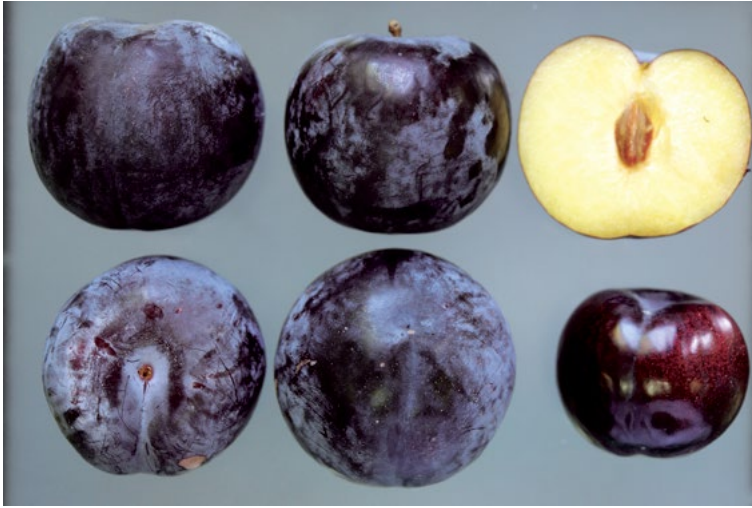
La cantidad de agua que llega a la planta es óptima y no sobrecarga ni hace daño al cultivo, y no crea encharcamientos en suelo.

Apto para todo tipo de cultivos

10 years fruit attraction
Visítenos en el Stand 7C08B

CUADRO 1. Características de variedades de ciruelo de tipo japonés incluidas en la marca de calidad CiEx®. Las variedades están ordenadas por época de maduración.

BLACK SPLENDOR		FORTUNE	
Floración	Precoz	Floración	Precoz
Maduración	Temprana	Maduración	Tardía
Árbol	Vigor medio, producción media	Árbol	Vigor fuerte, producción alta
G.I.	XI (ScSe)	G.I.	II (SbSc)
CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	
Color piel	Negro	Color piel	Rojo oscuro
Color pulpa	Rojo	Color pulpa	Amarillo-rojizo
Calibre	55–60 mm	Calibre	55–60 mm
Firmeza	Buena, firme	Firmeza	Muy buena
PRIMETIME		GOLDEN GLOBE	
Floración	Mitad de temporada	Floración	Mitad de temporada
Maduración	Mitad de temporada	Maduración	Tardía
Árbol	Vigor moderado, producción alta	Árbol	Vigor fuerte, producción alta
G.I.	XII (SbSe)	G.I.	III (SbSf)
CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	
Color piel	Rojo oscuro-violáceo	Color piel	Amarillo
Color pulpa	Amarillo	Color pulpa	Amarillo
Calibre	63–67 mm	Calibre	55–60 mm
Firmeza	Buena, firme	Firmeza	Muy buena
CRIMSON GLOBE		LARRY ANN	
Floración	Precoz	Floración	Media-precoz
Maduración	Temprana-media	Maduración	Tardía
Árbol	Vigor fuerte, producción muy alta	Árbol	Vigor medio, producción alta
G.I.	XIV (SaSc)	G.I.	IV (SbSh)
CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	
Color piel	Rojo oscuro	Color piel	Negro violáceo
Color pulpa	Rojo	Color pulpa	Amarillo-naranja
Calibre	50–55 mm	Calibre	55–60 mm
Firmeza	Buena, firme	Firmeza	Buena, firme
OWEN T		ANGELENO	
Floración	Temprana-media	Floración	Precoz
Maduración	Temprana-media	Maduración	Muy tardía
Árbol	Vigor fuerte, producción alta	Árbol	Vigor medio, producción alta
G.I.	VII (ScSh)	G.I.	VII (ScSh)
CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO		CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO	
Color piel	Negro azulado	Color piel	Rojo violáceo
Color pulpa	Amarillo	Color pulpa	Amarillo
Calibre	65–70 mm	Calibre	55–60 mm
Firmeza	Muy buena	Firmeza	Muy buena



Variedad 'Angeleno'.

la calidad CiEx® han sido Acopaex y Explum en la campaña de 2018 (AFRUEX, 2018).

La marca de calidad incluye por el momento ocho variedades: 'Angeleno', 'Black Splendor', 'Crimson Globe', 'Fortune', 'Golden Globe', 'Larry Ann', 'Owen-T' y 'Primetime' (Cuadro 1). Se han incluido variedades tempranas como 'Black Splendor', recolectada en junio, 'Owen T', 'Crisom Globe', 'Primetime' y 'Fortune', que maduran en la primera quincena de julio, 'Golden Globe' y 'Larry Ann', que se recolectan el final de julio y la más tardía, 'Angeleno', que suele recogerse a finales de agosto, con lo que prácticamente se cubre toda la temporada de ciruela. Los parámetros que se analizan para incluir las ciruelas dentro de la marca de calidad son el color de la piel y la carencia de defectos externos, el contenido de sólidos solubles, la firmeza y el calibre. Una vez puesta en marcha la marca este año, el objetivo planteado por el colectivo a medio plazo es llegar a implantar una Indicación Geográfica Protegida. El auditor de la marca certifica las ciruelas que cumplen los requisitos para ser etiquetadas como CiEx® para su comercialización tanto dentro como fuera de la Unión Europea. El proceso de certificación ha sido promovido y financiado por organismos públicos, por lo que no supone ninguna inversión ni gasto adicional para los productores que quieran comercializar sus producciones bajo este sello de calidad. Las variedades incluidas en el sello no son definitivas, sino que se revisarán en función de los requerimientos del mercado y te-

niendo en cuenta la importante renovación varietal que se está produciendo en el cultivo. •

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades – Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria [proyectos RFP2015-00015-00, RTA2014-00085-00, RTA2017-00003-00]; Gobierno de Aragón – Fondo Social Europeo, Unión Europea, [Grupo Consolidado A12-17R] y la Junta de Extremadura (proyecto sectorial FRU-CITEX y grupo de investigación GR18196).

Bibliografía

- AFRUEX (Asociación de Fruticultores de Extremadura) (2018). www.afruex.com
- FAOSTAT 2018. www.fao.org
- GUERRA, M.E. y RODRIGO, J. (2015). Japanese plum pollination: A review. *Scientia Horticulturae*. 197: 674-686.
- GUERRA, M.E. y RODRIGO, J. (2017). Ciruelo japonés. Renovación varietal y mejora genética. *Agricultura*, julio-agosto: 572-576.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Ministerio para la Transición Ecológica). (2018). www.mapama.gob.es
- NEUMÜLLER, M. (2011). Fundamental and applied aspects of plum (*Prunus domestica*) breeding. *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech.* 5: 139-156.
- RODRIGO, J. y GUERRA, M.E. (2014). El cerezo y el ciruelo. En: J.J. Hueso y J. Cuevas (Eds). *La fruticultura del siglo XXI en España*. Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA), Fundación Cajamar, Almería. Serie Agricultura 10:107-123.
- VELARDO, B., SERRADILLA, M.J., y GUERRA, M.E. (2018). Adaptación de variedades sudafricanas de ciruelo japonés a su cultivo en Extremadura. Aspectos agronómicos y carácter climático. En: M.J. Serradilla y M.J. Bernalte (Eds) *Frutas y Hortalizas: Innovaciones en pre- y postcosecha*. 57-60.

ANEXO 2

Guerrero, B.I., Guerra, M.E., Rodrigo, J. (2018). El ciruelo japonés, estructura varietal, y necesidades de polinización. *Vida Rural*, 50-54.

El ciruelo japonés, estructura varietal y necesidades de polinización

La autocompatibilidad, un carácter deseable y objetivo de todos los programas de mejora

La superficie cultivada de ciruelo a nivel mundial ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, pasando de 1,2 millones de hectáreas en 1985 a 2,6 millones de hectáreas en la actualidad, distribuidas entre Asia (80%), Europa (15%) y América (3%) (Faostat, 2018). La producción mundial de ciruelas supera los 12 millones de toneladas. Los principales países productores son China, Rumanía, Serbia, Estados Unidos, Turquía y Chile (**cuadro I**).

España produce más de 200.000 t en aproximadamente 16.000 ha, siendo el octavo país productor mundial y el cuarto de la Unión Europea, con una producción parecida a la de Francia (220.729 t) e Italia (211.269 t). Los datos estadísticos oficiales de la FAO de producción, superficie y rendimiento incluyen todas las ciruelas, tanto las de tipo europeo (*Prunus domestica* L.) como las de tipo japonés (híbridos de *Prunus salicina* Lindl.). Algunos países cultivan principalmente ciruelas europeas, como Rumanía y Serbia, mientras que la presencia de ciruelas japonesas es mayor en otros países como Chile, España, Francia e Italia (**cuadro I**). Los principales países exportadores son Chile, España y Sudáfrica (**cuadro II**). En España se exportan aproximadamente 100.000 t anuales de media, lo que representa cerca de la mitad de la producción nacional.

Brenda Guerrero¹, M^a Engracia Guerra² y Javier Rodrigo¹.

¹ Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza).

² Departamento de Hortofruticultura. Cicytex-Centro de Investigación Finca La Orden-Valdesequera.

En este artículo se describe la situación actual del cultivo del ciruelo de tipo japonés a nivel nacional e internacional, y se revisa la situación varietal, incluyendo la evolución de la renovación varietal en los últimos años y las nuevas obtenciones. Para facilitar la elección de variedades polinizadoras en el diseño de nuevas plantaciones, se analizan las necesidades de polinización de las principales variedades y se detallan las relaciones de incompatibilidad entre variedades.



CUADRO I

PRINCIPALES PAÍSES PRODUCTORES DE CIRUELAS. PRODUCCIÓN, SUPERFICIE Y RENDIMIENTO.

País	Producción (t)	Producción (%)	Superficie (ha)	Superficie (%)	Rendimiento (t/ha)
Mundo	12.050.800	100	2.651.122	100	4,55
China	6.676.142	55	1.961.428	74	3,40
Rumanía	512.975	4	65.114	3	7,88
Serbia	463.115	4	77.949	3	5,94
EE.UU.	392.537	3	28.875	1	13,59
Turquía	297.589	3	20.811	1	14,30
Chile	294.873	2	17.278	1	17,07
Irán	269.113	2	33.881	1	7,94
España	222.020	2	16.344	1	13,58
Francia	220.729	2	12.720	1	17,35
Italia	211.269	2	14.741	1	14,33

Faostat, 2018



Foto 1. Frutos de la variedad African Rose.

(439.692 ha). A nivel nacional, España ha mantenido un crecimiento estable de la superficie cultivada en los últimos cuarenta años. Según la Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos en España (Mapama, 2018), el 45% de la producción se concentra en Extremadura (78.150 t en 6.765 ha). Otras comunidades autónomas importantes son Andalucía (30.663 t en 2.345 ha), Región de Murcia (46.492 t en 844 ha), Comunidad Valenciana (14.335 t en 1.745 ha) y Aragón (10.376 t en 1.102 ha) (figura 1).

Estructura varietal

La estructura varietal del ciruelo japonés está en proceso de renovación. Cada año se introducen nuevas variedades procedentes de distintos programas de mejora nacionales e internacionales (Batlle *et al.*, 2018). Estas nuevas variedades se unen a una serie de variedades que resisten el paso del tiempo por sus buenas características, bien por su alta productividad, su excelente calidad y calibre o su buena aptitud para el transporte a largas distancias.

En los años 70 se introdujo el cultivo en España con las variedades Golden Ja-

CUADRO II

EXPORTACIÓN DE CIRUELAS DE LOS PRINCIPALES PAÍSES EXPORTADORES.

País	Exportación (t)	Exportación (%)	Valor (miles dólares)	Valor (%)
Mundo	714.364	100	799.168	100
Chile	115.187	16	150.385	19
España	109.328	15	123.801	16
Sudáfrica	63.872	9	81.314	10
Italia	58.481	8	57.361	7
Turquía	44.724	6	14.869	2

Faostat, 2018

CUADRO III

IMPORTACIÓN DE CIRUELAS DE LOS PRINCIPALES PAÍSES CONSUMIDORES.

País	Importación (t)	Importación (%)	Valor (miles dólares)	Valor (%)
Mundo	716.869	100	993.857	100
Rusia	58.400	8	48.491	6
Alemania	56.365	8	66.763	8
Reino Unido	53.300	7	75.855	9
China	44.623	6	121.980	15
Países bajos	42.324	6	82.167	10
España	7.123	1	11.838	2

Faostat, 2018

En los últimos años están aumentando las exportaciones, superando el 60% de la producción en algunas campañas. Los destinos más importantes de las ciruelas españolas son Alemania, Reino Unido, Francia y Portugal (Fepex, 2018). Los principales países importadores de ciruelas son Rusia, Alemania y Reino Unido (cuadro III). España importa unas 7.000 t, el

equivalente al 7% de la producción, principalmente de países de la Unión Europea como Portugal, Países Bajos y Francia (Faostat, 2018; Fepex, 2018).

El ciruelo es el frutal de hueso con mayor superficie cultivada en el mundo (2.651.122 ha), seguido del grupo de melocotones y nectarinas (1.639.925 ha), el albaricoque (568.014 ha) y el cerezo

FIG. 1 Distribución (%) de la producción de ciruela a nivel nacional (Mapama, 2018).

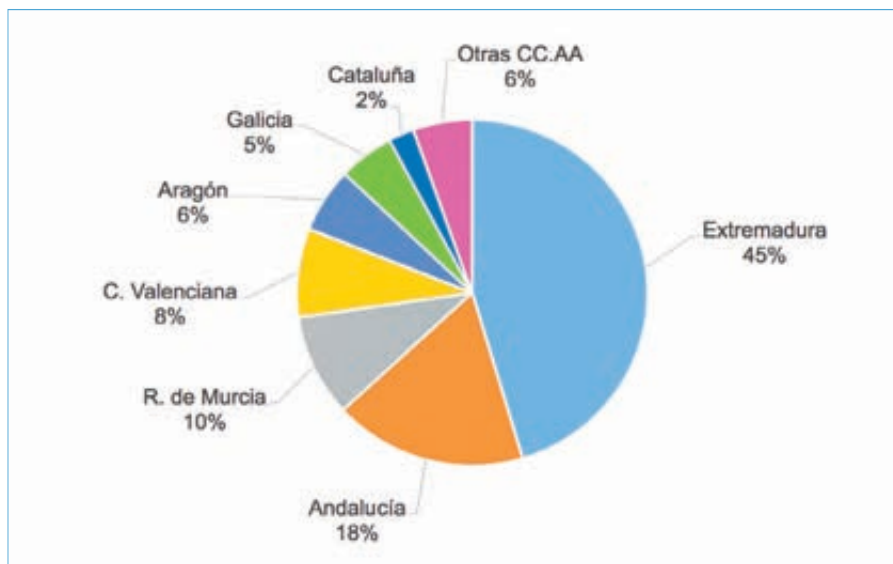


Foto 3. Rama de ciruelo japonés en plena floración.



Foto 2. Frutos de la variedad Ruby Star.

pan, de piel amarilla, Burbank, de piel amarillo-rojiza, y Methley y Santa Rosa, de piel roja (Rodrigo y Guerra, 2014). Veinte años más tarde, las variedades más cultivadas eran Red Beaut y Santa Rosa, de piel roja, y Golden Japan (Guerra *et al.*, 2009). En los últimos años la situación varietal es muy diferente, ya que más de la mitad de la producción nacional recae en

variedades de piel negra, como Angeleno y Black Diamond, y el resto en variedades de piel roja, como Fortune, Larry Ann y Red Beaut, o amarilla, como Songold, Golden Globe y Golden Japan (Batlle *et al.*, 2018; Rodrigo y Guerra, 2014).

La renovación varietal que se está produciendo en la actualidad hace que los agricultores tengan acceso a variedades

procedentes de distintos programas de mejora de todo el mundo (Rodrigo y Guerra, 2014). Las nuevas obtenciones, además de presentar características agronómicas y de calidad de fruto interesantes, están permitiendo ampliar el calendario de maduración. Pero también pueden presentar problemas de adaptación, ya que en muchos casos se desconoce su comportamiento en nuestras condiciones, lo que hace necesario realizar ensayos de experimentación en las áreas donde pueden ser cultivadas.

En el cultivo nacional se están introduciendo variedades procedentes de programas de mejora de todo el mundo, tanto públicos como privados, de países como Estados Unidos, Sudáfrica, Israel, Italia o España (Topp *et al.*, 2010; Batlle *et al.*, 2018). Los programas de mejora buscan nuevas obtenciones bien adaptadas a las zonas de cultivo de los países de donde proceden, y algunos tienen objetivos específicos, como la aptitud para transporte a largas distancias (ARC-Infruitec; Su-

dáfrica) o sabores y aromas intensos (Ben Dor Fruit; Israel). Muchos programas también tienen algunos objetivos comunes, como el sabor y la calidad de fruto, la resistencia a plagas y enfermedades y la extensión de las fechas de recolección con variedades de maduración muy temprana, como African Rose (foto 1) (piel roja-pulpa amarilla; primeros de junio en Extremadura) o muy tardía como Ruby Star (foto 2) (piel roja/ pulpa naranja; primeros de septiembre en Extremadura), ambas de ARC-Infruitec.

Necesidades de polinización

En la floración del ciruelo japonés se produce una cantidad de flores muy superior al del resto de frutales de hueso (foto 3). La polinización en ciruelo, como en otros



La mayoría de las variedades de ciruelo japonés son autoincompatibles. Como la época de floración puede presentar variaciones importantes de un año a otro y entre distintas zonas de cultivo, es recomendable introducir al menos una variedad polinizadora de floración más temprana y otra de floración más tardía

frutales de hueso, la realizan insectos, por lo que es importante asegurar su presencia mediante la introducción de colmenas de abejas o abejorros en las plantaciones si no hay suficientes insectos polinizadores en la zona de cultivo (foto 4).

La mayoría de variedades de ciruelo japonés son autoincompatibles, por lo que sus flores necesitan ser polinizadas con polen de otras variedades compatibles para que se produzca el cuajado del fruto. Para solventar este problema, es necesario seleccionar adecuadamente las variedades polinizadoras.

En el diseño de nuevas plantaciones hay que tener en cuenta dos factores principales: que las variedades sean compatibles entre sí y que coincidan en la fase de floración. En la última década se han determinado las necesidades de poliniza-

La fórmula del crecimiento

- **Mejora el cuajado**
- **Incrementa el calibre**
- **Mejora la calidad de la fruta**

Europe's leading producer of Leonardite

Tel.: +34 976 46 15 16 daymsa.com

daymsa.com



Foto 4. Polinización mediada por insectos en ciruelo japonés.

CUADRO IV GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD DE POLINIZACIÓN EN VARIEDADES AUTOINCOMPATIBLES DE CIRUELO JAPONÉS.

Grupo de incompatibilidad	Variedades
I	606, Red Beaut
II	Laroda, Black Beaut, Delbartazur, Fortune, Golden Globe, Golden Plumza, Green Sun, Blackamber, TC Sun
III	Frontier, AU Amber, AU Road Side
IV	Queen Ann, Eldorado, Freedom, Friar, Hiromi Red, Larry Ann, Songria 10
VI	Black Ruby, Mariposa
VII	Queen Rosa, Gaia, Ruby Crunch, Royal Diamond, Ruby Queen, Angeleno
VIII	Black Gold, Black Late, Earliqueen, John W., Showtime, Black Diamond, Ruby Star
IX	White Plum, Golden Japan
X	Howard Sun, Songold, Elephant Heart
XI	Beauty, Late Santa Rosa, Black Splendor, Royal Garnet, Roysum, Red Rosa
XII	Black Jewell, Pioneer, Sapphire
XIII	Black Star, Primetime
XIV	CrimsonGlo, White Queen
XVI	Kelsey, Wickson
XVII	Ambra, Olinda
XXI	Simon, Newyorker
XXIV	Honey Rosa, Methley

ción de la mayoría de variedades cultivadas (Guerra y Rodrigo, 2015), que se clasifican en grupos de incompatibilidad (**cuadro IV**), de forma que las variedades pertenecientes al mismo grupo son incompatibles entre sí y no pueden ser utilizadas como polinizadoras unas de otras. Sin

embargo, les serviría como posible polinizador cualquier variedad de otro grupo diferente, siempre que coincidan en floración. Como la época de floración puede presentar variaciones importantes de un año a otro y entre distintas zonas de cultivo, es recomendable introducir al menos

una variedad polinizadora de floración más temprana y otra de floración más tardía (Guerra *et al.*, 2011).

Aunque la mayoría de variedades son autoincompatibles, existen unas pocas variedades autocompatibles que no necesitan polinización cruzada con otras variedades. Algunas de estas variedades son Santa Rosa, ZanziSun, Nubiana, Laetitia, Casselman, Simka, Souvenir, African Rose o Rubirosa (Guerra and Rodrigo, 2015). Aunque es un carácter deseable y está presente como objetivo en todos los programas de mejora, en la actualidad la mayoría de variedades comerciales son autoincompatibles y necesitan polen de otras variedades para poder producir. ■

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades - Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria [proyectos RFP2015-00015-00, RTA2014-00085-00, RTA2017-00003-00]; Ministerio para la Transición Ecológica - Fundación Biodiversidad; Gobierno de Aragón - Fondo Social Europeo, Unión Europea, [Grupo Consolidado A12-17R] y la Junta de Extremadura (proyecto sectorial FRUCITEX y grupo de investigación GR18196).

BIBLIOGRAFÍA

- Battle, I., Iglesias, I., Cantín, C.M., Badenes, M.L., Ríos, G., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J., López-Corrales, M., Guerra, M.E., Alonso, J.M., Socias I Company, R., Rodrigo, J., García-Montiel, F. y García-Brunton, J. (2018). Frutales de hueso y pepita. En: Influencia del cambio climático en la mejora genética de plantas (García Brunton J, Perez Tornero O, CosFerrer JE, Ruiz García L y Sánchez López E. (eds.))pp 79-132. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. SECH y SEG (Murcia).
- FAOSTAT (Food and Agricultural Organization of the United Nations). (2018). www.faostat.fao.org
- FEPEX (2018) Federación Española de Asociaciones de Productores y Exportadores de Frutas, Hortalizas, Flores y Plantas vivas. www.fepeex.es
- Guerra, M.E., López-Corrales, M., Wünsch, A. y Rodrigo, J. (2009). Ciruelo japonés. Descripción varietal y situación del cultivo. *Revista de Fruticultura*, 1:4-12.
- Guerra, M.E. y Rodrigo, J. (2015). Japanese plum pollination: A review. *Scientia Horticulturae*. 197: 674-686.
- Guerra, M.E., Wünsch, A., López-Corrales, M. y Rodrigo, J. (2011). Problemática de la polinización en el cultivo del ciruelo japonés en la región de Extremadura. *Vida Rural*, 338: 36-39.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente). (2018). www.mapama.gob.es
- Rodrigo, J. y Guerra, M.E. (2014). El cerezo y el ciruelo. En: J.J. Hueso y J. Cuevas (Eds). *La fruticulturadel siglo XXI en España*. Cuadernos de Estudios Agroalimentarios (CEA), FundaciónCajamar, Almería.
- Topp, B.L., Russell, D.M., Neumüller, M., Dalbó, M.A. y Liu, W. (2012). Plum, en: Badenes, M.L. y Byrne, D.H. (Eds.), *Fruit Breeding*. Springer Science, London, pp. 571-622.

ANEXO 3

Fadón, E., Herrera, S., **Guerrero, B.I.**, Guerra, M.E., Rodrigo, J. (2020). Chilling and Heat Requirements of Temperate Stone Fruits Trees (*Prunus* sp.). *Agronomy*, 10, 409. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030409>.



Review

Chilling and Heat Requirements of Temperate Stone Fruit Trees (*Prunus* sp.)

Erica Fadón ^{1,*}, Sara Herrera ², Brenda I. Guerrero ², M. Engracia Guerra ³ and Javier Rodrigo ^{2,4,*}

¹ INRES – Gartenbauwissenschaft, Universität Bonn, 53229 Bonn, Germany

² Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain; sherreral@aragon.es (S.H.); guerrero.bren@gmail.com (B.I.G.)

³ Departamento de Hortofruticultura, CICYTEX-Centro de Investigación ‘Finca La Orden-Valdesequera’, A-V, km 372, 06187 Guadajira, Badajoz, Spain; mariaengracia.guerra@juntaex.es

⁴ Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Calle Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

* Correspondence: jrodrigo@aragon.es (J.R); efaonad@uni-bonn.de (E.F.);
Tel.: +34-976-716-314 (J.R); +49-(0)228-73-5155 (E.F.)

Received: 13 February 2020; Accepted: 16 March 2020; Published: 18 March 2020



Abstract: Stone fruit trees of genus *Prunus*, like other temperate woody species, need to accumulate a cultivar-specific amount of chilling during endodormancy, and of heat during ecodormancy to flower properly in spring. Knowing the requirements of a cultivar can be critical in determining if it can be adapted to a particular area. Growers can use this information to anticipate the future performance of their orchards and the adaptation of new cultivars to their region. In this work, the available information on chilling- and heat-requirements of almond, apricot, plum, peach, and sweet cherry cultivars is reviewed. We pay special attention to the method used for the determination of breaking dormancy, the method used to quantify chilling and heat temperatures, and the place where experiments were conducted. The results reveal different gaps in the information available, both in the lack of information of cultivars with unknown requirements and in the methodologies used. The main emerging challenges are the standardization of the conditions of each methodology and the search for biological markers for dormancy. These will help to deal with the growing number of new cultivars and the reduction of winter cold in many areas due to global warming.

Keywords: almond; apricot; chilling hours; chilling units; chilling portions; European plum; growing degree hours; Japanese apricot; Japanese plum; peach; sour cherry; sweet cherry

1. Introduction

Temperate stone fruits belong to the genus *Prunus* in the Rosaceae and produce a fruit called drupe, whose seed is covered by the woody endocarp which in turn is covered by the endocarp. In most cultivated *Prunus* species, the edible part of the fruit is the endocarp, which includes the fleshy pulp (mesocarp) and skin (exocarp) such as apricot (*P. armeniaca* L.), European plum (*P. domestica* L.), Japanese apricot (*P. mume* Siebold and Zucc.), Japanese plum (*P. salicina* Lindl.), peach (*P. persica* L. Batsch), sour cherry (*P. cerasus* L.) and sweet cherry (*P. avium* L.) [1]. On the other hand, in almond (*P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb), the edible part of the fruit is the seed. The annual global stone fruit production reached in 2017 more than 47 million t in 7.3 million ha [2]. The most cultivated species are peach (*P. persica* L. Batsch) (24.6 million t in 1.5 million ha), plum (including European and Japanese plum) (11.7 million t in 2.6 million ha), apricot (4.2 million t in 0.5 million ha), sweet cherry

(2.4 million t in 0.4 million ha), almond (2.2 million t in 1.9 million ha) and sour cherry (1.2 million t in 0.2 million ha) [2].

Stone fruit trees, like other temperate woody species, need to accumulate a cultivar-specific amount of chilling during winter to overcome dormancy and then experience warm temperatures to finally flower in spring [3–5]. These conditions the adaptation of species and cultivars to each region [6] and it is the main drawback for their extension to warmer latitudes [7]. Knowing the temperature requirements of a cultivar can be useful for growers to anticipate the future performance of their orchards and to design new orchards taking into account the predicted global warming [7–9]. In this work, the available information on chilling- and heat-requirements of cultivars of the most cultivated stone fruit crops (almond, apricot, peach, plum and cherry) is reviewed, paying special attention to the approach used for the determination of breaking dormancy, the method used to quantify chilling and heat temperatures, and the place where the experiments were conducted. There is extensive information available about chilling and heat requirements that has purposefully been omitted from this review. We have only included those studies that a) obtained results by using an experimental methodology (i.e., transferring shoots into a growth chamber sequentially during winter) or computational/statistical approaches that relate flowering dates to temperature data over a sufficiently long time series, and b) quantified chilling and heat temperatures using the common models (Chilling Hours model, Utah model or Dynamic model for chilling requirements, Growing Degree Hours for heat requirements).

2. Dormancy: Definition and Description

Stone fruit trees adapt to temperate regions by establishing a dormancy state during winter that allows surviving at low temperatures [10]. Dormancy characterizes by the absence of growth since flower primordia remain protected inside the buds. Growth is not only suppressed by the low temperatures since dormant trees do not respond to suitable conditions to grow and need exposure to a certain period of low temperatures to overcome dormancy [11]. It seems clear that dormancy is triggered by internal factors inherent to the plant [12]; however, up to now, most of these physiological factors remain unclear. The exposition to chilling temperatures allows a progressive restoration of growth capability. However, growth is not immediately restored [3], since low temperatures could continue and prevent buds from growing, and the exposure to warm temperatures is needed to grow after dormancy release [13]. Chilling and heat requirements are genetically determined and therefore are cultivar specific [14,15].

The phases of chilling and warm temperature accumulation are differently named, although they occur at the same phenological stage [16]. Lang et al. proposed one of the most used terms, naming the stages “endo-dormancy” while chilling accumulates, and “eco-dormancy” while heat accumulates and chilling prevents the plant from growing [11]. On the other hand, a recent proposal by Considine and Considine considered that dormancy only refers to when it is internally caused, and the lack of growth by external factors correspond to a quiescence state [17].

Dormancy has acquiring rising importance for a sustainable fruit production under a global warming context [8,9,18–20]. However, the physiological processes behind remain unknown and a reliable biological factor linked to the dormancy breaking is still missing [12].

3. Dormancy prediction

The characterization of the temperature requirements of a cultivar is crucial for the design and management of the fruit orchards since they determine the flowering date and a flowering overlap is needed for cross-pollination in case of self-incompatible cultivars [21]. It is also a key trait in breeding programs since it determines both the adaptation to different climates and the blooming and ripening dates [22]. However, the lack of a whole understanding of the process makes obtaining reliable data complex [6]. In most works, the determination of the temperature requirements of a particular cultivar consists of two phases (Figure 1): first, the establishment of the dormancy and forcing periods

(Figure 1a), either experimentally (Figure 1a.1) [23,24] or statistically (Figure 1a.2) [25–27]; and the subsequent temperature quantification in both phases (Figure 1b) by using temperature-based models for chilling (Figure 1b.1) [28–30] and heat quantification (Figure 1b.2) [29]. One of the main challenges of determining the temperature requirements is establishing the transition from dormancy to eco-dormancy (Figure 1a) and thus the periods in which chilling (Figure 1b.1) and warm temperatures (Figure 1b.2) are quantified.

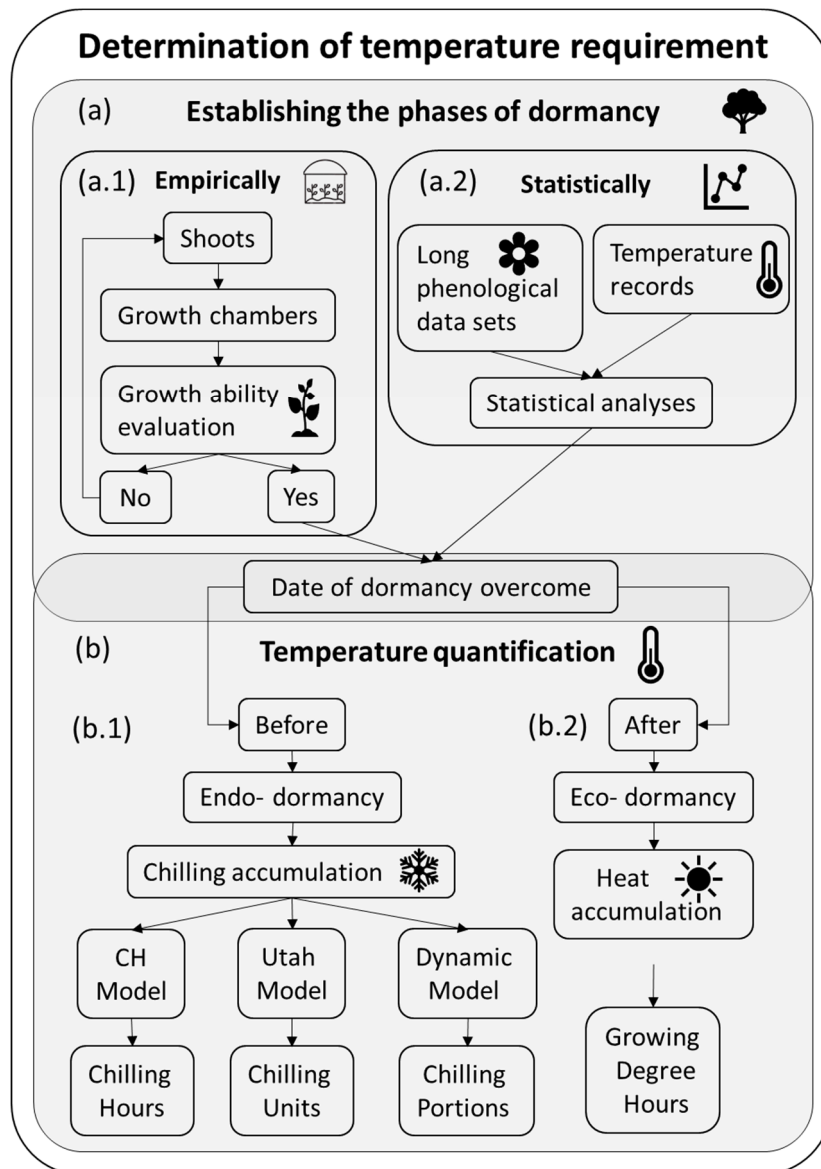


Figure 1. Determination of the temperature (chill and heat) requirements in temperate fruit trees: a workflow. (a) Determination of the phases of dormancy: (a.1) empirically or (a.2) statistically. (b) Temperature quantification: (b.1) chilling quantification during endo-dormancy and (b.2) heat quantification over eco-dormancy.

The experimental determination of dormancy consists of evaluating when the buds recover the capacity to grow (Figure 1a.1). This is usually performed by transferring shoots into a growth chamber sequentially during winter, thus after different chilling exposures. Shoots remain a certain period in the warm conditions, and then bud growth is evaluated. This approach has been widely used from

early [24] to recent studies [31] that determine the chilling requirements of the cultivars. Furthermore, these experiments serve as a base for physiological studies on dormancy [6].

The statistical approach estimates the date of chilling fulfillment based on a long series of phenological observations (flowering dates) and relating them with the previous temperature records (Figure 1a.2). Tabuenca et al. established a statistical methodology by calculating the correlation coefficients between the maximum, minimum and mean temperatures of certain time periods and flowering dates in apple, apricot, cherry, peach, pear, plum [32], and almonds [33]. Then, Alonso et al. determined the temperature requirements correlations between the flowering dates of almond cultivars and daily minimum, mean and maximum temperatures calculated as the mean of the surrounding 5, 10, 15 . . . until 30 days, with a set of data from 7 years. The endo-dormancy to eco-dormancy transition was considered to be when the significant correlation coefficients change from being mainly positive to be mainly negative [26]. Ashcroft et al. firstly estimated chilling and heat accumulation of peaches [29] based on when the chilling and heat accumulation presented the least squared residuals methods [25]. A new approach has been recently developed based on the statistical analysis of long-term phenological records and temperature series. The application of partial least squares (PLS) regression leads to the estimation of the agroclimatic requirements. PLS regression is especially applicable when the number of independent variables (daily temperatures, 365 data per year) substantially exceeds the number of dependent variables (one flowering date per cultivar and year). The results of these analyses include the model coefficients and variable-importance-in-the-projection. Significant positive model coefficients correspond with the chilling accumulation, endo- dormancy, while negative coefficients correspond with the heat accumulation, eco- dormancy [34]. It was initially applied in sweet cherry [34] and later in other fruit trees as almond [35,36], pistachio [19], apricot [27] or apple [36].

4. Temperature Based Models for Phenology Prediction

Three main models are currently used in agriculture to quantify chilling over the dormancy period [37]. They were developed in peach: the Chilling Hours model [28], the Utah model [29], and the Dynamic model [30] (Figure 1b.1). The Chilling Hours model was developed in the early fifties of the 20th century, and it has been widely used up to now due to its simplicity and easy comprehension and calculation. This model establishes that a Chilling Hour (CH) corresponds to an hour at temperature between 0 and 7.2 °C (45 °F), since this range of temperatures is considered to affect dormancy completion. While temperatures below 0 °C are assumed not contributing due to at such low temperatures biological processes were considered slowed or not occurring, temperatures over 7.2 °C (45 F) were considered not low enough to affect dormancy completion [28].

The Utah model bases on the quantification of Chilling Units (CU) and establishes different ranges of temperatures with a different contribution to dormancy completion. A chilling unit corresponds to one hour under temperatures between 2.5–9.1 °C, a range that is considered the most effective temperatures on dormancy completion. Other ranges of temperatures are considered to have half (1.5–2.4 °C and 9.2–12.4°C), null (<1.4 °C and 12.5–15.9 °C) or negative (>16 °C) contribution to dormancy [29].

The Dynamic model, dated back from the 1980s [30], is based on a series of experiments that evaluated the effect of different series of temperatures on dormancy release [38–40]. This model proposed the accumulation of an intermediate product promoted by cold temperatures that can be reversed by warm temperatures (first step). Once this intermediate product has reached a certain level, the chill portions are permanently fixed and are considered not affected by warm temperatures [30]. The model is based on a possible biological process in which a thermally unstable precursor would lead to the accumulation of a factor in the buds. This process would follow the Arrhenius law that fits the mathematical relationship between temperature and the rate of a chemical reaction.

Once dormancy is predicted allowing the quantification of chilling, it is also needed to quantified warm temperatures after dormancy for flowering to occur (Figure 1b.2). The modelization of warm temperatures was early developed in agriculture to predict the different phenological stages of crops [41].

The combination of a chilling model with a heat model to predict flowering was firstly described with the combination of the Utah model with the Growing Degree Hours (GDH) quantification [25], and then this combination was also applied with the other chilling models. A GDH is defined as one hour at 1 °C above the base temperature (4.5 °C), this linearly progresses until the upper limit (25° C) [13]. One of the main drawbacks of using these models is the necessity of hourly temperature data records, whose availability is limited. Thus, equivalent models have been developed based on maximum and minimum temperatures [42].

5. Chilling and Heat Requirements

5.1. Almond (*P. dulcis*)

Although North America is the main area for almond production (over 1 million t/year) [2], temperature requirements have been calculated in the Mediterranean area, in Spain [26,33,36,43], the second world producer (0.6 million t/year) [2] and Tunisia [35]. Temperature requirements (chilling and heat) are available for a total of 106 almond cultivars [26,33,35,36,43] (Table 1). The chilling requirements varies between ‘Achaak’ (8 CH/ -297CU/ 3.4CP) [35] and ‘R1000’ (996 CU) [43]. The heat requirements range from 2894 GDH for ‘Pizzuta’ to 10201 GDH for ‘Primorskiy’ [36].

In this species, the most data (96 out of 106 cultivars) were calculated with statistical approaches, which contrast with the other *Prunus* sp. reported in this work. Almond data were obtained according to three different statistical methodologies [26,33,34]. The initial phenological data set also differed between works: the PLS analysis was performed over the date of flowering initiation (BBCH phenological stage 61, 10% flowers open) during 30 years [34,35], while the other approaches based on the dates of full bloom (BBCH phenological stage 65, 50% flowers open) over 7 [26] and 4-10 years [33].

A comparison between experimental (E) [43] and statistical (S) [26] approaches reveals similar results of chilling requirements and heat requirements for ‘Ferragnès’ (558 and 444 CU, 7309 and 8051 GDH), ‘Marcona’ (435 and 428 CU, 6681 and 6603 GDH) and ‘Ramillete’ (326 and 444 CU, 6538 and 5947 GDH) in Spain. Unfortunately, it is not possible to make more comparisons due to the different models used to quantify chilling and the different cultivars used in each study.

Table 1. Chilling and heat requirements of almond cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
A-258	-	-	17 ± 4.5	8725 ± 1712	S	Spain	[36]
Abiodh de Sfax	12	-284	4.6	6206	S	Tunisia	[35]
Abiodh Ras Djebel	59	-53	15.5	7324	S	Tunisia	[35]
Achaak	-	266	-	6444	E	Spain	[43]
	8	-297	3.4	8703	S	Tunisia	[35]
Aï	-	444	-	8051	S	Spain	[26]
	169	-	-	Very high	S	Spain	[33]
Alicante	-	-	21.7 ± 4.7	6940 ± 1400	S	Spain	[36]
Alzina	-	463	-	6757	S	Spain	[26]
	408	-	-	Very low	S	Spain	[33]
Amargo	169	-	-	Low	S	Spain	[33]
Andreu	151	-	-	High	S	Spain	[33]
Antoñeta	-	514	-	7512	E	Spain	[43]
Ardechoise	-	-	21.8 ± 4.5	6994 ± 1546	S	Spain	[36]

Table 1. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP	GDH			
Avola	50	46	13.6	6673	S	Tunisia	[35]
Aylés	-	481	-	7909	S	Spain	[26]
Bertina	-	463	-	8536	S	Spain	[26]
Blanquerna	-	463	-	6906	S	Spain	[26]
Bonifacio	61	101	15.8	7559	S	Tunisia	[35]
Bruantine	34	-219	10.4	8548	S	Tunisia	[35]
Cambra	-	463	-	7697	S	Spain	[26]
Cavaliera	34	-219	10.4	7042	S	Tunisia	[35]
	-	-	11.6 ± 4.0	7452±1601	S	Spain	[36]
Chellastone	-	463	-	6168	S	Spain	[26]
Chine	151	-	-	Low	S	Spain	[33]
Constantini	-	444	-	5345	S	Spain	[26]
Cristomorto	83	-29	22.6	5872	S	Tunisia	[35]
	-	428	-	8027	S	Spain	[26]
	-	-	20.7 ± 4.7	8236 ± 1482	S	Spain	[36]
Desmayo	-	309	-	5942	E	Spain	[43]
	169	-	-	Medium	S	Spain	[33]
Desmayo Largueta	-	428	-	5458	S	Spain	[26]
	-	-	8.4 ± 3.7	8552±1741	S	Spain	[36]
Desmayo Rojo	-	463	-	6418	S	Spain	[26]
	169	-	-	High	S	Spain	[33]
Dorée	46	-174	12.7	8867	S	Tunisia	[35]
Drake	169	-	-	Very high	S	Spain	[33]
Durán	151	-	-	Medium	S	Spain	[33]
Faggoussi	54	-148	14.5	3962	S	Tunisia	[35]
Fakhfekh	33	-219	10.4	5979	S	Tunisia	[35]
Fasciuneddu	34	-219	10.4	7027	S	Tunisia	[35]
Felisia	-	428	-	9352	S	Spain	[26]
Ferraduel	54	59	14.4	9272	S	Tunisia	[35]
	-	-	52.9 ± 6.0	7285 ± 1362	S	Spain	[36]
	-	558	-	7309	E	Spain	[43]
Ferragnès	54	59	14.4	9215	S	Tunisia	[35]
	-	444	-	8051	S	Spain	[26]
	-	-	20.7 ± 4.7	8696 ± 1543	S	Spain	[36]
Filippo Ceo	-	463	-	7558	S	Spain	[26]
	483	-	-	Low	S	Spain	[33]
Fourcouronne	169	-	-	High	S	Spain	[33]
Fournat de Brézenaud	169	-	-	Very high	S	Spain	[33]
	-	416	-	7367	S	Spain	[26]
	79	-50	21.1	5368	S	Tunisia	[35]
Gabaix	-	-	13.4 ± 4.4	6824 ± 1421	S	Spain	[36]
Garbí	-	-	52.9 ± 6	7040 ± 1312	S	Spain	[36]
Garnghzel	12	-284	4.6	8703	S	Tunisia	[35]

Table 1. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Garrigues	-	-	22.0 ± 4.7	8054 ± 1811	S	Spain	[36]
Genco Taronto	80	194	21.4	6148	S	Tunisia	[35]
	-	-	28.7 ± 4.9	5971 ± 1189	S	Spain	[36]
Glorieta	-	-	51.6 ± 5.9	5654 ± 1177	S	Spain	[36]
Guara	-	463	-	7978	S	Spain	[26]
Jordi	-	428	-	6488	S	Spain	[26]
	151	-	-	Medium	S	Spain	[33]
Khoukhi	31	-227	9.9	8873	S	Tunisia	[35]
Ksontini	21	-258	7.3	7071	S	Tunisia	[35]
Languedoc	23	-174	7.7	9097	S	Tunisia	[35]
Lauranne	-	428	-	8569	S	Spain	[26]
LeGrand	-	428	-	8027	S	Spain	[26]
Lluch		-		Very high	S	Spain	[33]
Malagueña	23	-82	7.6	9224	S	Tunisia	[35]
	169	-	-	High	S	Spain	[33]
Marcona	-	435	-	6681	E	Spain	[43]
	-	428	-	6603	S	Spain	[26]
	-	-	22.0 ± 4.7	6378 ± 1341	S	Spain	[36]
Marta	-	478	-	7577	E	Spain	[43]
Masbovera	-	463	-	7841	S	Spain	[26]
	-	-	28.6 ± 4.9	6232 ± 1221	S	Spain	[36]
Mazzetto	54	-68	14.5	9507	S	Tunisia	[35]
Miagkoskorlupij	-	463	-	7439	S	Spain	[26]
	631	-	-	Very low	S	Spain	[33]
Mollar de Tarragona	-	-	20.0 ± 4.7	6718 ± 1378	S	Spain	[36]
Moncayo	-	463	-	8696	S	Spain	[26]
Montrone	31	-227	9.9	9694	S	Tunisia	[35]
Morskoi	233	-	-	Very high	S	Spain	[33]
	169	-	-	Medium	S	Spain	[33]
Ne Plus Ultra	50	11	13.6	6847	S	Tunisia	[35]
	-	463	-	6635	S	Spain	[26]
Nonpareil	83	-29	22.6	6045	S	Tunisia	[35]
	-	403	-	7758	S	Spain	[26]
	169	-	-	High	S	Spain	[33]
	-	-	21.7 ± 4.7	7062 ± 1399	S	Spain	[36]
Picantilli	-	428	-	7386	S	Spain	[26]
	561	-	-	Very low	S	Spain	[33]
Pizzuta	83	-29	22.6	2894	S	Tunisia	[35]
Poñç	-	428	-	6210	S	Spain	[26]
	101	-	-	High	S	Spain	[33]
Poleta	151	-	-	High	S	Spain	[33]
Pou de Felanitz	-	392	-	5419	S	Spain	[26]
	101	-	-	Medium	S	Spain	[33]

Table 1. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Princesa	169	-	-	High	S	Spain	[33]
Primorskij	-	428	-	8434	S	Spain	[26]
	-	-	52.85 ± 5.95	10201 ± 1834	S	Spain	[36]
R1000	-	996	-	7438	E	Spain	[43]
Rachele	233	-	-	Very high	S	Spain	[33]
	-	376	-	8302	S	Spain	[26]
	47	-167	13.3	6374	S	Tunisia	[35]
Ramillete	-	444	-	5947	S	Spain	[26]
	-	326	-	6538	E	Spain	[43]
	-	-	20.7 ± 4.7	6998 ± 1540	S	Spain	[36]
Ramlet R249	33	18	10.3	6812	S	Tunisia	[35]
Ramlet R250	19	-266	6.7	6812	S	Tunisia	[35]
Rana	-	-	20.0 ± 4.7	6518 ± 1292	S	Spain	[36]
Rof	-	463	-	6418	S	Spain	[26]
	169	-	-	High	S	Spain	[33]
	-	-	20.8 ± 4.7	6965 ± 1355	S	Spain	[36]
Rotjet	151	-	-	Low	S	Spain	[33]
S2332	-	417	-	6481	E	Spain	[43]
S5133	-	973	-	7003	E	Spain	[43]
Sicilia	151	-	-	High	S	Spain	[33]
Soukaret	77	-57	20.6	5960	S	Tunisia	[35]
Tardive de la Verdère	-	358	-	8814	S	Spain	[26]
Tardy Nonpareil	-	-	55.4 ± 5.9	9444 ± 1658	S	Spain	[36]
Tarragona	83	-29	22.6	5830	S	Tunisia	[35]
Tarragones	-	-	51.6 ± 5.9	6370 ± 1238	S	Spain	[36]
Tamarite 2	169	-	-	High	S	Spain	[33]
Texas	-	463	-	7697	S	Spain	[26]
	233	-	-	High	S	Spain	[33]
	-	-	51.6 ± 5.9	6280 ± 1225	S	Spain	[36]
Thompson	-	463	-	7697	S	Spain	[26]
Titan	-	444	-	8457	S	Spain	[26]
Tokyo	-	463	-	7558	S	Spain	[26]
Totsol	-	428	-	6943	S	Spain	[26]
	101	-	-	High	S	Spain	[33]
Tozeur 1	12	-284	4.6	8124	S	Tunisia	[35]
Tozeur 2	33	-219	10.4	6309	S	Tunisia	[35]
Tozeur 4	12	-284	4.6	6698	S	Tunisia	[35]
Trell	77	-57	20.6	6003	S	Tunisia	[35]
	233	-	-	Medium	S	Spain	[33]
Tuono Taronto	-	463	-	7978	S	Spain	[26]
	50	46	13.6	6148	S	Tunisia	[35]
	-	-	52.9 ± 6.0	6870 ± 1319	S	Spain	[36]

Table 1. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Verdereta	-	416	-	6606	S	Spain	[26]
	101	-	-	High	S	Spain	[33]
Verdiere	169	-	-	Very high	S	Spain	[33]
Vinagrilla	408	-	-	Very low	S	Spain	[33]
Vivot	-	428	-	6603	S	Spain	[26]
	151	-	-	High	S	Spain	[33]
Xina	-	403	-	5815	S	Spain	[26]
Yaltano	713	-	-	Very low	S	Spain	[33]
Yaltinskij	-	463	-	8536	S	Spain	[26]
Zahaf	31	-227	9.9	6279	S	Tunisia	[35]
	-	392	-	5611	S	Spain	[26]

5.2. European and Japanese Apricot (*P. armeniaca* and *P. mume*)

European apricot is one of the most economically important fruit crops in temperate regions worldwide [44]. It is mainly produced in the Mediterranean area and the Middle East, being the higher producers Turkey, Uzbekistan, Italy, Algeria, and Iran [2]. A total of 15 works have experimentally evaluated the chilling requirements of 68 apricot cultivars all around the world (Iran, Italy, Serbia, South Africa, Spain, and the USA) (Table 2). The range of chilling requirements is between 274 CU in ‘Palsteyn’ [45] to 1450–1600 CU in ‘Orangered’ [46]. This crop is cultivated mainly in Mediterranean regions and it has traditionally been considered that most cultivars had low chilling requirements. However, some traditional cultivars showed high chilling requirements as ‘Búlida’ (1048 CU), ‘Canino’ (806 CU), ‘Currot’ (642 CU) or ‘Moniqui’ (1139 CU) [42,43] (Table 2).

In the last decades, an important renewal is taking place due to sharka, a disease caused by the Plum Pox Virus (PPV). High chilling PPV-resistant cultivars from North America, such as ‘Goldrich’ (950–108 CU / 65–59 CP), ‘Harcot’ (920–1665 CP), ‘Orangered’ (568–1481 CH / 902–1600CU / 55–69 CP), and ‘Stark Early Orange’ (1411 CU / 79 CP) (Table 2), have been used as parentals in different breeding programs with the aim of introducing a source of the resistance to the disease. The release of a high number of new cultivars is resulting in a lack of information about the chilling and heat requirements of the majority of the new commercial cultivars [44,47].

Some cultivars such as ‘Aurora’, ‘Bergeron’, ‘Currot’, ‘Dorada’, ‘Goldrich’, ‘Laycot’, ‘Luizet’, ‘Moniqui’, ‘Murciana’, ‘Paviot’, ‘Rojo Pasión’, ‘Royal’, ‘San Castrese’, and ‘Selene’ show homogeneous results in the different studies (Table 2). However, highly variable results have been reported in other cultivars as ‘Cafona’, ‘Canino’, ‘Harcot’, ‘Orangered’, ‘Palsteyn’, ‘Polonais’, ‘Precoz de Colomber’, and ‘Tonda di Costiglione’, showing heterogeneity among the different approaches (Table 2). Likewise, high differences have been reported when the experiments were carried out in different locations [45,48,49] or years [48,50,51]. Even when the same cultivars (‘Canino’, ‘Orangered’ and ‘Palsteyn’) were evaluated using the same approach in two environments with different climatic conditions, the results obtained showed high differences, with higher values in Spain (806/1172/631 CU) than in South Africa (304/957/274 CU) [45] (Table 2). Heat requirements ranged from 485 GDH in ‘Goldrich’ [49] to values above 6000 GDH in ‘Canino’ [48], ‘Dorada’, ‘Palsteyn’, and ‘Rojo Pasión’ [45]. Some cultivars showed high differences between seasons, as ‘Cafona’ (2499–5800 GDH), ‘Canino’ (2547–6729 GDH), and ‘Precoz de Colomber’ (2320–5304 GDH) [48].

Japanese apricot originated in China and has been widely cultivated for about 3000 years in Asian countries as China, Japan, and Korea. However, this crop is hardly known in other countries probably due to its poor adaptation to other areas of different climatic conditions, since it requires warmer and more humid conditions than European apricot [44].

Chilling requirements range from 26 ± 7 CP for ‘Shuangshuidaroumei’ [52] to 78.5 CP for ‘Sichuangqingmei’ and ‘Tengwulang’ [53] (Table 3). Heat requirements vary from 822 GDH for ‘Dayu’ to 2378 GDH for ‘Jietianmei’, ‘Sichuangqingmei’, and ‘Tengwulang’ (Table 3) [53]. Japanese apricot shows high chilling requirements and extremely low heat requirements when compared with the other *Prunus* sp. reported in this study.

Some cultivars with a wide range of chilling requirements, such as ‘Nanko’, a high-chilling cultivar from Japan, and ‘Ellching’, a low-chilling cultivar from the subtropical region in Taiwan, have been used in studies on dormancy physiology [54] and genetic regulation [55–59].

Table 2. Chilling and heat requirements of European apricot cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Abricot Pêche 1708 A.D.	1015–1105	-	-	-	E	Spain	[60]
Alessandrino	-	1000–1140	-	3825	E	Italy	[46]
Amabile Vecchioni	-	1140	-	2950	E	Italy	[46]
Amoscatelado	711–806	-	-	-	E	Spain	[60]
Asgarabad	710	652	-	3465	E	Iran	[61]
Aurora	-	1140	-	2750	E	Italy	[46]
	1237	1296	-	2490–2812	E	Italy	[62]
Baracca	-	1000–1140	-	4680	E	Italy	[46]
Bebeco	-	1030–1125	-	3775	E	Italy	[46]
Bergeron	-	1225	-	4300	E	Italy	[46]
	699	1176	64.8	4526	E	Spain	[50]
	762	1134	61.7	5150	E	Spain	[45]
	-	1122–1224	-	-	E	Serbia	[51]
Blanc Rose	1105–1185	-	-	-	E	Spain	[60]
	1050	-	-	-	E	Spain	[63]
	950–983	-	-	-	E	Spain	[60]
Búlida	976–1015	-	-	-	E	Spain	[60]
	830–926	-	-	-	E	Spain	[60]
	1133 \pm 170	1296 \pm 145	-	-	E	Spain	[64]
	560	968	53.8	5146	E	Spain	[50]
Cafona	708	1048	56.4	5294	E	Spain	[45]
	-	1200 \pm 35	-	3433	E	Italy	[48]
Canino	-	824–1515	-	2499–5800	E	Spain	[48]
	≤ 750	-	-	-	E	Spain	[63]
	787–878	-	-	-	E	Spain	[60]
	< 779	-	-	-	E	Spain	[60]
	771–779	-	-	-	E	Spain	[60]
	-	964–1370	-	2477 - 3087	E	Italy	[48]
	-	725–1350	-	2547 - 6729	E	Spain	[48]
-	1030	-	3275	E	Italy	[46]	
	532	806	45	5724	E	Spain	[45]
	488	304	29.8	-	E	South Africa	[45]

Table 2. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Cegledy arany	-	1122–1310	-	-	E	Serbia	[51]
Charisma	188	290	31.7	-	E	South Africa	[45]
Comice de Toulon	806–878	-	-	-	E	Spain	[60]
Corbato	≤750	-	-	-	E	Spain	[63]
Currot	≤750	-	-	-	E	Spain	[63]
	354 - 507	-	-	-	E	Spain	[60]
	267	596	34.3	5879	E	Spain	[50]
	-	621	40.4	1611–2083	E	Italy	[49]
	-	634	38.8	2114–3168	E	Spain	[49]
	-	726–669	-	-	E	Italy	[65]
	409	642	37.8	5774	E	Spain	[45]
D’Alessandria	-	1000–1140	-	4150	E	Italy	[46]
Doctor Mascle	592 - 711	-	-	-	E	Spain	[60]
Dorada	594	1007	56.2	5079	E	Spain	[50]
	720	1069	57.7	6189	E	Spain	[45]
Early Blush	1407	-	-	2969	E	Italy	[66]
Galta Rocha	372–592	-	-	-	E	Spain	[60]
Giletano	771–806	-	-	-	E	Spain	[60]
Goldrich	-	950–1030	-	3950	E	Italy	[46]
	-	1084	65.2	485–913	E	Italy	[49]
	-	992	58.6	2067–3431	E	Spain	[49]
	-	834–846	-	-	E	Serbia	[51]
Harcot	-	1275–1530	-	2267–2988	E	Italy	[48]
	-	920–1665	-	3731–5355	E	Spain	[48]
Hatif de Sig	902–976	-	-	-	E	Spain	[60]
Hoja de Parra	668–787	-	-	-	E	Spain	[60]
Koiska	1050	-	-	-	E	Spain	[63]
Laycot	1214	-	-	3533	E	Italy	[66]
	1045	1157	-	3252–3481	E	Italy	[62]
Luicet	1150	-	-	-	E	Spain	[63]
	1074–1140	-	-	-	E	Spain	[60]
	1058–1116	-	-	-	E	Spain	[60]
Magyar kajski	-	1122– 1310	-	-	E	Serbia	[51]
Moniqui	850	-	-	-	E	Spain	[63]
	779–926	-	-	-	E	Spain	[60]
	954 ± 103	1139 ± 96	-	-	E	Spain	[64]
	-	930–1140	-	3250	E	Italy	[46]
Moongold	-	910	-	2712	E	USA	[67]
Moonpark	1074–1105	-	-	-	E	Spain	[60]

Table 2. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Murciana	585	1009	55.9	4440	E	Spain	[50]
	690	1030	55.6	5392	E	Spain	[45]
Ninfa	-	834–846	-	-	E	Serbia	[51]
Orangered	1587	-	-	3448	E	Italy	[66]
	-	1450–1600	-	2700	E	Italy	[46]
	1481	1467	-	2654–3136	E	Italy	[62]
	738	1266	69.1	4362	E	Spain	[50]
	-	902	55.5	2421–3398	E	Italy	[49]
	-	1146	67.2	1443–1505	E	Spain	[49]
	777	1172	64.3	4916	E	Spain	[45]
	568	957	55.4	-	E	South Africa	[45]
Palsteyn	171	274	31.6	-	E	South Africa	[45]
	413	631	37.1	6247	E	Spain	[45]
Patriarca de Hueso Dulce	664–729	-	-	-	E	Spain	[60]
Paviot	1050	-	-	-	E	Spain	[63]
	995–1075	-	-	-	E	Spain	[60]
	1148 ± 148	1318 ± 145	-	-	E	Spain	[64]
Perfection	-	844	-	2593	E	USA	[67]
Perla	1074–1105	-	-	-	E	Spain	[60]
Phelps	-	857	-	2206	E	USA	[67]
Pike	-	895	-	2753	E	USA	[67]
Pisana	-	1113–1122	-	-	E	Serbia	[51]
Polonais	1058–1116	-	-	-	E	Spain	[60]
	-	1175–1450	-	2611 - 2823	E	Italy	[48]
	-	920–1665	-	4047 - 5753	E	Spain	[48]
	-	1300	-	2850	E	Italy	[46]
Precoz de Colomer	950	-	-	-	E	Spain	[63]
	< 779	-	-	-	E	Spain	[60]
	-	1175–1250	-	2503–2563	E	Italy	[48]
	-	690–1190	-	2320–5304	E	Spain	[48]
Priana	-	926 ± 26	-	2189	E	Spain	[48]
Rapareddu	-	1250	-	2850	E	Italy	[46]
Re Umberto	-	1126–1442	-	-	E	Serbia	[51]
Rojo Pasión	531	917	51.2	4670	E	Spain	[50]
	566	874	48.2	6078	E	Spain	[45]
Rouge de Rousillon	950 - 1005	-	-	-	E	Spain	[60]
Royal	875	-	-	-	E	USA	[23]
	850	-	-	-	E	Spain	[63]
	779 - 950	-	-	-	E	Spain	[60]

Table 2. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
San Castrese	-	964–1100	-	1410–3289	E	Italy	[48]
	-	725 ± 23	-	4134	E	Spain	[48]
	1044	-	-	3558	E	Italy	[66]
	-	870–930	-	3425	E	Italy	[46]
	788	894	-	2705–3874	E	Italy	[62]
	-	880	54	1615–3326	E	Italy	[49]
	-	981	56.5	2116–2967	E	Spain	[49]
S. Nicola Grosso	-	1140	-	3350	E	Italy	[46]
Sarritzu I°	-	950–1140	-	3950	E	Italy	[46]
Selene	590	1018	57.4	4078	E	Spain	[50]
	705	1057	56.9	4605	E	Spain	[45]
Shakarpare	862	746	-	3171	E	Iran	[61]
Shamlo	1130	826	-	2987	E	Iran	[61]
Stark Early Orange	-	1411	78.9	-	E	Italy	[49]
Sundrop	-	964–967	-	-	E	Serbia	[51]
Sylred	-	967–1019	-	-	E	Serbia	[51]
Tabarze ghermez	1130	826	-	2987	E	Iran	[61]
Tilton	1000	-	-	-	E	USA	[23]
Tiryntos	-	935–1000	-	1898–3289	E	Italy	[48]
Tom Cot	-	834–846	-	-	E	Serbia	[51]
Tonda di Costiglione	1812	-	-	3643	E	Italy	[66]
	1586	1561	-	3402–3696	E	Italy	[62]

Table 3. Chilling and heat requirements of Japanese apricot cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat req. GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
67	-	-	69	994	E	China	[53]
Baijiahe	-	-	59	1316	E	China	[53]
Changnong17	-	-	69	994	E	China	[53]
Dabaimei	-	-	56	1669	E	China	[53]
Dali	-	-	40	1192	E	China	[53]
Danfenghou	-	-	73	2054	E	China	[53]
Daqiandi	-	-	66.5	1096	E	China	[53]
Daroumei	-	-	38.5	1100	E	China	[53]
Dayezhugan	-	-	73	1651	E	China	[53]
Dayu	-	-	69	822	E	China	[53]
Dongqing	875 ± 147	1054 ± 256	58±9	1018±174	E	China	[52]
Dongshanlimei	-	-	50	1250	E	China	[53]
Ellching	300	-	-	-	E	Japan	[54]
Fenghou	1148 ± 162	1323 ± 247	73±8	1697±1697	E	China	[52]
Fenghualimei	-	-	56	1533	E	China	[53]

Table 3. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat req. GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Gaotianfenghou	-	-	73	2054	E	China	[53]
Gaotiangmei	-	-	64.5	1099	E	China	[53]
Guangdonghuangpi	-	-	40	1192	E	China	[53]
Gucheng	-	-	59	1383	E	China	[53]
Hangzhoubaimai	-	-	60	1231	E	China	[53]
Henghe	-	-	34	1287	E	China	[53]
Hongding	-	-	69	860	E	China	[53]
Hongmei	-	-	73	1835	E	China	[53]
Hongnong	-	-	75	1675	E	China	[53]
Huangxiaoda	-	-	56	1533	E	China	[53]
Huaxiangshi	-	-	33.5	1072	E	China	[53]
Jiazhouxiaomei	-	-	69	1733	E	China	[53]
Jiazhouzuixiao	-	-	62	1116	E	China	[53]
Jietianmei	-	-	77	2378	E	China	[53]
Jiuzhongmei	-	-	66.5	1096	E	China	[53]
Lizimei	-	-	69	977	E	China	[53]
Longyan	-	-	73	1835	E	China	[53]
Lve	-	-	29	1268	E	China	[53]
Nanhong	-	-	50	1583	E	China	[53]
Nanko	500	-	-	-	E	Japan	[54]
Pinzhimei	-	-	73	1835	E	China	[53]
Qijiangxingmei	-	-	56	1533	E	China	[53]
Qingjia2	-	-	75	1675	E	China	[53]
Qixingmei	-	-	60	1232	E	China	[53]
Ruantiaohongmei	-	-	73	1835	E	China	[53]
Shuangshuidaroumei	239 ± 84	479 ± 180	26±7	1235±77	E	China	[52]
Shuangtaomei	-	-	36.5	1079	E	China	[53]
Sichuangbaimei	-	-	60	1231	E	China	[53]
Sichuanghuangmei	-	-	60	1231	E	China	[53]
Sichuangqingmei	-	-	78.5	2378	E	China	[53]
Siyuemei	-	-	60	1231	E	China	[53]
Taihu1	-	-	69	977	E	China	[53]
Taihu3	-	-	50	1575	E	China	[53]
Taoxingmei	332 ± 110	567 ± 198	32 ± 8	110 ± 199	E	China	[52]
Tengwulang	-	-	78.5	2378	E	China	[53]
Tonglv	-	-	73	1835	E	China	[53]
Touguhong	-	-	62	986	E	China	[53]
Wanhong	-	-	73	1835	E	China	[53]
Weishanzhong	-	-	50	1574	E	China	[53]
Xianmimei	-	-	40	1205	E	China	[53]
Xiaomei	-	-	50	1369	E	China	[53]
Xiaoougongfen	-	-	42.5	1037	E	China	[53]

Table 3. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat req. GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Xiaoqing	-	-	73	1432	E	China	[53]
Xiaoyezhugan	-	-	56	1533	E	China	[53]
Xingnongxiaomei	-	-	62	1116	E	China	[53]
Xiyeqing	828 ± 139	1040 ± 231	64 ± 9	1179 ± 230	E	China	[52]
Xuemei	-	-	69	1405	E	China	[53]
Yanglao1	-	-	59	1530	E	China	[53]
Yanglao2	-	-	34	1297	E	China	[53]
Yanglao3	-	-	56	1669	E	China	[53]
Yanhua	1141 ± 253	1321 ± 328	76 ± 6	1250 ± 213	E	China	[52]
Yanzhimei	-	-	69	977	E	China	[53]
Yeliqing	-	-	69	994	E	China	[53]
Yingsu	-	-	59	1463	E	China	[53]
Yinnafenghou	-	-	73	2054	E	China	[53]
Yueshijie	-	-	62	1116	E	China	[53]
Yunnanxingmei	-	-	73	1835	E	China	[53]
Yuying	-	-	62	1116	E	China	[53]
Zaohong	-	-	50	1583	E	China	[53]
Zaohua	-	-	56	1403	E	China	[53]
Zhizhimei	-	-	69	1069	E	China	[53]
Zhonghong	-	-	53	1542	E	China	[53]

5.3. Peach (*P. persica*)

Peach is the stone fruit crop with higher economic importance. It has been confined traditionally to latitudes between 30° and 50° North and South [68], but in the last years, there is an increasing interest to expand it to warmer areas, including tropical and subtropical regions [68–70]. In recent decades, intense breeding has led to the release of an enormous number of cultivars of different types of fruit, including pubescent (peaches) or glabrous skin (nectarines), round or flat shape, white or yellow flesh, and freestone or clingstone [70] (Table 4). Several peach cultivars have been used to develop models in dormancy studies, both in experimental approaches to determine the date of breaking of endodormancy [23,38,71] and in models to quantify chilling and forcing temperatures [13,28,29,72]. The *DORMANCY-ASSOCIATED MAD-BOX (DAM)* genes that regulate dormancy were first reported in an ‘evergreen’ peach mutant [73,74].

This work compiles the chilling requirements of 216 cultivars, including seven flat peach cultivars, 25 nectarine cultivars and 172 peach cultivars, showing high differences in the range 239–536 CH, 354–861 CU and 22.3–48.5 CP for flat peaches, 90–426 CH/ 45–1050CU/9–47CP for nectarines and 71–1390 CH/ 5–1220 CU/ 1–1221.8 CP for peaches. The heat requirements of 44 cultivars have been compiled, ranging from 5853 to 9338 GDH for nectarine and between 3476 and 16493 GDH for peach.

Table 4. Chilling and heat requirements of peach cultivars.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Flat peach	Carioca	368	582	35.5	-	E	Spain	[75]
	Siroco 10	305	480	28.9	-	E	Spain	[75]
	Siroco 5	239	355	22.3	-	E	Spain	[75]
	Sweet Cap	536	86	47.6	-	E	Spain	[75]
	UFO 2	432	681	40.2	-	E	Spain	[75]
	UFO 3	451	741	43.8	-	E	Spain	[75]
	UFO 4	484	803	48.5	-	E	Spain	[75]
Nectarine	Caldessi 2000	316	210	33	9002	S	Argentina	[76]
	Carolina	326	-	-	-	S	Argentina	[77]
	Cheonhong	-	800	-	-	S	Korea	[78]
	Collins	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Cortez	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Derby	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Earliscarlet	-	800	-	-	S	Korea	[78]
	Early Giant	342	249	46	8677	S	Argentina	[76]
	Fantasia	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Firebrite	308	198	34	7498	S	Argentina	[76]
	Flavortop	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Garden State	-	1050	-	-	S	Korea	[78]
	Hahong	-	700	-	-	S	Korea	[78]
	Hardired	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Lara	350	-	-	-	S	Argentina	[77]
		93	47	9	9338	S	Argentina	[76]
	María Anna	426	392	46	5853	S	Argentina	[76]
	María Lucía	413	244	47	6777	S	Argentina	[76]
	May Glo	98	84	12	8242	S	Argentina	[76]
	May Grand	-	800	-	-	S	Korea	[78]
Redgold	-	850	-	-	S	Korea	[78]	
Roseprincess	313	207	33	9000	S	Argentina	[76]	
Suhong	-	700	-	-	S	Korea	[78]	
Sunfre	-	500	-	-	S	Korea	[78]	
Sungem	-	425	-	-	S	Korea	[78]	
Sunraycer	90	45	10	9086	S	Argentina	[76]	
Peach	Afterglow	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Akatsuki	1176	1074	-	5675	E	Japan	[79]
	Anjiry Asali	862	746	-	4232	E	Iran	[61]
	Anjiry Zafarany	973	805	-	4099	E	Iran	[61]
	Armking	-	600	-	-	S	Korea	[78]
	Autumnglo	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Babygold 5	498	364	53	8505	S	Argentina	[76]

Table 4. Cont.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Peach	Belle	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Best May	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Big top	363	716	45.2	-	E	Spain	[80]
	Bonão	142.3	46.6	532	-	S	Brazil	[81]
	BR-1	<300	-	-	-	E	Brazil	[82]
	BR-3	305	265	982.6	-	S	Brazil	[81]
	Cambará do sul	371	295	1221.8	-	S	Brazil	[81]
	Camdem	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Canadian	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Candoka	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Catherina	793	1220	62.4	-	E	Spain	[80]
	Changbangjosaeng	232	-	-	-	S	China	[83]
	Changhowon Hwangdo	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Cheonghong	146 - 261	-	-	-	S	China	[83]
	Cheonjoongdo	137	-	-	-	S	China	[83]
	Chinese cling	850	-	-	-	S	China	[84]
	Chiyohime	820	-	-	-	E	Japan	[85]
	Colora	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Coral	354	32	1137.8	-	S	Brazil	[81]
	Cresthaven	-	950	-	-	E	USA	[86]
	Cumberland	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Delicioso	200	-	-	-	E	Brazil	[82]
	Della Nona	400	-	-	-	E	Brazil	[82]
	Diamante	294	228	875.6	-	S	Brazil	[81]
	Dixigem	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Dixigold	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Dixired	950	-	-	-	S	USA	[28]
	Duke of York	1150	-	-	-	S	USA	[28]
	Early Elberta	-	850	-	-	S	Korea	[78]
		850	-	-	-	S	USA	[28]
	Early Halegaven	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Early Hiley	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Early Jubilee	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Early May Crest	300	600	40	-	E	Tunisia	[87]
	Early Rose	1150	-	-	-	S	USA	[28]
Early Vedette	950	-	-	-	S	USA	[28]	
Early Wheeler	950	-	-	-	S	USA	[28]	
Eclipse	950	-	-	-	S	USA	[28]	
Elberta	850	-	-	-	S	USA	[28]	
	790	-	-	5110	E	USA	[27]	

Table 4. Cont.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Peach	Eldorado	300	-	-	-	E	Brazil	[82]
	Elegant Lady	806	-	-	4692	E	Italy	[66]
	Erly-Red-Fre	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Fairhaven	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Fairprince	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Fairs Beauty	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Fay Elberta	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Feicheng Bai Li 10	1100	-	-	-	S	China	[84]
	Fergold	921	861	52.8	-	E	Spain	[80]
	Fireglow	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Fireprince	341	226	36	8488	S	Argentina	[76]
	Fisher	-	950	-	-	S	Korea	[78]
		950	-	-	-	S	USA	[28]
	Fla. 91-8c	100	-	-	-	S	Argentina	[77]
	Flaming Gold	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Flavorcrest	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Flordaglo	79	11	1	8394	S	Argentina	[76]
	Flordastar	-	225	-	3476 ± 57	E	Spain	[88]
	Franca	818	-	-	4887	E	Italy	[66]
	Fuzzless Berta	1150	-	-	-	S	USA	[28]
	Gage	750	-	-	-	S	USA	[28]
	GaLa	306	206	30	7415	S	Argentina	[76]
	Gemmers Elberta	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Golden Jubilee	-	850	-	-	S	Korea	[78]
		850	-	-	-	S	USA	[28]
	Goldeneast	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Guglielmina	488	381	51	8543	S	Argentina	[76]
	Haj kamzemi	1390	868	-	4543	E	Iran	[61]
	Halberta Giant	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Halegold	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Halehaven	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Halford	-	900	-	-	S	Korea	[78]
	Harbrite	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Harken	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Harland	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Harrow Beauty	-	775	-	-	S	Korea	[78]
Herbhale	850	-	-	-	S	USA	[28]	
Hikawahakuhou	1173	1079	-	5505	E	Japan	[79]	
Hiley	750	-	-	-	S	USA	[28]	
Ideal	850	-	-	-	S	USA	[28]	
J.H. Hale	850	-	-	-	S	USA	[28]	

Table 4. Cont.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Peach	Janghowon	134	-	-	-	S	China	[83]
	Jerseyglo	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Jerseyland	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Jinmi	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	July Elberta	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Juneprince	-	650	-	-	E	USA	[86]
		-	625	-	-	S	Korea	[78]
	Kalhaven	950	-	-	-	S	USA	[28]
	Kosary	1390	868	-	4543	E	Iran	[61]
	Late Dwarf	71	5	6	16493	S	Argentina	[76]
	Levante 30	321	523	31.7	4592	S	Spain	[89]
	Levante 40	341	536	33.0	6824	S	Spain	[89]
	Lizzie	950	-	-	-	S	USA	[28]
	Loring	-	800	-	-	S	Korea	[78]
	Lovell	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Majestic	-	750	-	-	S	Korea	[78]
	Maravilha	203	124	692.4	-	S	Brazil	[81]
	Marfim	313	287	1018.2	-	S	Brazil	[81]
	María Delizia	338	223	47	11504	S	Argentina	[76]
	María Marta	327	212	34	9252	S	Argentina	[76]
	Maruja	572	809	51.8	-	E	Spain	[80]
	Maxine	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Mayflower	1150	-	-	-	S	USA	[28]
	Mibaekdo	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Michelini	884	-	-	5333	E	Italy	[66]
	Midway	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Mihong	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Misshong	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Mistral 30	402	659	40.5	7103	S	Spain	[89]
	Momo tsukuba 127	555	652	-	5259	E	Japan	[79]
	Nectaross	925	-	-	5218	E	Italy	[66]
	New Yorker	-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Newday	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Okinawa 1	319	443	-	4691	E	Japan	[79]
Pacemaker	750	-	-	-	S	USA	[28]	
Pepita	204	118	687.3	-	S	Brazil	[81]	
Planalto	400 - 500	-	-	-	E	Brazil	[82]	
	216	139	720.4	-	S	Brazil	[81]	
Precocinho	150	-	-	-	E	Brazil	[72]	

Table 4. Cont.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Peach	Qingzhou Bai Pi Mi Tao	1100	-	-	-	S	China	[84]
	Raritan Rose	-	1050	-	-	S	Korea	[78]
		950	-	-	-	S	USA	[28]
	Red Globed	-	850	-	-	E	USA	[86]
		-	850	-	-	S	Korea	[78]
	Redelberta	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Redhaven	850	-	-	-	S	USA	[28]
		870	-	-	4922	E	USA	[27]
	Redheaven	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Redrose	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Reliance	-	1050	-	-	S	Korea	[78]
	Rich Lady	73	6	11	14086	S	Argentina	[76]
	Richhaven	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Rio Oso Gem	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Riograndense	300	-	-	-	E	Brazil	[82]
	Rosa del West	434	378	51	9879	S	Argentina	[76]
	Ruiguang 03	-	777	-	-	S	Korea	[78]
	Salberta	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Salwy	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Sentry	-	875	-	-	S	Korea	[78]
	Shipper Late Red	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Siroco 5	246	427	25.8	7025	S	Spain	[89]
	Siroco 20	344	561	35.8	7384	S	Spain	[89]
	Siroco 30	308	539	31.2	6815	S	Spain	[89]
	Siroco 40	310	509	30.3	7463	S	Spain	[89]
	Siroco 43	370	593	36.4	6552	S	Spain	[89]
	Southland	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Spring Belle	650	-	-	-	S	Spain	[90]
	Spring Lady	331	625	40.8	-	E	Spain	[80]
	Springtime	-	650	-	-	S	Korea	[78]
	Stark Red Gold	898	-	-	5188	E	Italy	[66]
	Starking Delicious	-	750	-	-	S	Korea	[78]
Sullivan	850	-	-	-	S	USA	[28]	
Summercrest	950	-	-	-	S	USA	[28]	
Sunglo	-	850	-	-	S	Korea	[78]	
Sunhigh	750	-	-	-	S	USA	[28]	
Sunland	-	750	-	-	E	USA	[86]	
	-	750	-	-	S	Korea	[78]	
Triogem	850	-	-	-	S	USA	[28]	

Table 4. Cont.

	Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
		CH	CU	CP				
Peach	Tropic Beauty	-	150	-	-	S	Korea	[78]
	Tropic Snow	-	200	-	-	S	Korea	[78]
	Turmalina	250	184	801.8	-	S	Brazil	[81]
	Up-to-date	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Valiant	850	-	-	-	S	USA	[28]
	Vedette	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Veeglo	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Veteran	1050	-	-	-	S	USA	[28]
	Vivid	-	950	-	-	S	Korea	[78]
	Worlds Earliest	750	-	-	-	S	USA	[28]
	Yanguang	-	780	-	-	S	Korea	[78]
	Youmyeong	150 - 277	-	-	-	S	China	[83]
	Yu Hua Lu	800	-	-	-	S	China	[84]
	Yumi	-	800	-	-	S	Korea	[78]
	Yumyeong	-	850	-	-	S	Korea	[78]
Zoud Ras	1130	826	-	4384	E	Iran	[61]	

5.4. European and Japanese plum (*P. domestica* and *P. salicina*).

World production of plums increased by almost 20% in the last 10 years (from 9.5 million tons in 2007 to 12 million tons in 2017) [2]. These data include European plums, Japanese plums and hybrids between different *Prunus* sp. In spite of the economic importance of this crop, temperature requirements are little studied, with data available for only nine cultivars of European plum (Table 5) [91] and 16 cultivars of Japanese plum (Table 6) from two studies performed in Spain [31,91]. The experimental procedure used was slightly different between studies, with variation in the temperature of the growing chamber and in the growth evaluation procedure.

European plums are cultivated in colder climates [92], showing higher chilling requirements (579–1323 CH) than Japanese plums (118–685 CH) (Tables 5 and 6). The chilling requirements of European plum ranged from 579–678 CH for ‘Reine Claude d’Oullins’ to 1116–1323 CH for ‘Reine Claude Noir’ [93]. There is no data available on heat requirements in this species.

The Japanese plum cultivars with lower chilling requirements are ‘Methley’ (118–239 CH [91] and ‘Pioneer’ (181–231 CH / 297–358 CU / 18.4–27.6 CP), which also showed the lower values of heat requirements (5261–6720 GDH) [31]. ‘Songold’ showed higher values both for chilling (561–630 CH / 974–1001 CU / 60.4–61.1 CP) and heat requirements (8588–10034 GDH). There are only data from different reports for ‘Golden Japan’ and ‘Santa Rosa’, showing high differences between them (Table 6).

Table 5. Chilling and heat requirements of European plum cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat req. GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Beauty Plum of Catalogne	678–819	-	-	-	E	Spain	[91]
Coe’s Golden Drop	984–1157	-	-	-	E	Spain	[91]
Real de Calahorra	976–1029	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claude de Bavay	984–1157	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claudie Noir	1116–1323	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claude d’Oullins	579–678	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claude Verte	976–1275	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claude Violetta d’Agen	819–984	-	-	-	E	Spain	[91]
Reine Claude Washington	976–1275	-	-	-	E	Spain	[91]

Table 6. Chilling and heat requirements of Japanese plum cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat req. GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Angeleno	434–447	750–779	39.7–50.1	7300–8180	E	Spain	[31]
Apex	486–678	-	-	-	E	Spain	[91]
Black Diamond	389–432	630–750	38.7–47.1	6994–8068	E	Spain	[31]
Black Splendor	213–324	437–605	29.1–31.2	5744–6705	E	Spain	[31]
Burbank	486–678	-	-	-	E	Spain	[91]
Formosa	486–678	-	-	-	E	Spain	[91]
Fortune	436–447	750–769	39.7–46.7	6681–8506	E	Spain	[31]
Golden Globe	473–685	872–1053	44.8–63.5	7300–9151	E	Spain	[31]
Golden Japan	118–287	-	-	-	E	Spain	[91]
	384–454	701–829	35.4–52.1	6939–7855	E	Spain	[31]
Laetitia	436–454	750–829	39.7–52.1	7894–8020	E	Spain	[31]
Methley	118–239	-	-	-	E	Spain	[91]
Pioneer	181–231	297–358	18.4–27.6	5261–6720	E	Spain	[31]
Red Beauty	265–369	500–688	25.6–46	6727–7183	E	Spain	[31]
Santa Rosa	372–627	-	-	-	E	Spain	[91]
	436–459	750–829	41.8–52.1	6591–9099	E	Spain	[31]
Songold	561–630	974–1001	60.4–61.1	8588–10034	E	Spain	[31]
Wickson	345–627	-	-	-	E	Spain	[91]

5.5. Sweet and Sour Cherry (*P. avium* and *P. cerasus*)

Sweet cherries are mainly produced in Mediterranean countries as Turkey (0.63 million t/year), Italy (0.12 million t/year), Spain (0.11 million t/year) and Greece (0.90 million t/year), in Middle Eastern countries such as Iran (0.14 million t/year) and Uzbekistan (0.14 million t/year), in the United States (0.40 million t/year), and in Chile (0.13 million t/year) [2]. Chilling requirements are available for 53 cultivars [34,94–97], while the heat requirements were only calculated for 16 of them (Table 7) [34,96]. Chilling requirements are mainly quantified with CH in 48 cultivars [94,96] that range from 176 CH of ‘Cristobalina’ [96] to more than 1100 CH for ‘Garrafal de Lérida’, ‘Hedelfinger’, ‘Lambert’, ‘Napoleón’, and ‘Vignola’ [94]. Data available in CU in 21 cultivars range between 94 CU for ‘Lapins’ and ‘Larian’ [97] and 1559 ± 53 CU for ‘Skeena’ [95], and 8 cultivars in CP from to 30.4 CP for ‘Cristobalina’ to 57.6 CP for ‘Marvin’ [96]. Chilling requirements for ‘Burlat’ and ‘Cristobalina’ were experimentally analyzed in two studies, resulting in higher values in the north of Spain (‘Burlat’ 900–100 CH and ‘Cristobalina’ <800 CH) [94] than in the Mediterranean area (‘Burlat’ 618 CH and ‘Cristobalina’

176 CH) [96]. Estimations of heat requirements showed high variation between cultivars and locations: 3473 ± 1236 GDH for ‘Schneider’ in Germany [34], and 15500–16000 GDH are for ‘Lapins’, ‘Larian’, and ‘0900 Ziraat’ in Turkey [97].

The experimental methodology [94–97] showed slight differences among studies: the frequency of field sampling (every 2 [97] or 7 [94] days, or every 50–100 CU [96]), the temperature of the chamber (24 ± 1 °C [96,97] or 20 ± 1 °C [94]), the period in the chamber (7 [94,95], 10 [96] or 21 [97] days), and also in the bud growth evaluation (dry weight [94], fresh weight [95], or phenology [96,97]). A statistical methodology was developed based on ‘Schneiders’ in Germany [34].

Sour cherry requirements have been poorly studied. There is only data of cultivar Montmorency, which showed 954 CU and 6130 GDH [42] (Table 7).

Table 7. Chilling and heat requirements of sour and sweet cherry cultivars.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Ambrunés	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Bing	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
	-	1082 ± 27	-	-	E	Spain	[95]
Brooks	411.5	556	36.7	7863.2	E	Spain	[96]
Burlat	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
	618	806	48	8750.2	E	Spain	[96]
	-	981 ± 83	-	-	E	Spain	[95]
	-	-	86	-	E	Spain	[98]
Cherovina	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Cristobalina	<800	-	-	-	E	Spain	[94]
	176	397	30.4	9195	E	Spain	[96]
	-	687 ± 83	-	-	E	Spain	[95]
	-	-	29	-	E	Spain	[98]
Daiber	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Earlise	-	981 ± 83	-	-	E	Spain	[95]
Early Rivers	800–900	-	-	-	E	Spain	[94]
Fertard	-	-	101	-	E	Spain	[98]
Garrafal de Lérida	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Guillaume	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Hedelfingen	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Jaboulay	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Jarandilla	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Kordia	700–750	150	-	14000	E	Turkey	[97]
Lambert	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Lampé (Ramillete)	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Lapins	400–450	94	-	15500–16000	E	Turkey	[97]
Larian	450	94	-	15500–16000	E	Turkey	[97]
Marmotte	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Marvin	788	1002	57.6	9450	E	Spain	[96]
Merton Glory	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Mollar de cáceres	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Moreau	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Nafrina	500–550	120	-	15000–15500	E	Turkey	[97]
Napoléon	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
New Star	709	909	53.5	8257	E	Spain	[96]

Table 7. Cont.

Cultivar	Chilling requirements			Heat requirements GDH	Method	Loc.	Ref.
	CH	CU	CP				
Noir de Guben	600–650	110	-	14000–14500	E	Turkey	[97]
Pico Colorado	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Producta	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Ramón Oliva	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Regina	-	-	86	-	E	Spain	[98]
Reverchon	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Ripolla	800–900	-	-	-	E	Spain	[94]
Ruby	618	806	48	7326	E	Spain	[96]
Somerset	618	806	48	8625.2	E	Spain	[96]
Schneiders	698 ± 151	794 ± 17	45.7 ± 5.4	3473 ± 1236	S	Germany	[34]
Skeena	-	1559 ± 63	-	-	E	Spain	[95]
Stark Hardy Giant	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Summit	650	125	-	15000	E	Turkey	[97]
Sunburst	650–700	141	-	14000–14500	E	Turkey	[97]
Taleguera Brillante	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Temprana de Sot	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Tigré	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
Van	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Vernon	1000–1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Vignola	> 1100	-	-	-	E	Spain	[94]
Villareta	900–1000	-	-	-	E	Spain	[94]
0900 Ziraat	600–650	134	-	15500–16000	E	Turkey	[97]
Montmorency(sour cherry)	-	954	-	6130	S	USA	[42]

6. Concluding Remarks and Perspectives

This study compiles the temperature requirements of a total of 530 cultivars of eight *Prunus* ssp. Most of the data correspond to peach (204 cultivars), almond (106 cultivars), Japanese apricot (77 cultivars), European apricot (68 cultivars), and sweet cherry (49 cultivars) since there is little information available for European plum (nine cultivars), Japanese plum (16 cultivars), and sour cherry (1 cultivar) (Table 8). These data represent a very small percentage of the existing commercial cultivars and, in addition, 84 out of 530 cultivars came from studies published more than 25 years ago (Table 8). Therefore, temperature requirements are only available for very current growing cultivars. To serve as a reference, more than 1500 stone fruit cultivars were registered in the European Union in the last 25 years, including 946 for peach, 320 for apricot, 132 for Japanese plum, and 130 for sweet cherry [99]. Two main methodologies, statistical and experimental, have been used to obtain the temperature requirements reported here. Chilling requirements were experimentally determined for all the cultivars of European and Japanese apricot and European and Japanese plum. In contrast, most of the data available for cultivars of almond (153 statistical data vs. 56 experimental data) and peach (173 statistical data vs. 42 experimental data) were statistically determined (Table 8).

Table 8. For each stone fruit crop, number of studies included in this work, number of cultivars with available data of chilling and/or heat requirements, and number of cultivars according to the methodology used.

Specie	Studies	Cultivars		Methodology	
		Total n°	> 25 years old	Statistical	Experimental
Almond	5	106	17	98	10
European apricot	15	68	23	0	69
Japanese apricot	3	77	0	0	77
Peach	Flat peach	1	7	0	0
	Nectarine	3	25	0	0
	Peach	18	172	1	11
European plum	1	9	9	0	9
Japanese plum	2	16	5	0	16
Sweet and Sour cherry	7	50	29	1	49

Chilling quantification was performed according to different temperature models: 382 data were calculated with CH, 342 with CP and 241 with CP. Heat requirements are available for 328 out of 530 cultivars (Table 9). Among the different stone fruit crops, peach cultivars presented a wider range of chilling requirements (71–1390 CH, 5–1220 CU, and 1–1222 CP), while flat peach cultivars showed the least narrow range (239–536 CH, 354–861 CU, and 22.3–48.8 CP). Some almond cultivars showed the lowest chilling requirements, while some cultivars of European apricot, European plum, peach, and sweet cherry showed the highest chilling requirements. Japanese apricot cultivars showed lower heat requirements, while some peach cultivars showed the highest values (16493 GDH) (Table 9).

Table 9. For each stone fruit crop, the number of cultivars and range of both chilling and heat requirements according to the model used.

Specie	CH		Chilling requirements CU		CP		Heat requirements GDH		
	Data	Range	Data	Range	Data	Range	Data	Range	
Almond	73	8–713	91	284–996	62	3.4–55.4	107	2862–10201	
Eur. apricot	78	171–1812	88	274–1665	31	29.8–78.9	74	485–6729	
Jap. apricot	8	239–1148	6	479–1323	75	29–78.5	75	822–2378	
Peach	Flat peach	7	239–536	7	354–861	7	22.3–48.5	0	-
	Nectarine	11	90–426	24	45–1050	9	9–47	9	5853–9338
	Peach	132	71–1390	93	5–1220	34	1–122	35	3476–16493
Eur. plum	9	579–1323	0	-	0	-	0	-	
Jap. plum	16	118–685	11	297–1053	11	18–64	11	5261–10034	
Sweet cherry	48	176–1100	22	94–1559	12	29–107	17	3473–16000	

The empirical methodology to determine dormancy by monitoring shoots in forcing conditions is the unique currently available, although it was designed more than 60 years ago [23]. This method has been applied to determine chilling requirements in early [32] and recent studies [31], but it has also been used to infer the dormant stage in research aimed at studying the physiology of dormancy [6,54,59,100–102]. The variability on the experimental designs among studies had often resulted in inconsistencies in the data obtained. This variability is noted in the frequency of shoot sampling along winter (e.g., weekly, every 10 days or every certain amount of chilling accumulated), but also in the environmental conditions of the growth chamber: temperature (20 °C, 25 °C), temperature regime (constant or with day/night variation), and photoperiod. Subsequently, the evaluation of

bud growth is performed after different periods in the growth chamber (a week, 10 days, 20 days), and it is based on analyzing vegetative [103] or flower buds [95]. Furthermore, several criteria are used to determine dormancy overcome. These can consist of significant increases in fresh [23] or dry weight [60], and/or phenological changes in bud phenology [24], which can result in an underestimation of the chilling requirements [98]. All these variations make this methodology easily adaptable to the characteristics of each fruit species and regional variations, but the results obtained under specific conditions should be taken with caution when applied to other regions or climates.

The statistical determination of dormancy is mainly based on two approaches. On one side, the correlation of winter temperatures with the flowering dates, which has been used to establish the chilling requirements of almond [26,33], apricot, peach, plum and sweet cherry [33] cultivars in Spain. On the other side, PLS analysis has been recently developed in a sweet cherry cultivar in Germany [34], and was subsequently applied to other temperate fruit crops as almond in Tunisia [35] and Spain [36], and apricot in China [27,104]. This methodology has reported interesting results on predicting phenology under future scenarios of global warming [19,104]. However, statistical analyses present low applicability on new cultivars released from breeding programs, since they are based on a long series of flowering dates records (more than 20 years).

Once the endo- and eco- dormancy periods have been established, specific temperature models are used to calculate the duration of each phase. Although these models were specially designed to quantify chilling or warm temperatures, they present numerous drawbacks. The Chilling Hours model is easy to understand and calculate and is commonly used by growers who often know the accumulated CH in their location, despite the lack of information about the requirements of their cultivars. This model does not fit perfectly with the behavior of trees, especially in mild and warm areas [105,106]. The Utah model attempts to be more accurate by weighting the temperature ranges. However, the fact that it establishes negative values for warm temperatures hampers its applicability in mild winter conditions. The different criteria for establishing the starting point to quantify temperatures, either an established date for dormancy starting (e.g., November 1st) [35] or the date with the maximum negative value [29], had resulted in high differences even for the same cultivar as occurs in almond [26,35,43] or European apricot [45,48,50], making the comparison between studies difficult. The Dynamic model has been proposed as the best model available but also presents limitations on fitting the plant responses to chill [37]. It was designed as a process-based model, however, the physiological process behind is still unknown [30,40,72]. Finally, the Growing Degree Hours model allows quantifying forcing temperatures in a wide range of biological processes, such as phenological stages of annual crops or even insect growth [107]. The results of GDH quantification are highly variable between species, especially at different locations [34]). This could be due to both the model and the interaction between chill and heat accumulation [108–110].

In spite of both the methodologies to determine dormancy periods and the temperature models have numerous pitfalls, the available data of temperature requirements are useful to predict the adaptability of a particular cultivar to a certain area. However, very few of the cultivars currently grown have known temperature requirements. This means that, in most cases, the flowering period is the unique information available to assess the adaptation of a cultivar. Flowering periods are usually related to a reference cultivar (e.g., 'Burlat' in sweet cherry) [5] and successfully used for spring frost risk assessment and for pollination purposes, to predict flowering overlap between pollinating and pollinated cultivars. However, assessing the possible adaptation to an area based on relative flowering dates has many limitations, and temperature requirements offer a more reliable approach [111]. However, this review shows that information is not available for the most important cultivars nowadays, and, when available, they are usually imprecise estimations based only on flowering dates. Furthermore, temperature requirements are scarcely evaluated in most breeding programs, which could lead to an increasing lack of information in the coming years.

In conclusion, numerous improvements may be needed to obtain an accurate determination of the temperature requirements of stone fruit cultivars. The standardization of the experimental

conditions would allow obtaining more robust and comparable data. However, the increasing number of new cultivars in most *Prunus* species and the expected reduction of winter chill due to global warming emphasize the necessity of a proper biological marker for dormancy. This would allow the analysis of samples collected directly from the field, without depending on external factors such as forcing conditions in the experimental approach or the availability of a large set of phenological data. Recent reports have revealed several processes as promising candidates for dormancy markers such as the expression of the *DORMANCY-ASSOCIATED MAD-BOX (DAM)* genes in peach [112], starch accumulation within the ovary primordia cell in sweet cherry [113], anther meiosis in apricot [114,115], and hormone regulation in sweet cherry [116]. Establishing the relationship between temperature records and a biological dormancy marker would lead to a process-based model that would allow direct determination of dormancy and a more accurate estimation of the temperature requirements of particular cultivars.

Author Contributions: J.R. and E.F. developed the conceptual framework of the manuscript; E.F., S.H., B.I.G., M.E.G., and J.R. wrote the paper. J.R. and E.F. corrected the final draft. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RFP2015-00015-00, RTA2017-00003-00); Gobierno de Aragón—European Social Fund, European Union (Grupo Consolidado A12_17R).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. *Fruit Breeding*; Badenes, M.; Byrne, D. (Eds.) Springer: Boston, MA, USA, 2012.
2. FAOSTAT. Available online: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (accessed on 15 November 2019).
3. Perry, T.O. Dormancy of trees in winter. *Science* **1971**, *171*, 29–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Flower bud dormancy in *Prunus* species. In *Advances in Plant Dormancy*; Anderson, J.V., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 123–135.
5. Guerra, M.E.; Rodrigo, J. Japanese plum pollination: A review. *Sci. Hortic.* **2015**, *197*, 674–686. [[CrossRef](#)]
6. Fadón, E.; Rodrigo, J. Unveiling winter dormancy through empirical experiments. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, *152*, 28–36. [[CrossRef](#)]
7. Atkinson, C.J.; Brennan, R.M.; Jones, H.G. Declining chilling and its impact on temperate perennial crops. *Environ. Exp. Bot.* **2013**, *91*, 48–62. [[CrossRef](#)]
8. Luedeling, E.; Zhang, M.; Girvetz, E.H. Climatic changes lead to declining winter chill for fruit and nut trees in California during 1950–2099. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6166. [[CrossRef](#)]
9. Campoy, J.A.; Ruiz, D.; Egea, J. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: A review. *Sci. Hortic.* **2011**, *130*, 357–372. [[CrossRef](#)]
10. Rohde, A.; Bhalerao, R.P. Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 217–223. [[CrossRef](#)]
11. Lang, G.A.; Early, J.D.; Martin, G.C.; Darnell, R.L. Endodormancy, paradormancy, and ecodormancy—Physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience* **1987**, *22*, 371–377.
12. Fadón, E.; Fernandez, E.; Behn, H.; Luedeling, E. A conceptual framework for winter dormancy in deciduous trees. *Agronomy* **2020**, *10*. [[CrossRef](#)]
13. Richardson, E.A.; Seeley, S.D.; Walker, D.R.; Anderson, J.L.; Ashcroft, G.L. Pheno-climatography of spring peach bud development. *HortScience* **1975**, *10*, 236–237.
14. Jansson, S.; Douglas, C.J. *Populus*: A model system for plant biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2007**, *58*, 435–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Castède, S.; Campoy, J.A.; García, J.Q.; Le Dantec, L.; Lafargue, M.; Barreneche, T.; Wenden, B.; Dirlewanger, E. Genetic determinism of phenological traits highly affected by climate change in *Prunus avium*: Flowering date dissected into chilling and heat requirements. *New Phytol.* **2014**, *202*, 703–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Flower development in sweet cherry framed in the BBCH scale. *Sci. Hortic.* **2015**, *192*, 141–147. [[CrossRef](#)]

17. Considine, M.J.; Considine, J.A. On the language and physiology of dormancy and quiescence in plants. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 3189–3203. [[CrossRef](#)]
18. Benmoussa, H.; Ben Mimoun, M.; Ghrab, M.; Luedeling, E. Climate change threatens central Tunisian nut orchards. *Int. J. Biometeorol.* **2018**, *62*, 2245–2255. [[CrossRef](#)]
19. Benmoussa, H.; Luedeling, E.; Ghrab, M.; Ben Yahmed, J.; Ben Mimoun, M. Performance of pistachio (*Pistacia vera* L.) in warming Mediterranean orchards. *Environ. Exp. Bot.* **2017**, *140*, 76–85. [[CrossRef](#)]
20. Luedeling, E.; Girvetz, E.H.; Semenov, M.A.; Brown, P.H. Climate change affects winter chill for temperate fruit and nut trees. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e20155. [[CrossRef](#)]
21. Guerra, M.E.; Guerrero, B.I.; Casadomet, C.; Rodrigo, J. Self- (in) compatibility, S-RNase allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Sci. Hortic.* **2020**, *261*, 109022. [[CrossRef](#)]
22. Guo, L.; Dai, J.; Ranjitkar, S.; Yu, H.; Xu, J.; Luedeling, E. Chilling and heat requirements for flowering in temperate fruit trees. *Int. J. Biometeorol.* **2014**, *58*, 1195–1206. [[CrossRef](#)]
23. Brown, D.S.; Kotob, F.A. Growth of flower buds of apricot, peach, and pear during the rest period. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1957**, *69*, 158–164.
24. Bennett, J.P. Temperature and bud rest period. *Calif. Agric.* **1949**, *3*, 9–12.
25. Ashcroft, G.L.; Richardson, E.A.; Seeley, S.D. A statistical method of determining Chill Unit and Growing Degree Hour requirements for deciduous fruit trees. *HortScience* **1977**, *12*, 347–348.
26. Alonso, J.M.; Ansón, J.M.; Espiau, M.T.; Company, R.S. Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2005**, *130*, 308–318. [[CrossRef](#)]
27. Luedeling, E.; Brown, P.H.; Girvetz, E.H.; Semenov, M.A.; Brown, P.H.; Guo, L.; Dai, J.; Ranjitkar, S.; Yu, H.; Xu, J.; et al. Statistical identification of chilling and heat requirements for apricot flower buds in Beijing, China. *Sci. Hortic.* **2015**, *55*, 1–7.
28. Weinberger, J.H. Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1950**, *56*, 122–128.
29. Richardson, E.A.; Seeley, S.D.; Walker, D.R. A model for estimating the completion of rest for “Redhaven” and “Elberta” peach trees. *HortScience* **1974**, *9*, 331–332.
30. Fishman, S.; Erez, A.; Couvillon, G.A. The temperature dependence of dormancy breaking in plants: Mathematical analysis of a two-step model involving a cooperative transition. *J. Theor. Biol.* **1987**, *124*, 473–483. [[CrossRef](#)]
31. Ruiz, D.; Egea, J.; Salazar, J.A.; Campoy, J.A. Chilling and heat requirements of Japanese plum cultivars for flowering. *Sci. Hortic.* **2018**, *242*, 164–169. [[CrossRef](#)]
32. Tabuenca, M.C.; Herrero, J. Influencia de la temperatura en la época de floración de frutales. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1966**, *8*, 115–153.
33. Tabuenca, M.C.; Mut, M.; Herrero, J. The effect of temperature on flowering date in almond varieties. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1972**, *11*, 378–395.
34. Luedeling, E.; Kunz, A.; Blanke, M.M. Identification of chilling and heat requirements of cherry trees - a statistical approach. *Int. J. Biometeorol.* **2013**, *57*, 679–689. [[CrossRef](#)]
35. Benmoussa, H.; Ben Mimoun, M.; Ghrab, M.; Luedeling, E. Chilling and heat requirements for local and foreign almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars in a warm Mediterranean location over 30 years of observation. *Agric. For. Meteorol.* **2017**, *239*, 34–46. [[CrossRef](#)]
36. Díez-Palet, I.; Funes, I.; Savé, R.; Biel, C.; de Herralde, F.; Miarnau, X.; Vargas, F.; Àvila, G.; Carbó, J.; Aranda, X. Blooming under Mediterranean climate: Estimating cultivar-specific chill and heat requirements of almond and apple trees using a statistical approach. *Agronomy* **2019**, *9*, 760. [[CrossRef](#)]
37. Luedeling, E.; Brown, P.H. A global analysis of the comparability of winter chill models for fruit and nut trees. *Int. J. Biometeorol.* **2011**, *55*, 411–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Couvillon, G.A.; Erez, A. Effect of level and duration of high temperatures on test in the peach. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1985**, *110*, 579–581.
39. Erez, A.; Couvillon, G.A.; Hendershott, C.H. Quantitative chilling enhancement and negation in peach buds by high temperatures in a daily cycle. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1979**, *104*, 536–540.
40. Erez, A.; Couvillon, G.A. Characterization of the moderate temperature effect on peach bud rest. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1987**, *112*, 667–680.

41. de Reaumur, R.A.F. Observations du thermomètre, faites à Paris pendant l'année 1735, comparées avec celles qui ont été faites sous la ligne, à l'isle de France, à Alger et quelques unes de nos isles de l'Amérique. *Mem. Acad. Sci. Paris* **1735**.
42. Anderson, J.L.; Richardson, E.A.; Kesner, C.D. Validation of Chill Unit and flower bud phenology models for "Montmorency" sour cherry. *Acta Hortic.* **1986**, *184*, 71–78. [[CrossRef](#)]
43. Egea, J.; Ortega, E.; Martínez-Gómez, P.; Dicenta, F. Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* **2003**, *50*, 79–85. [[CrossRef](#)]
44. Hormaza, J.I.; Yamane, H.; Rodrigo, J. Apricot. In *Fruits and Nuts. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*; Kole, C., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007.
45. Campoy, J.A.; Ruiz, D.; Alderman, L.; Cook, N.; Egea, J. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). *Eur. J. Agron.* **2012**, *37*, 43–55. [[CrossRef](#)]
46. Guerriero, R.; Monteleone, P.; Viti, R. Evaluation of end of dormancy in several apricot cultivars according to different methodological approaches. *Acta Hortic.* **2006**, *701*, 99–103. [[CrossRef](#)]
47. Zhebentyayeva, T.; Ledbetter, C.; Burgos, L.; Llacer, G. Apricot. In *Fruit Breeding*; Badenes, M.L., Byrne, D., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2012.
48. Garcia, E.G.; Guerriero, R.; Monteleone, P. Apricot bud chilling and heat requirements in two different climatic areas: Murcia and the Tuscan Maremma. *Acta Hortic.* **1997**, *488*, 289–294. [[CrossRef](#)]
49. Viti, R.; Andreini, L.; Ruiz, D.; Egea, J.; Bartolini, S.; Iacona, C.; Campoy, J.A. Effect of climatic conditions on the overcoming of dormancy in apricot flower buds in two Mediterranean areas: Murcia (Spain) and Tuscany (Italy). *Sci. Hortic.* **2010**, *124*, 217–224. [[CrossRef](#)]
50. Ruiz, D.; Campoy, J.A.; Egea, J. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* **2007**, *61*, 254–263. [[CrossRef](#)]
51. Ruml, M.; Milatović, D.; Đurović, D.; Zec, G.; Jokić, M.; Radović, M. Chilling and heat requirements for flowering in apricot cultivars. *Acta Hortic.* **2018**, *1214*, 15–18. [[CrossRef](#)]
52. Gao, Z.; Zhuang, W.; Wang, L.; Shao, J.; Luo, X.; Cai, B.; Zhang, Z. Evaluation of chilling and heat requirements in Japanese apricot with three models. *HortScience* **2012**, *47*, 1826–1831. [[CrossRef](#)]
53. Zhuang, W.; Cai, B.; Gao, Z.; Zhang, Z. Determination of chilling and heat requirements of 69 Japanese apricot cultivars. *Eur. J. Agron.* **2016**, *74*, 68–74. [[CrossRef](#)]
54. Yamane, H.; Kashiwa, Y.; Kakehi, E.; Yonemori, K.; Mori, H.; Hayashi, K.; Iwamoto, K.; Tao, R.; Kataoka, I. Differential expression of dehydrin in flower buds of two Japanese apricot cultivars requiring different chilling requirements for bud break. *Tree Physiol.* **2006**, *26*, 1559–1563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yamane, H.; Wada, M.; Honda, C.; Matsuura, T.; Ikeda, Y.; Hirayama, T.; Osako, Y.; Gao-Takai, M.; Kojima, M.; Sakakibara, H.; et al. Overexpression of *Prunus DAM6* inhibits growth, represses bud break competency of dormant buds and delays bud outgrowth in apple plants. *PLoS ONE* **2019**, *14*, 1–24. [[CrossRef](#)]
56. Habu, T.; Yamane, H.; Sasaki, R.; Yano, K.; Fujii, H.; Shimizu, T.; Yamamoto, T.; Tao, R. Custom microarray analysis for transcript profiling of dormant vegetative buds of Japanese apricot during prolonged chilling exposure. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **2014**, *83*, 1–16. [[CrossRef](#)]
57. Sasaki, R.; Yamane, H.; Ooka, T.; Jotatsu, H.; Kitamura, Y.; Akagi, T.; Tao, R. Functional and expressional analyses of PmDAM genes associated with endodormancy in Japanese apricot. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 485–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Kitamura, Y.; Habu, T.; Yamane, H.; Nishiyama, S.; Kajita, K.; Sobue, T.; Kawai, T.; Numaguchi, K.; Nakazaki, T.; Kitajima, A.; et al. Identification of QTLs controlling chilling and heat requirements for dormancy release and bud break in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Tree Genet. Genomes* **2018**, *14*, 33. [[CrossRef](#)]
59. Esumi, T.; Kitamura, Y.; Hagihara, C.; Yamane, H.; Tao, R. Identification of a TFL1 ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sci. Hortic.* **2010**, *125*, 608–616. [[CrossRef](#)]
60. Tabuenca, M.C. Winter chilling requirements of apricot varieties. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1968**, *9*, 10–24.
61. Razavi, F.; Hajilou, J.; Tabatabaei, S.; Dadpour, M. Comparison of Chilling and heat requirement in some peach and apricot cultivars. *Res. Plant Biol.* **2011**, *1*, 40–47.
62. Valentini, N.; Ruffa, E.; Me, G.; Spanna, F.; Lovisetto, M. Chilling, thermal time and metabolic changes in five apricot varieties. *Acta Hortic.* **2006**, *701*, 147–150. [[CrossRef](#)]

63. Tabuenca, M.C. Chilling requirements of apricot, peach and pear varieties. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1964**, *7*, 113–132.
64. Tabuenca, M.C. Duración del periodo de reposo a distintas temp y evaluación de las necesidades de frío en albaricoquero y almendro. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1979**, *11*, 325–329.
65. Andreini, L.; Viti, R.; Bartolini, S.; Ruiz, D.; Egea, J.; Campoy, J.A. The relationship between xylem differentiation and dormancy evolution in apricot flower buds (*Prunus armeniaca* L.): The influence of environmental conditions in two Mediterranean areas. *Trees Struct. Funct.* **2012**, *26*, 919–928. [[CrossRef](#)]
66. Valentini, N.; Me, G.; Spanna, F.; Lovisetto, M. Chilling and heat requirement in apricot and peach varieties. *Acta Hort.* **2004**, *636*, 199–203. [[CrossRef](#)]
67. Bailey, C.H.; Cowgill, W.; Hough, L.F. Estimate of chilling requirements of apricot selections. *Acta Hort.* **1977**, *85*, 184–189. [[CrossRef](#)]
68. Barbosa, W.; Chagas, E.A.; Pommer, C.V.; Pio, R. Advances in low-chilling peach breeding at Instituto Agronômico, São Paulo State, Brazil. *Acta Hort.* **2010**, *872*, 147–150. [[CrossRef](#)]
69. Pensoa, G.; Citadin, I.; Scariotto, S.; Magalhães dos Santos, C.; Junior, A.; Bruckner, C.; Rodrigo, J. Development of peach flower buds under low winter chilling conditions. *Agronomy*. (In press).
70. Hancock, J.F.; Scorza, R.; Lobos, G.A. Peaches. In *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*; Hancock, J.F., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2008; pp. 265–298.
71. Erez, A.; Couvillon, G.A.; Hendershott, C.H. The effect of cycle length on chilling negation by high temperatures in dormant peach leaf buds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1979**, *104*, 573–576.
72. Erez, A.; Fishman, S.; Linsley-Noakes, G.C.; Allan, P. The dynamic model for rest completion in peach buds. *Acta Hort.* **1990**, 165–174. [[CrossRef](#)]
73. Li, Z.; Reighard, G.L.; Abbott, A.G.; Bielenberg, D.G. Dormancy-associated *MADS* genes from the *EVG* locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 3521–3530. [[CrossRef](#)]
74. Rodriguez-A, J.; Sherman, W.B.; Scorza, R.; Wisniewski, M.; Okie, W.R. “Evergreen” peach, its inheritance and dormant behavior. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1994**, *119*, 789–792. [[CrossRef](#)]
75. Navarro, A.C.; Gazquez, A.G.; Montiel, F.G.; Soto, M.L.; Cos, J. Estimación de las necesidades de frío de variedades de melocotón de forma plana (paraguayos). In Proceedings of the XIV Congreso Nacional De Ciencias Hortícolas, Orihuela, Spain, 3–5 June 2015.
76. Maulión, E.; Valentini, G.H.; Kovalevski, L.; Prunello, M.; Monti, L.L.; Daorden, M.E.; Quaglino, M.; Cervigni, G.D.L. Comparison of methods for estimation of chilling and heat requirements of nectarine and peach genotypes for flowering. *Sci. Hortic.* **2014**, *177*, 112–117. [[CrossRef](#)]
77. Gariglio, N.F.; Mendow, M.; Weber, M.E.; Favaro, M.A.; González-Rossia, D.E.; Pilatti, R.A. Phenology and reproductive traits of peaches and nectarines in Central-East Argentina. *Sci. Agric.* **2009**, *66*, 757–763. [[CrossRef](#)]
78. Kwon, J.H.; Jun, J.H.; Nam, E.Y.; Chung, K.H.; Hong, S.S.; Yoon, I.K.; Yun, S.K.; Kwack, Y.B. Profiling diversity and comparison of Eastern and Western cultivars of *Prunus persica* based on phenotypic traits. *Euphytica* **2015**, *206*, 401–415. [[CrossRef](#)]
79. Sawamura, Y.; Suesada, Y.; Sugiura, T.; Yaegaki, H. Chilling requirements and blooming dates of leading peach cultivars and a promising early maturing peach selection, Momo Tsukuba 127. *Hortic. J.* **2017**, *86*, 426–436. [[CrossRef](#)]
80. Leida, C.; Romeu, J.F.; García-Brunton, J.; Ríos, G.; Badenes, M.L. Gene expression analysis of chilling requirements for flower bud break in peach. *Plant Breed.* **2012**, *131*, 329–334. [[CrossRef](#)]
81. Milech, C.; Dini, M.; Scariotto, S.; Santos, J.; Herter, F.; Raseira, M. Chilling requirement of ten peach cultivars estimated by different models. *J. Exp. Agric. Int.* **2018**, *20*, 1–9. [[CrossRef](#)]
82. Citadin, I.; Raseira, M.C.B.; Herter, F.G.; Baptista Da Silva, J. Heat requirement for blooming and leafing in peach. *HortScience* **2001**, *36*, 305–307. [[CrossRef](#)]
83. Chun, J.A.; Kang, K.; Kim, D.; Han, H.H.; Son, I.C. Prediction of full blooming dates of five peach cultivars (*Prunus persica*) using temperature-based models. *Sci. Hortic.* **2017**, *220*, 250–258. [[CrossRef](#)]
84. Li, Y.; Fang, W.C.; Zhu, G.R.; Cao, K.; Chen, C.W.; Wang, X.W.; Wang, L.R. Accumulated chilling hours during endodormancy impact blooming and fruit shape development in peach (*Prunus persica* L.). *J. Integr. Agric.* **2016**, *15*, 1267–1274. [[CrossRef](#)]

85. Nishimoto, N.; Fujisaki, M. Chilling requirement of buds of some deciduous fruits grown in Southern Japan and the means to break dormancy. *Acta Hort.* **1995**, 153–160. [[CrossRef](#)]
86. Okie, W.R.; Blackburn, B. Increasing chilling reduces heat requirement for floral budbreak in peach. *HortScience* **2011**, *46*, 245–252. [[CrossRef](#)]
87. Ghrab, M.; Ben Mimoun, M.; Masmoudi, M.M.; Ben Mechlia, N. Chilling trends in a warm production area and their impact on flowering and fruiting of peach trees. *Sci. Hort.* **2014**, *178*, 87–94. [[CrossRef](#)]
88. Mounzer, O.H.; Conejero, W.; Nicola, E.; Abrisqueta, I.; Tapia, L.M.; Vera, J.; Abrisqueta, J.M.; Ruiz-sa, M.C. Growth pattern and phenological stages of early-maturing peach trees under a mediterranean climate. *HortScience* **2008**, *43*, 1813–1818. [[CrossRef](#)]
89. Carrillo-Navarro, A.; Guevara-Gazquez, A.; García-Montiel, F.; López-Ortiz, D.; Fuentes-Denia, A.; López-Soto, M.B.; Caballero-Hernández, C.M.; Ruiz-García, L.; Cos-Terrer, J. Caracterización fenotípica y molecular de variedades del programa de mejora de melocotonero del IMIDA. In Proceedings of the IX Congreso De Mejora Genética De Plantas, Murcia, Spain, 18–20 September 2018.
90. Gariglio, N.; González Rossia, D.E.; Mendow, M.; Reig, C.; Agusti, M. Effect of artificial chilling on the depth of endodormancy and vegetative and flower budbreak of peach and nectarine cultivars using excised shoots. *Sci. Hort.* **2006**, *108*, 371–377. [[CrossRef](#)]
91. Tabuenca, M.C. Winter chilling requirements of plum varieties. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1967**, *8*, 383–391.
92. Torrecillas, A.; Corell, M.; Galindo, A.; Pérez-López, D.; Memmi, H.; Rodríguez, P.; Cruz, Z.N.; Centeno, A.; Intrigliolo, D.S.; Moriana, A. Agronomical effects of deficit irrigation in apricot, peach, and plum trees. In *Water scarcity and sustainable agriculture in semiarid environment*; García-Tejero, I.F., Durán-Zuazo, V.H., Eds.; Elsevier-Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 87–109. ISBN 9780128131640.
93. Gharbi, O.; Wunsch, A.; Rodrigo, J. Characterization of accessions of “Reine Claude Verte” plum using *Prunus* SRR and phenotypic traits. *Sci. Hort.* **2014**, *169*, 57–65. [[CrossRef](#)]
94. Tabuenca, M.C. Winter chilling requirements of cherry varieties. *An. Estac. Exp. Aula Dei* **1983**, *15*, 661–667.
95. Fadón, E.; Rodrigo, J.; Herrero, M. Is there a specific stage to rest? Morphological changes in flower primordia in relation to endodormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Trees Struct. Funct.* **2018**, *32*, 1583–1594. [[CrossRef](#)]
96. Alburquerque, N.; García-Montiel, F.; Carrillo, A.; Burgos, L. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ. Exp. Bot.* **2008**, *64*, 162–170. [[CrossRef](#)]
97. Kuden, A.B.; Imrak, B.; Bayazit, S.; Çömlekçiöğlü, S.; Küden, A. Chilling requirements of cherries grown under subtropical conditions of Adana. *Middle E. J. Sci. Res.* **2012**, *12*, 1497–1501.
98. Campoy, J.A.; Darbyshire, R.; Dirlewanger, E.; Quero-garcía, J. Yield potential definition of the chilling requirement reveals likely underestimation of the risk of climate change on winter chill accumulation. *Int. J. Biometeorol.* **2019**, *63*, 183–192. [[CrossRef](#)]
99. Community Plant Variety Office (CPVO). Available online: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/cpvo_en (accessed on 15 November 2019).
100. Fadón, E.; Rodrigo, J. Combining histochemical staining and image analysis to quantify starch in the ovary primordia of sweet cherry during winter dormancy. *J. Vis. Exp.* **2019**, *145*, e58524. [[CrossRef](#)]
101. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Flower bud development and winter dormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Hort.* **2019**, *1231*, 1–6. [[CrossRef](#)]
102. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Anther and pollen development in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in relation to winter dormancy. *Protoplasma* **2019**, *256*, 733–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Fernandez, E.; Cuneo, I.F.; Luedeling, E.; Alvarado, L.; Farias, D.; Saa, S. Starch and hexoses concentrations as physiological markers in dormancy progression of sweet cherry twigs. *Trees Struct. Funct.* **2019**, *33*, 1187–1201. [[CrossRef](#)]
104. Guo, L.; Dai, J.; Wang, M.; Xu, J.; Luedeling, E. Responses of spring phenology in temperate zone trees to climate warming: A case study of apricot flowering in China. *Agric. For. Meteorol.* **2015**, *201*, 1–7. [[CrossRef](#)]
105. Dennis, F.G. Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *HortScience* **2003**, *38*, 347–350. [[CrossRef](#)]
106. Dennis, F.G. Dormancy—What we know (and Don’t Know). *HortScience* **1994**, *29*, 1249–1255. [[CrossRef](#)]
107. Wilson, L.T.; Barnett, W.W. Degree-days: An aid in crop and pest management. *Calif. Agric.* **1983**, *37*, 4–7.

108. Harrington, C.A.; Gould, P.J.; St.Clair, J.B. Modeling the effects of winter environment on dormancy release of Douglas-fir. *For. Ecol. Manag.* **2010**, *259*, 798–808. [[CrossRef](#)]
109. Pope, K.S.; Da Silva, D.; Brown, P.H.; DeJong, T.M. A biologically based approach to modeling spring phenology in temperate deciduous trees. *Agric. For. Meteorol.* **2014**, *198–199*, 15–23. [[CrossRef](#)]
110. Fernandez, E.; Luedeling, E.; Behrend, D.; Van de Vliet, S.; Kunz, A.; Fadón, E. Mild water stress in summer appears to affect dormancy in flower buds of apple advancing next spring phenology. *Agronomy* **2020**, *10*, 274. [[CrossRef](#)]
111. Herrera, S.; Lora, J.; Hormaza, J.; Rodrigo, J. Pollination management in stone fruit crops. In *Production Technology of Stone Fruits*; Ahmad Mir, S., Ahmad Shah, M., Maqbool Mir, M., Eds.; Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 2020.
112. Falavigna, V.d.S.; Guitton, B.; Costes, E.; Andrés, F. I want to (Bud) break free: The potential role of *DAM* and *SVP-like* genes in regulating dormancy cycle in temperate fruit trees. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Fadón, E.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Dormant flower buds actively accumulate starch over winter in sweet cherry. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Julian, C.; Herrero, M.; Rodrigo, J. Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *100*, 20–25. [[CrossRef](#)]
115. Julian, C.; Rodrigo, J.; Herrero, M. Stamen development and winter dormancy in apricot (*Prunus armeniaca*). *Ann. Bot.* **2011**, *108*, 617–625. [[CrossRef](#)]
116. Vimont, N.; Schwarzenberg, A.; Domijan, M.; Beauvieux, R.; Arkoun, M.; Yvin, J.-C.; Cortijo, S.; Wigge, P.A.; Dirlwanger, E.; Wenden, B. Hormonal balance finely tunes dormancy status in sweet cherry flower buds. *BioRxiv* **2019**, 423871.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO 4

Guerra, M. E., **Guerrero, B. I.**, Casadomet, C., Rodrigo, J. (2020). Self-(in)compatibility, *S-RNase* allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars. *Scientia Horticulturae*, 261, article 109022, doi:10.1016/j.scienta.2019.109022.



Self-(in)compatibility, *S-RNase* allele identification, and selection of pollinizers in new Japanese plum-type cultivars



M.E. Guerra^a, B.I. Guerrero^{b,c}, C. Casadomet^a, J. Rodrigo^{b,c,*}

^a Departamento de Hortofruticultura, CICYTEX-Centro de Investigación 'Finca La Orden-Valdesequera', A-V, km 372, 06187, Guadajira, Badajoz, Spain

^b Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain

^c Instituto Agroalimentario de Aragón - IAA2 (CITA-Universidad de Zaragoza), Calle Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Flowering time
Pollen viability
Pollen tube growth
Prunus salicina
Self-incompatibility
S-genotype

ABSTRACT

Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) exhibits gametophytic self-incompatibility, a prezygotic reproductive barrier that inhibits the growth of self-pollen tubes in the style, preventing self-fertilization. This reaction of incompatibility is genetically controlled by a multiallelic locus (*S*). When the *S* allele in the pollen grain is the same as either of the two *S* alleles expressed in the pistil, the pollen tube arrests its growth in the style preventing fertilization. Most Japanese plum-type cultivars are self-incompatible and need cross-pollination with compatible cultivars coincident at flowering. In the last years, an important renewal of plant material is taking place, with the introduction of a number of new cultivars from breeding programs of different countries whose objectives include self-compatibility. In South Africa, the ARC Infruitec/Nietvoorbij program has released a series of new cultivars that are being introduced in the main producing countries. However, their adaptability to other areas with different climatic conditions is unknown. In this work, the pollination requirements of twelve cultivars from ARC-Infruitec program is determined, analyzing their behavior in Extremadura (Spain), one of the main producing areas in Europe. For this purpose, for each cultivar, pollen viability has been evaluated through *in vitro* pollen germination, self(in)compatibility has been determined by the observation of pollen tube growth in self-pollinated flowers under the microscope, and *S*-alleles have been identified by PCR analysis. The time of flowering has been monitored over five years. The selection of adequate pollinizers were done by assigning the cultivars to their corresponding incompatibility group and comparing their time of flowering. These results can be extrapolated to other areas where these cultivars are newly introduced, although additional data of flowering dates may be required for each zone.

1. Introduction

Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) originated in China, where it was initially cultivated (Hedrick, 1911) and from where it was introduced to Japan (Faust and Surányi, 1999). In the late XIX century, it was introduced from Japan into the United States (Das et al., 2011; Karp, 2015). In California, *P. salicina* was intercrossed with different diploid plums such as *P. americana*, *P. hortulana*, *P. munsoniana* and *P. simonii* (Burbank, 1914; Okie and Hancock, 2008). A number of cultivars were selected from these hybridizations, and some of them were spread from California to temperate zones worldwide in the XX century. These hybrids were crossed with other local plums such as *P. angustifolia*, *P. besseyi* and *P. nigra* in the United States; and *P. cerasifera* in South Africa and Australia (Byrne, 1989; Okie and Weinberger, 1996;

Faust and Surányi, 1999; Okie, 2006; Okie and Hancock, 2008). Thus, nowadays the term “Japanese plum” does not correspond to a pure species, but to heterogeneous group of hybrids derived from interspecific crosses carried out of the original species *P. salicina* with up to 15 other *Prunus* species (Okie and Weinberger, 1996; Guerra and Rodrigo, 2015; Karp, 2015).

Japanese plum, like other *Prunus* spp., exhibits gametophytic self-incompatibility, a prezygotic reproductive barrier that inhibits the growth of self-pollen tubes in the style, preventing self-fertilization and promoting outcrossing (De Nettancourt, 2001). The reaction of incompatibility in this genus is genetically controlled by a multiallelic locus (*S*) that encodes two linked genes that determine the pistil and pollen specificity (Wu et al., 2013). The pistil determinant is a ribonuclease (*S-RNase*) secreted in the style that determines pistil allele

* Corresponding author at: Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza, Spain.

E-mail address: jrodrigo@aragon.es (J. Rodrigo).

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109022>

Received 1 August 2019; Received in revised form 5 November 2019; Accepted 8 November 2019

Available online 20 November 2019

0304-4238/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

specificity (Tao et al., 1997, 1999) and inhibits pollen tube growth by degrading pollen tube RNA (McCubbin and Kao, 2000). The pollen S-determinant is an F-box protein (SFB) specifically expressed in the pollen grain that determines pollen allele specificity (Ushijima et al., 2003). Thus, the haploid pollen grain has one S allele and the diploid pistil two S alleles. When the S allele from the pollen grain is different from the two S alleles of pistil, the pollen tube can grow through the style and reach the ovary, where can fertilize one of the two ovules. However, when the S allele in the pollen grain is the same as either of the two S alleles expressed in the pistil, the pollen tube arrests its growth in the style preventing fertilization (De Nettancourt, 2001). Most Japanese plum-type cultivars are self-incompatible and need cross-pollination. Thus, trees from other compatible cultivar coincident at flowering must be interplanted in the same orchard to ensure fruit set (Guerra and Rodrigo, 2015).

The introduction of a number of new Japanese plum-type cultivars from different breeding programs of different countries is resulting in an important renewal of plant material worldwide in the last decades. In South Africa, plum-breeding research began in the early century XXth at the Western Province Fruit Research Station, the forerunner of Agricultural Research Council (ARC). In 1945, the ARC Infruitec/Nietvoorbij plum-breeding program was initiated to develop plum cultivars better adapted to South African growing conditions (Hurter and Van Tonder, 1975). The main goals were large fruit size, resistance to bacterial spot and bacterial canker, and enlarging the ability to store fruit without internal breakdown (Okie and Hancock, 2008). The ARC Infruitec/Nietvoorbij program has released a number of Japanese plum cultivars including some of the most important cultivars worldwide such as ‘Songold’ and ‘Laetitia’. In the last years, this program has released a series of new cultivars that are being introduced in the main producing countries. However, their adaptability to other areas with different climatic conditions is unknown.

In this work, the pollination requirements of twelve cultivars from ARC-Infruitec breeding program have been analyzed, including cultivars released in the last years and some previous cultivars very cultivated worldwide. For this purpose, for each cultivar pollen viability has been evaluated through *in vitro* pollen germination, self(in)compatibility has been determined by the observation of pollen tube growth in self-pollinated flowers under the microscope, and S-alleles have been identified by PCR analysis. The time of flowering of the cultivars in Extremadura (Spain), one of the main plum producing areas in Europe (74,150 t in 6.806 ha) (MAPAMA, 2019) has been monitored over five years. The selection of adequate pollinizers were done by assigning the cultivars to their corresponding incompatibility group and comparing their time of flowering.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Twelve Japanese plum type cultivars from ARC-Infruitec breeding program were evaluated, including the traditional cultivars ‘Songold’ and ‘Laetitia’, released in 1972 and 1985 respectively, and the cultivars ‘Sapphire’ (1992), ‘Souvenir’ (1993), ‘Pioneer’ (1995), ‘Sundew’ (1999), ‘Sunkiss’ (1999), ‘Golden Kiss’ (2003), ‘African Delight’ (2008), ‘African Pride’ = ‘Afrigold’ (2009), ‘African Rose’ (2009), and ‘Ruby Star’ (2009) (Okie and Ramming, 1999; Culdevco, 2019). Three trees per cultivar were selected from a collection held at CICYTEX-La Orden in Guadajira, Extremadura (Spain) at 38°51' 9.6" N, -6°40'15.6" W and 214 m above sea level and from a commercial orchard representative of the main growing area of plum in Spain. The trees were grafted on ‘Mirabolan’ 29C (*Prunus cerasifera*) or ‘Mariana’ GF-81 (*Prunus cerasifera* X *Prunus munsoniana*).

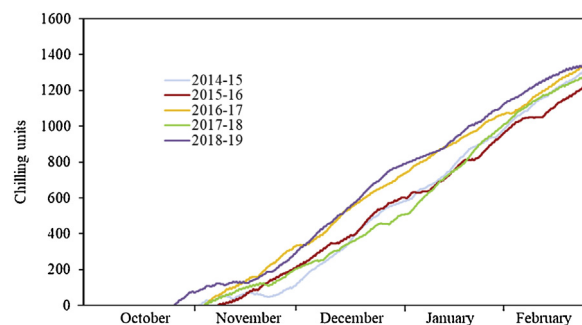


Fig. 1. Winter chilling accumulation (chilling units) in Guadajira, Extremadura (Spain) during five years.

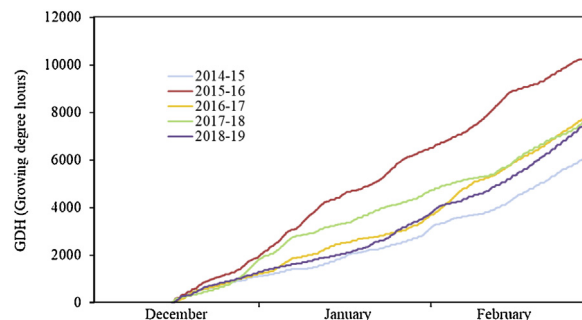


Fig. 2. Heat accumulation (growing degree hours) in Guadajira, Extremadura (Spain) during five years.

2.2. Flowering time

The phenology of eleven cultivars (‘African Delight’, ‘African Pride’, ‘African Rose’, ‘Golden Kiss’, ‘Laetitia’, ‘Ruby Star’, ‘Sapphire’, ‘Songold’, ‘Souvenir’, ‘Sundew’, ‘Sunkiss’) at flowering was monitored according to Baggioini (1952) over five consecutive years, from 2015 to 2019. The length of flowering period was established from the first to the last open flowers. Full bloom was considered when most flowers were at stage F (full bloom).

2.3. Quantification of chilling and heat temperatures

Temperature was recorded hourly at a meteorological station located in the experimental orchard. Winter chilling accumulation was calculated according to the ‘Utah Model’, which better fits in cooler areas of temperate zones (Dennis, 2003). This model proposes the sum of ‘chill-units’ (CUs), which establish a different chilling contribution for different temperature ranges (Richardson et al., 1974). CUs were calculated from the beginning of the autumn until spring. Heat requirements was estimated using the Growing Degree Hours (GDH) model developed by Richardson et al. (1974) by the calculation of the GDH accumulated from late winter until bloom.

2.4. Pollen viability

Pollen grains from each cultivar were germinated *in vitro*. Pollen grains were obtained from flowers collected at balloon stage, to which anthers were removed and placed on paper at room temperature during 24 h until anther dehiscence. Pollen grains were then sieved through a 0.26 mm mesh and used immediately. Pollen from each cultivar was scattered on a solidified germination medium consisting of 0.3 M sucrose, 0.6 mM Ca(NO₃)₂, 1.6 mM H₃BO₃ and 0.8 % of agar (Hormaza and Herrero, 1996) in polystyrene Petri dishes (60 × 10 mm). Pollen was germinated at 25 °C for 24 h, and then frozen at -20 °C to arrest pollen germination. Preparations were thawed during 24 h at 4 °C,

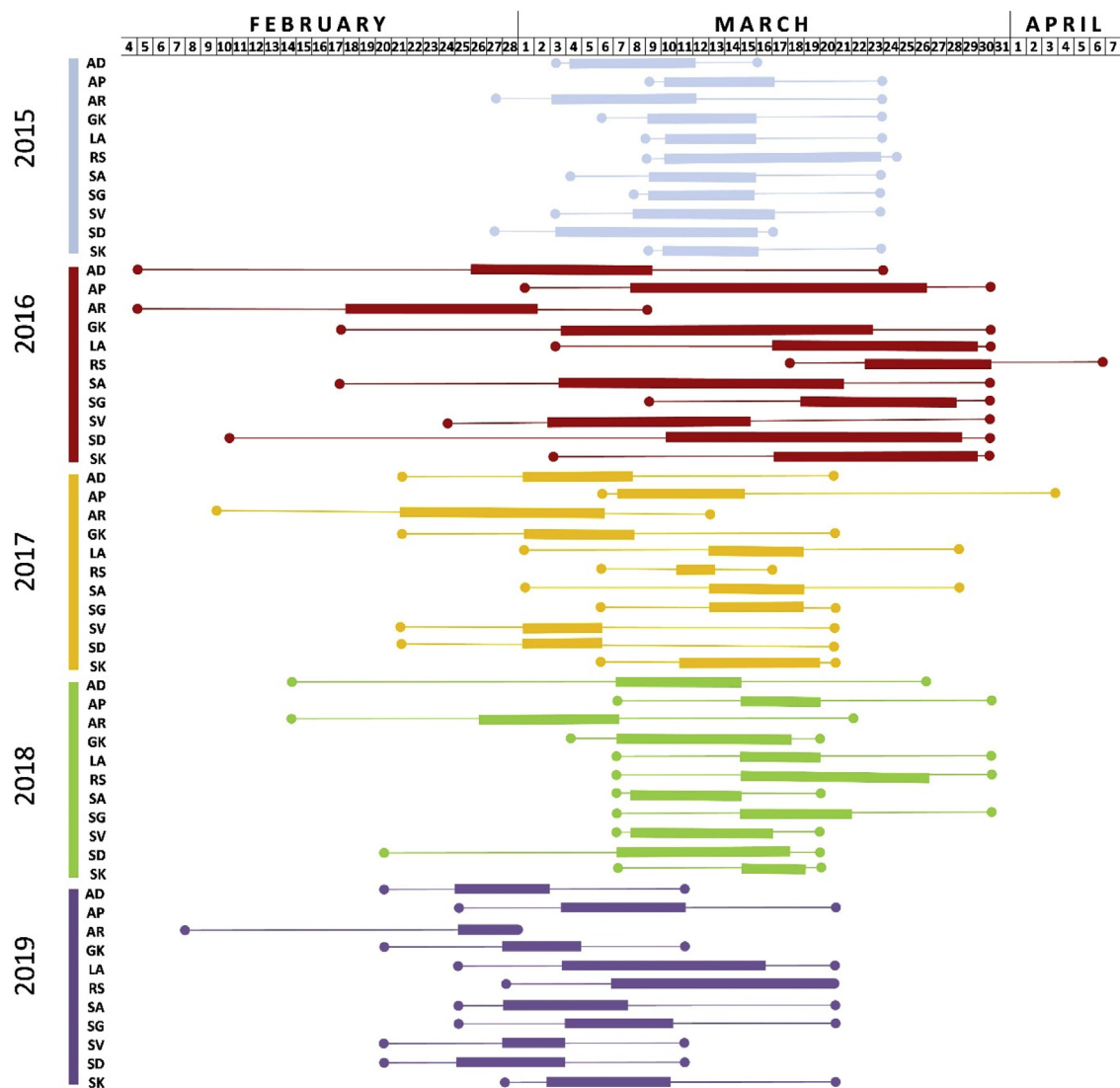


Fig. 3. Flowering time in eleven Japanese plum-type cultivars in Guadajira, Extremadura (Spain) over five years. Lines indicate the period from the first to the last open flowers, and rectangles indicate the days of full bloom in which most flowers were open. AD ('African Delight'), AP ('African Pride'), AR ('African Rose'), GK ('Golden Kiss'), LA ('Laetitia'), RS ('Ruby Star'), SA ('Sapphire'), SG ('Songold'), SV ('Souvenir'), SD ('Sundew'), SK ('Sunkiss').

stained with 1 % (v/v) aniline blue in 0.1 N K_3PO_4 to stain callose (Guerra et al., 2011) and observed under a Leica DM2500 fluorescence microscope (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with UV epifluorescence with a BP340-390 exciter filter and a LP 425 barrier filter. The percentage of viable pollen grains of each cultivar was estimated. A pollen grain was considered viable when its growing pollen tube was longer than the pollen grain diameter (Guerra et al., 2011). Viability was recorded in two Petri dishes for each cultivar by counting viable and non-viable pollen grains in three fields per plate, each field containing 100–200 pollen grains.

2.5. Pollination experiments

To establish self(in)compatibility, self-pollinations of the 12 cultivars were carried out in semi-*in vivo* culture of flowers in the laboratory, and pollen tube growth was observed under fluorescence microscopy. As control, a group of flowers of each cultivar were cross-pollinated with compatible pollen. For each cultivar, at least 300 flowers were collected at balloon [stage D of to Baggiolini (1952)] one day before anthesis (Guerra and Rodrigo, 2015). In the laboratory, 30 flowers for each self- and cross-pollination were emasculated by removing petals, sepals and stamens, and placed on florist foam in water at laboratory

temperature. Emasculated flowers were hand pollinated with the help of a paintbrush 24 h after emasculation with pollen previously obtained following the method described above. After 48–72 h after pollination, when the pollen tubes had enough time to reach the ovary (Herrera et al., 2018), the pistils were fixed in acetic acid: ethanol (95 % (1:3) during 24 h, and conserved at 4 °C in 75 % ethanol (Williams et al., 1999). For histochemical preparations, the fixed pistils were stained with 1 % (v/v) aniline blue in 0.1 N K_3PO_4 to stain callose (Guerra and Rodrigo, 2015). Pollen tube growth along the style was observed under the same microscope described above. The percentage of style traveled by the longest pollen tube and the mean number of pollen tubes at the base of the style were recorded on at least 10 pistils in each self- and cross-pollination, considering only those pistils with germinated pollen grains on the stigma (Guerra et al., 2010). Cultivars were considered as self-incompatible when pollen tube growth was arrested in the style in all pistils from self-pollinated flowers, and as self-compatible when more than 40 % of the pistils displayed at least one pollen tube reaching the base of the style (Guerra and Rodrigo, 2015).

2.6. S-RNase allele identification by PCR analysis

Genomic DNA from the 12 cultivars was isolated from young leaves

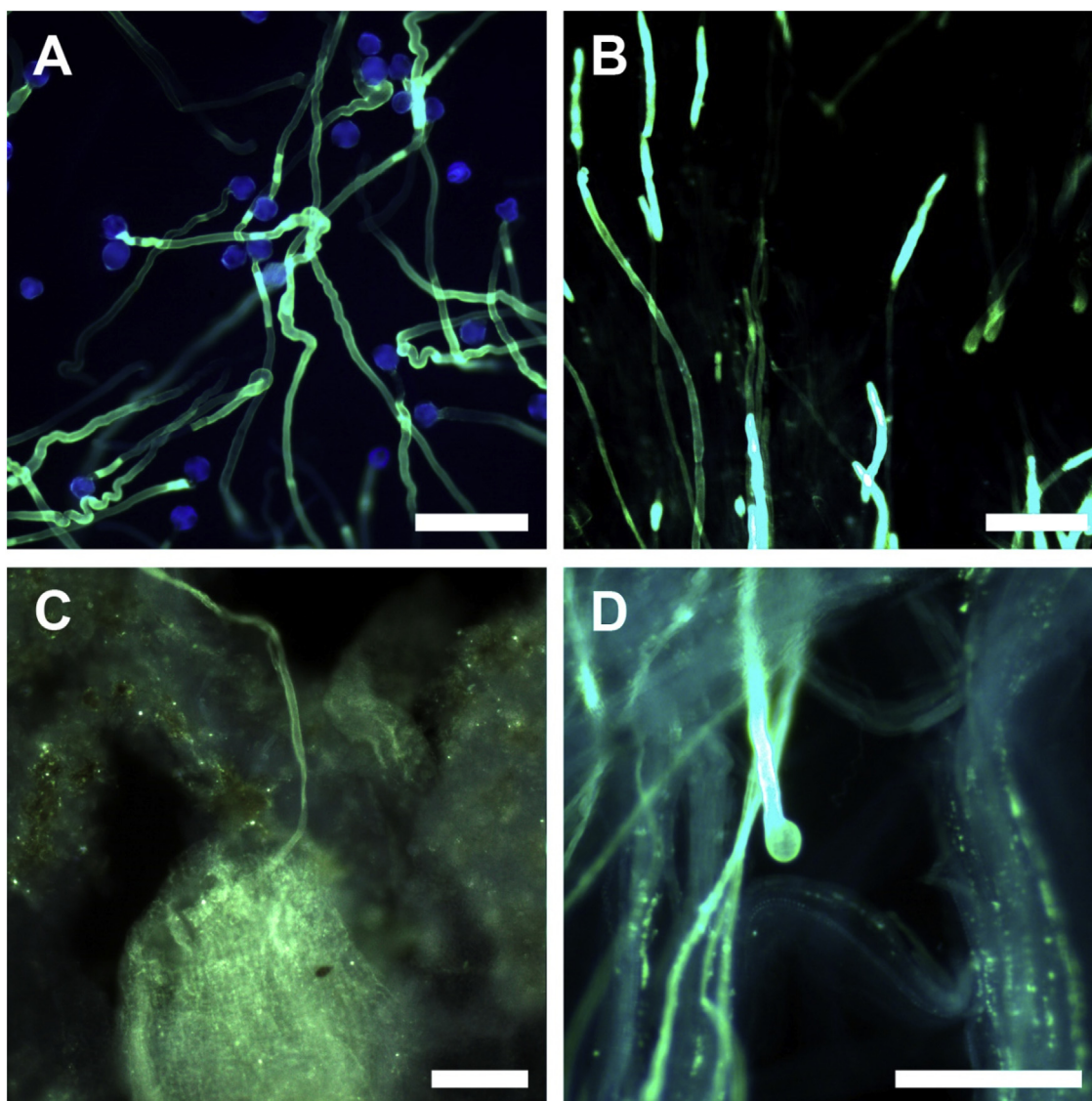


Fig. 4. Pollen germination and pollen tube growth in Japanese plum flowers. (A) Pollen grain germination *in vitro*, cultivar 'African Rose'. (B) Pollen tubes growing along the style from the stigma (above) to the ovary (below), cultivar 'African Rose'. (C) Pollen tubes reaching the ovary and penetrating one of the ovules, cultivar 'African Rose'. (D) Pollen tube arrested in the style, cultivar 'African Delight'. Scale bars = 50 μ m.

Table 1

Percentage of *in vitro* pollen germination of twelve Japanese plum-type cultivars. Mean \pm SE of six replicates.

Cultivar	Percentage of pollen germination <i>in vitro</i> ^x
'African Delight'	57.9 \pm 4.6 b
'African Pride'	51.1 \pm 7.5 b
'African Rose'	45.1 \pm 4.3 b
'Golden Kiss'	40.3 \pm 4.3 b
'Laetitia'	17.0 \pm 2.0 a
'Pioneer'	35.3 \pm 1.6 ab
'Ruby Star'	43.6 \pm 2.5 b
'Sapphire'	56.0 \pm 4.4 b
'Songold'	38.3 \pm 2.7 b
'Souvenir'	54.7 \pm 5.4 b
'Sundew'	39.8 \pm 6.2 b
'Sunkiss'	41.5 \pm 4.1 b
Sample size	72
F statistic	6,774
df	11
P	< 0.001

^x Different letters indicate significant differences ($P < 0.001$) using Duncan's multiple range test.

collected in spring using DNA extraction kits (Speedtools plant DNA Extraction kit, Biotools, Madrid, Spain). To analyze the quantity and quality of DNA, DNA concentrations were measured using a micro-volume spectrophotometer (NanoDrop 1000, ThermoScientific, Delaware, USA) and diluted at 10 ng/ μ l prior to PCR amplification.

Amplification reactions for the first intron region of the *S-RNase* gene were carried out with the primer pair combinations PaConsIF-PaConsIR2 (Guerra et al., 2012) and PruT2-SI32. PCR reactions were carried out in a volume of 20 μ l, in 20 mM Tris HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM Cl_2Mg , 0.1 mM of each dNTP, 0.2 μ M of each primer, 40 ng of genomic DNA and 0.45 U of *Taq* DNA polymerase (Dream Taq™ Green DNA Polymerase, ThermoFisher, Lithuania). The temperature profile used had an initial step of 3 min at 94 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C and 3 min at 72 °C, and a final step of 7 min at 72 °C. The amplified fragments obtained by PCR were firstly separated using agarose gel electrophoresis and DNA bands were visualized using the nucleic acid stain RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology Massachusetts, USA). Fragment size estimation was done using a size standard (2 kb DNA Ladder; Invitrogen, California, USA) and Quantity One 1-Analysis 4.6.2 (Bio-Rad, California, USA) software. When the size of the fragments could not be perfectly identified in

Table 2

Number of self-pollinated pistils examined, percentage of pollen grains germinated on stigma, percentage of pistils with pollen tubes at the upper third the style and at the base of the style, mean percentage of style traveled by the longest pollen tube, mean number of pollen tubes at the base of the style, and self-incompatibility (SI) or self-compatibility (SC) of twelve Japanese plum cultivars.

Cultivar	Number of pistils examined	Mean percentage of pollen grains germinated on stigma ^a	Pistils (%) with pollen tubes at the upper third of the style	Pistils (%) with pollen tubes at the base of style	Percentage of style traveled by the longest pollen tube	Mean number of pollen tubes at the base of style	SI/SC
'African Delight'	10	49.0 a	30 a	0 a	20 a	0 a	SI
'African Pride'	30	45.6 a	83 bc	0 a	80 a	0 a	SI
'Ruby Star'	14	54.1 ab	85 bc	0 a	50 a	0 a	SI
'Sapphire'	25	97.6 c	80 bc	0 a	50 a	0 a	SI
'Songold'	25	91.1 c	80 bc	0 a	50 a	0 a	SI
'Sundew'	31	78.6 bc	36 a	0 a	30 a	0 a	SI
'African Rose'	28	35.0 a	71 b	32 bc	100 b	1 ab	SC
'Laetitia'	31	95.5 c	95 c	48 bc	100 b	1.3 b	SC
'Pioneer'	12	28.8 a	83 bc	75 c	100 b	3 c	SC
'Souvenir'	15	34.0 a	53 ab	47 bc	100 b	1 ab	SC
'Golden Kiss'	17	31.2 a	82 bc	12 ab	100 b	1 ab	(?)
'Sunkiss'	25	79.6 bc	76 bc	8 ab	100 b	2 b	(?)
Sample size (N)		263	263	263	263	263	
df		11	11	11	11	11	
F statistic		25,321	–	–	12,725	19,159	
Pearson chi square		–	47,412	92,539	–	–	
p		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

^a Within a column, different letters indicate significant differences ($P < 0.001$) using ANOVA and Tukey-Kramer post hoc test or two-way contingency tables followed by Pearson's chi-square test of independence for categorical variables with Yates' correction for continuity or the Fisher's exact test as appropriate.

^y Unclear result.

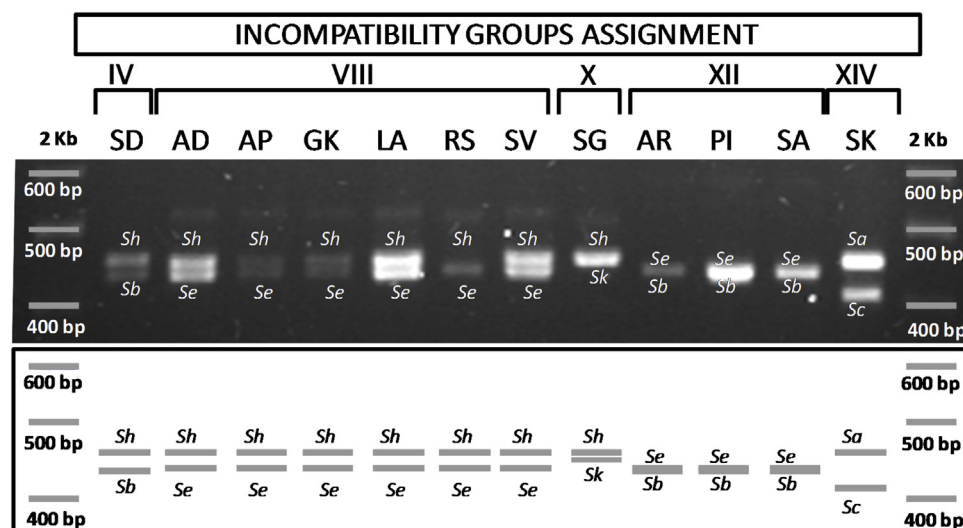


Fig. 5. PCR amplification using primer set PruT2-SI32 of twelve Japanese plum-type cultivars and below schematic representation: 'Sundew' (SD), 'African Delight' (AD), 'African Pride' (AP), 'Golden Kiss' (GK), 'Laetitia' (LA), 'Ruby Star' (RS), 'Souvenir' (SV), 'Songold' (SG), 'African Rose' (AR), 'Pioneer' (PI), 'Sapphire' (SA), 'Sunkiss' (SK). Size standard: 2 Kb.

agarose, the amplification was revealed using a genetic analyzer LI-COR SAGA 4300 (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA). To determine the *S*-genotypes, the sizes obtained were compared and classified according to Guerra and Rodrigo (2015).

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SPSS 21.0 statistical software (SPSS Inc., Chicago, USA). One-way analysis of variances (ANOVA) was performed to analyze pollen germination *in vitro* and on the stigma, and the percentage of style traveled by the longest pollen tube, in which percentage data were subjected to arcsine root square transformation, and the number of pollen tubes at the base of style. When ANOVA generated significant differences ($P < 0.001$), mean separations were determined by the Duncan's multiple range test for pollen germination *in vitro* (equal sample sizes) and Tukey-Kramer multiple comparison for germination on stigma and number of pollen tubes at the base of style (unequal sample sizes).

Pearson's chi-square test of independence for categorical variables was performed to analyze the percentage of pistils with pollen tubes at the upper third and at the base of the style. When Pearson's chi-square test of independence generated significant differences ($P < 0.001$), percentage separations were determined by chi-square test of independence in two-way contingency tables generated for each pairwise comparison, with Yates' correction for continuity. In those cases where expected cell frequencies were low, Fisher's exact test was implemented.

3. Results

3.1. Temperatures and flowering time

High differences in the weather conditions before flowering accumulation were found between years. Chilling accumulation during winter was quicker in some years (2016–2017, 2018–2019), which were considered as cold winters, while the other years, in which

Table 3

S-RNase-genotype of 12 cultivars analyzed in this study and 35 additional cultivars analyzed in previous studies. The self-incompatible cultivars are grouped in their corresponding Incompatibility Group (I.G). The self-compatible cultivars do not need pollinizers but may be used as pollinizers of those cultivars coincident at full bloom.

Incompatibility Group (S-genotype)	Cultivars analyzed in this study	Cultivars analyzed in previous studies	References
IV (<i>SbSh</i>)	'Sundew'	'Betty Ann' 'Black Gem' 'Blue Knight' 'Eldorado' 'Freedom' 'Friar' ^x 'Hiromi Red' 'Larry Ann' 'Nubiana' ^x 'Queen Ann' 'Scarlet' 'Songría 10' 'Autumn Pride'	Sapir et al., 2008 Sapir et al., 2008 Sapir et al., 2008 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Jun et al., 2007 Guerra et al., 2009 Sapir et al., 2008
VIII (<i>SeSh</i>)	'African Delight' 'African Pride' 'Ruby Star'	'Black Diamond' 'Black Gold' 'Black Late' 'Earliqueen' 'John W' 'Showtime' 'Elephant Heart'	Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009
X (<i>ShSk</i>)	'Songold' 'Golden Kiss' ^y	'Explorer' 'Friar' ^x 'Golden Plum' ^x 'Howard Sun' 'Redgold'	Jun et al., 2007 Halász et al., 2007 Guerra et al., 2009 Guerra et al., 2009 Zhang et al., 2007
XII (<i>SbSe</i>)	'Sapphire'	'Black Jewell' 'Durado' 'Flavor King' 'Freya' 'Murrieta' 'SGPR551' 'Sparkly' 'Tomar' 'Crimson Glo' 'White Queen'	Guerra et al., 2011 Sapir et al., 2008 Halász et al., 2007 Guerra et al., 2012 Sapir et al., 2008 Guerra et al., 2012 Guerra et al., 2012 Sapir et al., 2008 Guerra et al., 2009; Jun et al., 2007
XIV (<i>SaSc</i>)	'Sunkiss' ^y		
Self-compatible cultivars	'Laetitia' (<i>SeSh</i>) 'Souvenir' (<i>SeSh</i>) 'African Rose' (<i>SbSe</i>) 'Pioneer' (<i>SbSe</i>)		

^x Cultivars described with different S-genotype.

^y Cultivars whose self-(in)compatibility could not be established.

chilling accumulation was slower, were considered mild winters (Fig. 1). Differences in heat accumulation in the weeks prior to flowering were also found between years, with a year (2015–2016), with warmer temperatures in this period (Fig. 2).

Differences in weather conditions were reflected in a high variability in flowering time between years. Thus, all cultivars were coincident at flowering time in 2014–15, but high differences in the date of flowering were observed between cultivars in the other years, in which many cultivars were not coincident at full bloom. The length of flowering period also varied between cultivars and years, e.g. for 'African Delight' lasting from two weeks in 2015 and 2019 to more than 7 weeks in 2016 and 2018 (Fig. 3).

Pollen germination *in vitro* (Fig. 4A) showed that all the cultivars analyzed had viable pollen although showed significant differences between them, ranging from 17 % for 'Laetitia' to 57.9 % for 'African Delight' (Table 1).

To evaluate the self(in)compatibility, pollen tube growth along the style of self- and cross-pollinated flowers was observed under the microscope in all cultivars. Four cultivars ('African Rose', 'Laetitia', 'Pioneer' and 'Souvenir') behaved as self-compatible, displaying most pistils with pollen tubes growing along the style (Fig. 4B) and at least one pollen tube reaching the base of the style in more than 42 % of the self-pollinated pistils and in most pistils of all cross-pollinations (data not shown) (Fig. 4C). In six cultivars ('African Delight', 'African Pride',

'Ruby Star', 'Sapphire', 'Songold' and 'Sundew') pollen tubes arrested their growth in the upper half of the style, showing a terminal callose plug and end thickening (Fig. 4D), and did not show pollen tubes at the base of the style in any self-pollinated pistils, and were considered as self-incompatible (Table 2). The self-(in)compatibility of two cultivars ('Golden Kiss' and 'Sunkiss') could not be established because showed unclear results, with pollen tubes at the base of style in few pistils (12 % and 8 %).

PCR analyses using specific primers from conserved regions of the S-RNase locus were used to identify the SRNase alleles of the twelve cultivars analyzed (Fig. 5). The primer set PruT2-SI32 amplified fragments between 400 and 500 bp, which allowed the identification of six S-alleles (*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Se*, *Sh*, *Sk*) (Fig. 5). The self-incompatible cultivars were assigned to five different incompatibility groups according to their S-genotype (Table 3). The self-compatible cultivars ('African Rose', 'Pioneer', 'Souvenir' and 'Laetitia') do not need pollinizers but may be used as pollinizers of any cultivar coincident at full bloom.

The information obtained in this and in previous studies was incorporated in a genealogical tree (Fig. 6) that included parental genotypes and the cultivars released by South African ARC Infruitec/Niet-voorbij plum-breeding program (Hurter and Van Tonder, 1975). The analysis of the S alleles and the pedigree allowed the prediction of the S genotype of 'Gaviota'(*SbSd*), which was previously described partially as *Sb*- (Guerra et al., 2009), and the selection 10/65 as *Sb*-

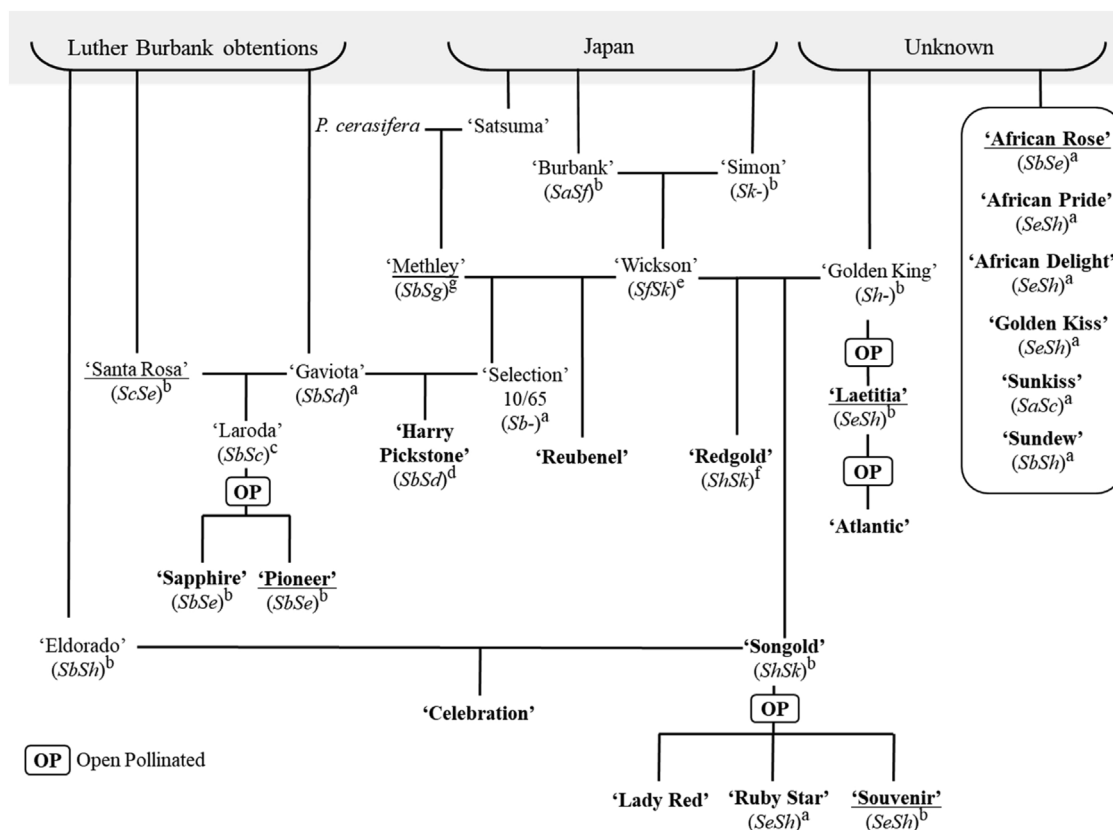


Fig. 6. Pedigree of some Japanese plum type cultivars used as parental genotypes and released by South African ARC Infruitec/Nietvoorbij plum-breeding program (in bold) (Howard, 1945; Hurter and Van Tonder, 1975; Okie and Ramming, 1999; Guerra et al., 2009). The underline indicates self-compatible cultivars. ^aS-genotype described in this work for the first time, ^bGuerra et al., 2009, ^cBeppu et al., 2002, ^dBeppu et al., 2003, ^eSapir et al., 2004, ^fZhang et al., 2007, ^gJun et al., 2007.

High differences between years were found in the percentage of coinciding days at full bloom between the self-incompatible and the other cultivars analyzed with at least one different S-allele (Table 4).

4. Discussion

Japanese plum, as other temperate fruit tree species, need a cultivar-specific amount of chilling during winter dormancy for proper flowering (Rohde and Bhalerao, 2007; Campoy et al., 2011; Kurokura et al., 2013). Once chilling requirements are fulfilled, a certain period under mild temperatures is required for growth resumption (heat requirements or forcing temperatures) (Perry, 1971; Luedeling, 2012; Fadón and Rodrigo, 2018). In the five years of study, the differences in temperature conditions during the winter were reflected in variations in the length of the flowering period and in a high variability in the flowering time for each cultivar. However, the behavior of cultivars was quite different. Some cultivars, such as 'African Delight' and 'African Rose', advanced their flowering in the years in which warm temperatures accumulated quicker in the weeks before flowering, indicating a great influence of the temperature in this period on their flowering time. However, this effect was not observed in other cultivars such as 'Songgold' and 'Laetitia', which flowered earlier in those years with an earlier winter chilling accumulation and, therefore, the flowering of these cultivars seemed to be more influenced by mid-winter temperatures. Although the chilling and heat requirements of Japanese plum have been little studied, high variability among cultivars has been reported, ranging between 200 and 1000 chill hours (CH, hours below 7 °C) (Okie and Weinberger, 1996; Okie and Ramming, 1999; Okie and Hancock, 2008; Gasic et al., 2016), and between 300 and 1000 chilling units (CU) (Ruiz et al., 2018). Possible differences in chilling

requirements between the analyzed cultivars could explain the different behavior observed herein, since low chilling cultivars would fulfill early their chilling requirements and then their flowering date would be more influenced by the mild temperatures in the weeks prior to flowering. On the other hand, the flowering time of high chilling cultivars would be more delayed in mild winter years. Although there are not available data of chilling requirements of most cultivars analyzed herein, the data available of 'Songgold' (987.5 CU) and 'Laetitia' (782.3 CU) (Ruiz et al., 2018), both with high chilling requirements, support this hypothesis. The wide range of chilling requirements may be related to the fact that Japanese plum cultivars do not correspond to a pure species, but they are hybrids derived from interspecific crosses carried out of the original species *P. salicina* with other *Prunus* species (Okie and Weinberger, 1996; Karp, 2015). Some cultivars have chilling requirements as high as cultivars of apricot (Ruiz et al., 2007; Campoy et al., 2012; Julian et al., 2014) or sweet cherry (Alburquerque et al., 2008; Fadón et al., 2018a, b, 2019), whose flowering time can be remarkably delayed when there has not been enough winter chilling accumulation. On the other hand, other cultivars are low-chilling as most almond (Egea et al., 2003; Alonso et al., 2005) or peach cultivars (Weinberger, 1950; Chen et al., 2016), which would fulfill their chilling requirements soon every winter in the conditions of the experiment, and their flowering time would be more dependent on the accumulation of warm temperatures after chilling fulfillment.

Self-pollination of the 12 cultivars analyzed in this work and subsequent observation of pollen tubes growth under the microscope showed that four behaved as self-compatible, and six as self-incompatible. Further work is required to clarify the self-(in)compatibility of the other two cultivars, since a very small number of pistils showed pollen tubes at the base of the style. The self-(in)compatibility of

Table 4
Percentage of coinciding days at full bloom.

Cultivar	Potential pollinizer ^x	Percentage of coinciding days at full bloom ^y				
		2015	2016	2017	2018	2019
'African Delight'	'African Rose'	100	42	71	0	67
	'Laetitia'	25	0	0	0	0
	'Sapphire'	38	42	0	100	50
	'Songold'	38	0	0	0	0
	'Souvenir'	50	50	71	88	50
	'Sundew'	100	0	71	100	100
'African Pride'	'Sunkiss'	33	0	0	0	0
	'African Rose'	29	0	0	0	0
	'Laetitia'	86	53	25	100	100
	'Sapphire'	71	68	38	0	50
	'Songold'	71	47	25	100	88
	'Souvenir'	100	32	0	40	0
'Golden Kiss'	'Sundew'	86	100	0	60	0
	'Sunkiss'	100	53	50	80	88
	'African Rose'	43	0	71	0	20
	'Laetitia'	86	24	0	27	20
	'Sapphire'	100	90	0	73	100
	'Songold'	100	19	0	27	20
'Ruby Star'	'Souvenir'	100	62	71	82	80
	'Sundew'	100	67	71	100	80
	'Sunkiss'	86	24	0	27	40
	'African Rose'	14	0	0	0	0
	'Laetitia'	43	88	0	42	67
	'Sapphire'	47	0	33	0	7
'Sapphire'	'Songold'	43	50	0	58	27
	'Souvenir'	50	0	0	17	0
	'Sundew'	43	63	0	25	0
	'Sunkiss'	43	88	100	33	27
	'African Delight'	43	26	0	100	38
	'African Pride'	71	68	43	0	50
'Songold'	'African Rose'	43	0	0	0	13
	'Golden Kiss'	100	100	0	100	63
	'Laetitia'	86	16	86	0	50
	'Ruby Star'	86	0	14	0	13
	'Songold'	100	16	86	0	50
	'Souvenir'	100	63	0	88	50
'Sundew'	'Sundew'	100	68	0	100	50
	'Sunkiss'	86	21	100	0	63
	'African Delight'	43	0	0	0	0
	'African Pride'	71	100	33	71	100
	'African Rose'	43	0	0	0	0
	'Golden Kiss'	100	44	0	43	14
'Sunkiss'	'Laetitia'	86	100	100	71	100
	'Ruby Star'	86	44	0	100	57
	'Sapphire'	100	33	100	0	57
	'Souvenir'	100	0	0	29	0
	'Sundew'	54	100	0	43	0
	'Sunkiss'	100	100	100	57	100
'African Delight'	'African Delight'	62	0	100	73	86
	'African Pride'	46	95	0	27	0
	'African Rose'	100	0	100	0	57
	'Golden Kiss'	50	71	100	100	57
	'Laetitia'	100	55	0	27	0
	'Ruby Star'	46	25	0	27	0
'African Pride'	'Sapphire'	54	65	0	73	57
	'Songold'	54	45	0	27	0
	'Souvenir'	62	30	100	82	57
	'Sunkiss'	46	55	0	27	14
	'African Delight'	43	0	0	0	0
	'African Pride'	86	77	44	100	88
'African Rose'	'African Rose'	29	0	0	0	0
	'Laetitia'	100	100	67	100	88
	'Ruby Star'	100	57	22	100	50
	'Sapphire'	100	36	78	0	63
	'Songold'	100	69	67	100	88
	'Souvenir'	100	0	0	50	13
'Sundew'	'Sundew'	100	93	0	75	13

^x Compatible cultivars with at least one different S-allele.

^y Coincidence at the beginning (in italic) and at the end of flowering (in bold).

10 cultivars ('African Delight', 'African Pride', 'African Rose', 'Golden Kiss', 'Pioneer', 'Ruby Star', 'Sapphire', 'Souvenir', 'Sundew' and 'Sunkiss') is reported herein for the first time. The results in the other two cultivars agree with previous reports for 'Laetitia' as self-compatible, and 'Songold' as self-incompatible (Guerra et al., 2009). The results also confirm the self-compatibility of 'Pioneer' assessed by bagging in field conditions (García-Gómez et al., 2018). Because most Japanese cultivars are self-incompatible and need cross-pollination, it is necessary knowing their pollination requirements to choose compatible pollinizers in the design of new commercial orchards as well as in the selection of parental genotypes in breeding programs. All the cultivars analyzed showed viable pollen, with differences in pollen germination between cultivars as it has been reported in other cultivars (Jia et al., 2008; Guerra et al., 2011).

PCR analysis allowed identifying the two *S*-alleles of the 12 cultivars analyzed, seven of them reported for the first time ['African Delight' (*SeSh*), 'African Pride' (*SeSh*), 'African Rose' (*SbSe*), 'Golden Kiss' (*ShSk*), 'Ruby Star' (*SeSh*), 'Sundew' (*SbSh*) and 'Sunkiss' (*SaSc*)]. The results allowed confirming the *S*-genotype of the other five cultivars ['Laetitia' (*SeSh*), 'Pioneer' (*SbSe*), 'Sapphire' (*SbSe*), 'Songold' (*ShSk*) and 'Souvenir' (*SeSh*)] and complete the genotype of 'Gaviota' (*SbSd*), partially described previously (Guerra et al., 2009).

In Japanese plum, 42 *S-RNase* alleles have been identified (Guerra and Rodrigo, 2015). However, only six *S*-alleles (*Sa*, *Sb*, *Sc*, *Se*, *Sh*, *Sk*) were identified in this work, showing a narrow genetic diversity between the cultivars analyzed, with some cultivars carrying the same *S*-alleles. The self-incompatible cultivars were allocated in five of the 26 Incompatibility Groups previously described according with their *S*-genotype (Guerra and Rodrigo, 2015).

The four cultivars showing self-compatibility [('African Rose' (*SbSe*), 'Laetitia' (*SeSh*), 'Pioneer' (*SbSe*) and 'Souvenir' (*SeSh*)] presented the *Se* allele, confirming previous results that associate *Se* with self-compatibility (Beppu et al., 2005; Guerra et al., 2009; Beppu et al., 2010; Guerra and Rodrigo, 2015). However, the other cultivars carrying *Se* [('African Delight' (*SeSh*), 'African Pride' (*SeSh*), 'Ruby Star' (*SeSh*) and 'Sapphire' (*SbSe*)] showed self-incompatibility, as reported in 'Black Diamond' (*SeSh*) and 'Royal Zee' (*ScSe*) (Sapir et al., 2008), 'Earliqueen' (*SeSh*) (Guerra et al., 2010), and 'Sweet August' (*ScSe*) (Guerra et al., 2011). Thus, further work of *S*-allele sequencing is required to elucidate if mutations or different alleles in the same size range are erroneously identified as a single allele *Se*. Thus, the characterization of the *S*-genotype in Japanese plum does not allow predicting accurately the diagnosis of self-compatibility in Japanese plum as in other *Prunus* (Yamane and Tao, 2009; Guerra and Rodrigo, 2015) for which is still necessary to monitor the behavior of pollen tubes in the pistil of self-pollinated flowers under the microscope.

5. Conclusions

The combination of two complementary approaches, the observation of pollen tube growth in self-pollinated pistils and the identification of *S-RNase* alleles, has resulted in valuable information to reveal the pollination requirements of all the cultivars analyzed. This information, combined with the flowering dates of each cultivar over five years, has allowed the appropriate selection of inter-compatible pollinizers for self-incompatible cultivars. The highly variable results of flowering dates found between years for each cultivar indicate that it could be necessary to interplant trees of at least two pollinizer cultivars, preferably combining some of earlier flowering with others of later flowering, since cultivars fully coincident at flowering in some years may not do so in others (e.g. 'Sapphire' and 'Golden Kiss', 'Sundew' and 'African Rose'). For instance, according the flowering data and the incompatibility relationships reported herein, adequate pollinizers for 'African Delight' could be 'Sundew' and 'Souvenir'. Although additional data of flowering dates may be required for each zone, these results can be extrapolated to areas where these cultivars are newly introduced.

The approach used in this work may be also valuable for other cultivars, species and situations, since new pollination failures may occur due to the release of new cultivars of unknown pollination requirements and the reduction of winter chilling caused by climate change in some years and zones.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This research was funded by Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (RFP2015-00015-00, RTA2017-00003-00); Gobierno de Aragón—European Social Fund, European Union (Grupo Consolidado A12_17R), Junta de Extremadura (Grupo de Investigación AGA001), and Fundación Biodiversidad. We gratefully acknowledge Árboles Frutales Orero S.L. for providing the plant material.

References

- Albuquerque, N., García-Montiel, F., Carrillo, A., Burgos, L., 2008. Chilling and heat requirements of sweet cherry cultivars and the relationship between altitude and the probability of satisfying the chill requirements. *Environ. Exp. Bot.* 64, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.003>.
- Alonso, J.M., Ansón, J.M., Espiau, M.T., Company, R.S., 2005. Determination of endodormancy break in almond flower buds by a correlation model using the average temperature of different day intervals and its application to the estimation of chill and heat requirements and blooming date. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130, 308–318. <https://doi.org/10.21273/jashs.130.3.308>.
- Baggiolini, M., 1952. Les stades repérés des arbres fruitiers à noyau. *Rev. Rom. d' Agric., Vitc., d'l Arboric* 8, 3–4.
- Beppu, K., Komatsu, N., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Tao, R., Kataoka, I., 2005. *Se*-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80, 760–764. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11512011>.
- Beppu, K., Syogase, K., Yamane, H., Tao, R., Kataoka, I., 2010. Inheritance of self-compatibility conferred by the *Se*-haplotype of Japanese plum and development of *Se-RNase* gene-specific PCR primers. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 85, 215–218. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512657>.
- Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., Tao, R., 2003. Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78, 315–318. <https://doi.org/10.1063/1.1654326>.
- Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., Tao, R., 2002. Diversity of *S-RNase* genes and *S*-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 77, 658–664. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511553>.
- Burbank, L., 1914. In: In: Whitson, J., John, R., Smith, H. (Eds.), *His Methods and Discoveries and Their Practical Application* Vol. V Luther Burbank Press, London.
- Byrne, D., 1989. Inbreeding, coancestry, and founding clones of Japanese-type plums of California and the Southeastern United States. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 114, 699–705.
- Campoy, J.A., Ruiz, D., Egea, J., 2011. Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review. *Sci. Hortic.* 130, 357–372. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.07.011>.
- Campoy, J.A., Ruiz, D., Alderman, L., Cook, N., Egea, J., 2012. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: an approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa). *Eur. J. Agron.* 37, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.10.004>.
- Chen, C., Okie, W.R., Beckman, T.G., 2016. Peach fruit set and buttoning after spring frost. *HortScience* 51, 816–821. <https://doi.org/10.21273/hortsci.51.7.816>.
- Culdevco, 2019. <https://www.culdevco.co.za/plums/> (accessed 27 July 2019).
- Das, B., Ahmed, N., Singh, P., 2011. *Prunus* diversity-early and present development: a review. *Int. J. Biodivers. Conserv.* 3, 721–734. <https://doi.org/10.5897/ijbcx11.003>.
- De Nettancourt, D., 2001. Incompatibility and incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer <https://doi.org/10.1007/978-3-662-04502-2>.
- Dennis, F.G., 2003. Problems in standardizing methods for evaluating the chilling requirements for the breaking of dormancy in buds of woody plants. *HortScience* 38, 347–350.
- Egea, J., Ortega, E., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., 2003. Chilling and heat requirements of almond cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* 50, 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00002-9).
- Fadón, E., Rodrigo, J., 2018. Unveiling winter dormancy through empirical experiments. *Environ. Exp. Bot.* 152, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.11.006>.
- Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J., 2018a. Dormant flower buds actively accumulate

- starch over winter in sweet cherry. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00171>.
- Fadón, E., Rodrigo, J., Herrero, M., 2018b. Is there a specific stage to rest? Morphological changes in flower primordia in relation to endodormancy in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Trees* 32, 1583–1594. <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1735-7>.
- Fadón, E., Herrero, M., Rodrigo, J., 2019. Anther and pollen development in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in relation to winter dormancy. *Protoplasma* 256, 733–744. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-01332-4>.
- Faust, M., Surányi, D., 1999. Origin and dissemination of plums. In: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*, pp. 139–186. <https://doi.org/10.1002/9780470650752.ch4>.
- García-Gómez, B., Razi, M., Salazar, J.A., Prudencio, A.S., Ruiz, D., Dondini, L., Martínez-Gómez, P., 2018. Comparative analysis of SSR markers developed in exon, intron, and intergenic regions and distributed in regions controlling fruit quality traits in *Prunus* species: genetic diversity and association studies. *Plant Mol. Biol. Rep.* 36, 23–35. <https://doi.org/10.1007/s11105-017-1058-7>.
- Gasic, K., Preece, J.E., Karp, D., 2016. Register of new fruit and nut cultivars. *HortScience* 51, 643–644.
- Guerra, M.E., Rodrigo, J., 2015. Japanese plum pollination: a review. *Sci. Hortic.* 197, 674–686. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.10.032>.
- Guerra, M.E., Rodrigo, J., López-Corrales, M., Wünsch, A., 2009. *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breed.* 128, 304–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2008.01552.x>.
- Guerra, M.E., López-Corrales, M., Wünsch, A., 2012. Improved *S*-genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum. *Euphytica* 186, 445–452. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0636-x>.
- Guerra, M.E., Wünsch, A., López-Corrales, M., Rodrigo, J., 2010. Flower emasculation as the cause for lack of fruit set in Japanese plum crosses. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 135, 556–562. <https://doi.org/10.21273/jashs.135.6.556>.
- Guerra, M.E., Wünsch, A., López-Corrales, M., Rodrigo, J., 2011. Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 136, 375–381. <https://doi.org/10.21273/jashs.136.6.375>.
- Halász, J., Hegedus, A., Szabó, Z., Nyéki, J., Pedryc, A., 2007. DNA-based *S*-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships. *HortScience* 42, 46–50.
- Hedrick, U.P., 1911. *The Plums of New York*. Department of Agriculture, Eighteen Annual Report Vol. 3 part II. J.B. Lyon Company State Printers, Albany.
- Herrera, S., Lora, J., Hormaza, J.I., Herrero, M., Rodrigo, J., 2018. Optimizing production in the new generation of apricot cultivars: Self-incompatibility, *S-RNase* allele identification, and incompatibility group assignment. *Front. Plant Sci.* 9, 527. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00527>.
- Hormaza, J.I., Herrero, M., 1996. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sex. Plant Reprod.* 9, 153–160. <https://doi.org/10.1007/BF02221395>.
- Howard, W.L., 1945. *Luther Burbank's Plant Contributions*. University of California, Berkeley, California).
- Hurter, N., Van Tonder, M.J., 1975. Plum breeding in South Africa. *Deciduous Fruit Grow.* 25, 37–39.
- Jia, H.J., He, F.J., Xiong, C.Z., Zhu, F.R., Okamoto, G., 2008. Influences of cross pollination on pollen tube growth and fruit set in Zuili plums (*Prunus salicina*). *J. Integr. Plant Biol.* 50, 203–209. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00382.x>.
- Julian, C., Herrero, M., Rodrigo, J., 2014. Anther meiosis time is related to winter cold temperatures in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Environ. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.002>.
- Jun, H., Kwon, J.H., Chung, K.H., 2007. Identification of self-incompatibility genotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) by polymerase chain reaction and cross-pollination tests. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 48, 228–234.
- Karp, D., 2015. Luther Burbank's plums. *HortScience* 50, 189–194.
- Kurokura, T., Mimida, N., Battey, N.H., Hytönen, T., 2013. The regulation of seasonal flowering in the Rosaceae. *J. Exp. Bot.* 64, 4131–4141.
- Luedeling, E., 2012. Climate change impacts on winter chill for temperate fruit and nut production: a review. *Sci. Hortic.* 144, 218–229. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.07.011>.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación), 2019. <https://www.mapa.gob.es/> (accessed 29 July 2019).
- McCubbin, A.G., Kao, T., 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interaction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 333–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.092356>.
- Okie, W.R., 2006. Introgression of *Prunus* species in plum. *New York Fruit Quart.* 14, 29–37.
- Okie, W.R., Hancock, J.F., 2008. Plums. In: Hancock, J.F. (Ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding*. Springer Science + Business Media B.V., pp. 337–357.
- Okie, W.R., Ramming, D.W., 1999. Plum breeding worldwide. *HortTechnology* 9, 162–176.
- Okie, W.R., Weinberger, J.H., 1996. Plums. In: Janick, J., Moore, N. (Eds.), *Fruit Breeding*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 559–601.
- Perry, T.O., 1971. Dormancy of trees in winter. *Science* 171, 29–36.
- Richardson, E., Seeley, S., Walker, D., 1974. A model for estimating the completion of rest for “Redhaven” and “Elberta” peach trees. *HortScience* 9, 331–332.
- Rohde, A., Bhalerao, R.P., 2007. Plant dormancy in the perennial context. *Trends Plant Sci.* 12, 217–223. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2007.03.012>.
- Ruiz, D., Campoy, J.A., Egea, J., 2007. Chilling and heat requirements of apricot cultivars for flowering. *Environ. Exp. Bot.* 61, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.06.008>.
- Ruiz, D., Egea, J., Salazar, J.A., Campoy, J.A., 2018. Chilling and heat requirements of Japanese plum cultivars for flowering. *Sci. Hortic.* 242, 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.07.014>.
- Sapir, G., Stern, R.A., Shafir, S., Goldway, M., 2008. *S-RNase* based *S*-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. *Sci. Hortic.* 118, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.004>.
- Sapir, G., Stern, R.A., Eisikowitch, D., Goldway, M., 2004. Cloning of four new Japanese plum *S*-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79, 223–227.
- Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T.M., Dandekar, M., Sugiura, A., 1997. Identification of stilar *RNases* associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol.* 38, 304–311. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029167>.
- Tao, R., Yamane, H., Sugiura, A., Murayama, H., Sassa, H., Mori, H., 1999. Molecular typing of *S*-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for *S-RNases* in sweet cherry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124, 224–233.
- 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, 771–781. <https://doi.org/10.1105/tpc.009290>.
- Weinberger, J.H., 1950. Chilling requirements of peach varieties. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 56, 122–128.
- Williams, J.H., Friedman, W.E., Arnold, M.L., 1999. Developmental selection within the angiosperm style: using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9201–9206. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9201>.
- Wu, Jun, Gu, C., Khan, M.A., Wu, Juyou, Gao, Y., Wang, C., Korban, S.S., Zhang, S., 2013. Molecular determinants and mechanisms of gametophytic self-incompatibility in fruit trees of Rosaceae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 32, 53–68. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715986>.
- Yamane, H., Tao, R., 2009. Molecular basis of self-(in)compatibility and current status of *S*-genotyping in Rosaceous fruit trees. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 78, 137–157. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.78.137>.
- Zhang, S.L., Huang, S.X., Kitashiba, H., Nishio, T., 2007. Identification of *S*-haplotype-specific *F-box* gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex. Plant Reprod.* 20, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00497-006-0037-1>.



Universidad
Zaragoza

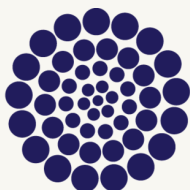


CENTRO DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS
DE EXTREMADURA



cita

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA
AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología