

UNIVERSITAT DE LLEIDA

TESI DOCTORAL

**GENÈTICA DE LA VARIABILITAT ISOENZIMÀTICA EN
L'AVELLANER: IDENTIFICACIÓ VARIETAL**

Tesi Doctoral presentada per: Mercè Rovira i Cambra

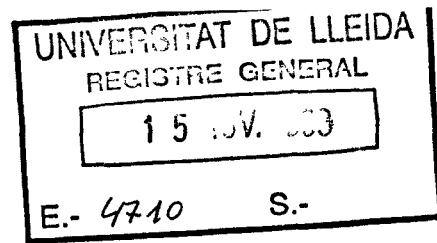
Lleida, octubre, 1993

(043) "1993" Rov

1600116297 X

ROVIRA CAMBRA, MERCE
Prod. Vegetal i C.F.
16/12/93
93/94 1

UNIVERSITAT DE LLEIDA



TESI DOCTORAL



**GENÈTICA DE LA VARIABILITAT ISOENZIMÀTICA EN
L'AVELLANER: IDENTIFICACIÓ VARIETAL**

Tesi Doctoral presentada per: Mercè Rovira i Cambra

Director: Dr. Pere Arús i Gorina

Tutor: Dr. Juan Antonio Martín-Sánchez

Lleida, octubre, 1993

0032-08150

A la meva mare i als meus germans
Al meu pare, que ens va estimar molt

Aquest treball s'ha dut a terme amb l'ajuda de moltes persones a les quals vull agrair sincerament el seu suport:

- Dr. Pere Arús i Gorina, cap del Departament de Genètica Vegetal de l'IRTA de Cabrils, director del treball, qui ha sabut transmetre'm el seu entusiasme per a la genètica. Els seus coneixements juntament amb la seva revisió acuradíssima de la feina realitzada, han fet possible aquesta Tesi.

- Dr. Juan Antonio Martín-Sánchez, Catedràtic de Genètica i Millora Vegetal de la Universitat de Lleida, tutor de la Tesi, qui sempre ha estat disposat a ajudar-me i m'ha aconsellat en l'elaboració de la memòria.

- M. Eric Germain, de la "Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière" de l'INRA de Bordeus, amb qui vaig tenir la sort de treballar-hi durant dos anys. Per oferir-me el seu material vegetal per als meus estudis, sense el qual, no hagués estat possible la realització d'aquest treball.

- Joan Tàsias, qui em va ajudar quan m'iniciava en el camp de la Recerca, per tota la confiança que em va mostrar al llarg dels anys. A ell com a un dels estudiosos de l'avellaner al nostre País, i a totes les persones que han col·laborat durant prop de 25 anys en l'obtenció de material vegetal per a la col·lecció de varietats d'avellaner existent al Centre de Mas Bové. És amb tot aquest material, que s'ha dut a terme aquest estudi.

- Tots els companys del Departament d'Arboricultura Mediterrània del Centre de Mas Bové, Francisco Vargas, Neus Aletà, Antònia Ninot, Joan Clavé, Joan Plana i Dr. Ignasi Batlle; pel seu suport mostrat durant tot el temps que hem estat treballant junts. Molt especialment, Dr. Joan Tous i Miguel Romero, per tots els consells i ajuda en la redacció final del treball, i Agustí Romero, per la seva paciència en mostrar-me les meravelles de la informàtica. Els treballadors del camp, que constantment tenen cura dels arbres a les parcel·les experimentals.

- Dr. Amadeu Francesch, per les hores que hem passat en disertacions de genètica (que tant li agraden), i Dra. Anna Pérez, per la bona predisposició que sempre ha mostrat en les explicacions pel que fa referència a temes de química i de tècniques de laboratori.

- Lluís Padrell, Ramon Magrinyà, Pilar Caraballo i Josep Ma. Gener, en qui he confiat i ens hem avingut. Amb ells, totes les persones de Mas Bové que m'han ofert la seva amistat; molt especialment Maria Francesch, per totes les estones passades juntes. Igualment, els meus amics, que lluny de Reus, s'han interessat pel meu treball.

- La meva família, pel suport que em dóna dia rera dia. Els meus oncles Albert i Montserrat, que els he tingut sempre al meu costat.

- Finalment, la direcció de l' Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), que ha facilitat la realització d'aquesta Tesi.

Aquesta memòria s'ha realitzat dins dels treballs d'investigació de l'IRTA sobre fruits secs, amb les col·laboracions del projecte de CICYT: "Aplicación de los marcadores isoenzimáticos a la mejora genética de frutos secos" (PA-86-0125), i de l'Acció Integrada "Hispano-Francesa" del Ministerio de Educacion y Ciencia: "Aplicación de marcadores isoenzimáticos a la mejora genética de avellano y nogal" (Conv. 90, Ref.HF-052).

GENÈTICA DE LA VARIABILITAT ISOENZIMÀTICA EN L'AVELLANER: IDENTIFICACIÓ VARIETAL

RESUM

L'estudi del polimorfisme dels isoenzims en 9 progènies d'avellaner (*Corylus avellana* L.), utilitzant extractes de fulla i de pol·len, ha permès establir la genètica de sis sistemes enzimàtics en aquesta espècie: aconitasa (ACO), 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD), fosfoglucoisomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), glutamat oxalacetat transaminasa (GOT) i malat deshidrogenasa (MDH).

La variació observada s'ha pogut explicar per l'existència de 10 gens d'herència Mendeliana: *Aco-1* (4 al·lels), *Aco-2* (3 al·lels), *6Pgd-2* (3 al·lels), *Pgi-2* (2 al·lels), *Pgi-3* (3 al·lels), *Pgm-1* (2 al·lels), *Pgm-2* (2 al·lels), *Pgm-3* (5 al·lels), *Got-2* (2 al·lels) i *Mdh-1* (2 al·lels). En dos d'aquests gens (*Pgm-1* i *Pgm-3*), s'ha detectat la presència d'un al·lel nul. La cosegregació no independent de set gens ha revelat l'existència de 4 grups de lligament: *Aco-2-Pgm-2*, *6Pgd-2-Pgm-2*, *Pgm-1-Pgm-3* i *Mdh-1-Pgi-2*, el que ha permès elaborar el primer mapa de lligament en l'avellaner.

La gran variabilitat mostrada per aquests sis sistemes enzimàtics en l'avellaner, ha fet possible la identificació de 74 varietats amb un genotip únic de les 119 estudiades. Els resultats obtinguts han confirmat sinonímies, i han permès la possible identificació d'algunes altres de noves.

Els paràmetres poblacionals analitzats situen l'avellaner amb uns nivells de variabilitat pròxims als d'altres espècies al·lògames. Els valors calculats de la identitat genètica, suggereixen que totes les varietats cultivades d'avellaner pertanyen a una sola espècie.

Í N D E X

	pàg.
1.- INTRODUCCIÓ.....	1
1.1- L'AVELLANER	2
1.1.1.- EL GÈNERE <i>CORYLUS</i>	2
1.1.2.- <i>CORYLUS AVELLANA</i> L.: BOTÀNICA I ECOLOGIA.....	4
1.1.2.1.- SITUACIÓ MUNDIAL	5
1.1.2.1.1.- <u>Turquia</u>	6
1.1.2.1.2.- <u>Itàlia</u>	6
1.1.2.1.3.- <u>Espanya</u>	6
1.1.2.1.4.- <u>Estats Units (EUA)</u>	7
1.1.2.1.5.- <u>Grècia</u>	7
1.1.2.1.6.- <u>França</u>	7
1.1.2.2.- SITUACIÓ A CATALUNYA.....	8
1.1.3.- MILLORA GENÈTICA	10
1.1.3.1.- SELECCIÓ CLONAL.....	11
1.1.3.2.- ENCREUAMENTS DIRIGITS	11
1.1.3.3.- SELECCIÓ DE LLAVORS DE PLANTES PROCEDENTS DE LLAVORS DE POL·LINITZACIÓ LLIURE.....	13
1.1.3.4.- MUTAGÈNESI INDUÏDA	13
1.2.- ELECTROFORESI D'ISOENZIMS	14
1.2.1.- PRINCIPIS BÀSICS	14
1.2.2.- INTERPRETACIÓ GENÈTICA DE LA VARIABILITAT ISOENZIMÀTICA.....	15
1.2.2.1.- ENZIM DIMORF I MONOMÈRIC	15
1.2.2.2.- ENZIM DIMORF I DIMÈRIC	16
1.2.2.3.- ENZIMS DIMORFS I DIMÈRICS AMB FORMACIÓ DE DÍMERS INTERGÈNICS.....	17
1.2.2.4.- LOCUS DIMORF AMB UN AL·LEL NUL	18

1.2.3.- APLICACIONS DELS ISOENZIMS A LA GENÈTICA I MILLORA DE PLANTES	18
1.2.3.1.- APLICACIONS A LA MILLORA.....	19
1.2.3.1.1.- <u>Estudis de genealogia</u>	19
1.2.3.1.2.- <u>Identificació i control del material vegetal:</u> <u>control de qualitat</u>	20
1.2.3.1.3.- <u>Marcatge de gens majors lligats a isoenzims</u>	20
1.2.3.1.4.- <u>Recuperació del genoma del parental recurrent en programes de retroencreuament</u>	20
1.2.3.2.- APLICACIONS A LA GENÈTICA DE POBLACIONS I EVOLUCIÓ	21
1.2.3.2.1.- <u>Estudi de la variabilitat en poblacions</u>	21
1.2.3.2.2.- <u>Comparacions a nivell d'espècie i de gènere</u>	22
1.2.3.2.3.- <u>Determinació del nivell de ploidia d'una espècie</u>	22
 1.3.- CONEIXEMENTS SOBRE ISOENZIMS EN EL GÈNERE <i>CORYLUS</i>	23
 1.4.- OBJECTIUS	25
 2.- MATERIAL I MÈTODES	26
2.1.- MATERIAL VEGETAL.....	27
2.1.1.- COL·LECCIÓ DE VARIETATS.....	27
2.1.2.- DESCENDÈNCIES.....	27
2.1.2.1.- REALITZACIÓ DELS ENCREUAMENTS.....	28
2.1.2.2.- GERMINACIÓ DE LES LLAVORS	29
2.2.- MÈTODES.....	34
2.2.1.- METODOLOGIA D'ELECTROFORESI	34
2.2.1.1.- APARELL D'ELECTROFORESI.....	35
2.2.1.2.- SOLUCIONS TAMPÓ DE GEL I ELÈCTRODE.....	35
2.2.1.3.- PREPARACIÓ DEL GEL.....	35
2.2.1.4.- EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES	36
2.2.1.4.1.- <u>Teixit utilitzat</u>	36

2.2.1.4.2.- <u>Tampó d'extracció</u>	36
2.2.1.5.- CÀRREGA DEL GEL	37
2.2.1.6.- CONDICIONS D'ELECTROFORESI	37
2.2.1.7.- TALLAT DEL GEL	38
2.2.1.8.- TINCIONS	39
2.2.1.8.1.- <u>Aconitasa (ACO)</u>	40
2.2.1.8.2.- <u>6-Fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD)</u>	41
2.2.1.8.3.- <u>Fosfoglucoisomerasa (PGI)</u>	42
2.2.1.8.4.- <u>Fosfoglucomutasa (PGM)</u>	43
2.2.1.8.5.- <u>Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT)</u>	44
2.2.1.8.6.- <u>Isocitrat deshidrogenasa (IDH)</u>	45
2.2.1.8.7.- <u>Malat deshidrogenasa (MDH)</u>	46
2.2.1.8.8.- <u>Xiquimat deshidrogenasa (SDH)</u>	47
2.2.1.9.- NOMENCLATURA	48
2.2.1.10.- CÀLCUL DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA	48
2.2.2.- ANÀLISI ESTADÍSTICA	49
2.2.3.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS	49
2.2.3.1.- PROPORCIÓ DE GENS POLIMÒRFICS (L)	50
2.2.3.2.- NOMBRE MIG D'AL·LELS PER LOCUS POLIMÒRFIC (A)	51
2.2.3.3.- HETEROZIGOSI OBSERVADA (Ho)	51
2.2.3.4.- HETEROZIGOSI ESPERADA (He)	51
2.2.3.5.- ÍNDEX DE FIXACIÓ DE WRIGHT (F).....	51
2.2.3.6.- IDENTITAT GENÈTICA (I)	52
2.2.3.7.- GENS AMB AL·LELS NULS	52
3.- RESULTATS	55
3.1.- GENÈTICA DELS ISOENZIMS	56
3.1.1.- ESTUDIS D'HERÈNCIA	56
3.1.1.1.- ACONITASA.....	56
3.1.1.2.- 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA	59
3.1.1.3.- FOSFOGLUCOISOMERASA	62
3.1.1.4.- FOSFOGLUCOMUTASA	65
3.1.1.5.- GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA	69

3.1.1.6.- ISOCITRAT DESHIDROGENASA	71
3.1.1.7.- MALAT DESHIDROGENASA.....	71
3.1.1.8.- XIQUMAT DESHIDROGENASA	73
3.1.1.9.- APROFUNDIMENT EN L'ESTUDI DELS SISTEMES PGI I GOT	73
3.1.2.- ANÀLISI DEL LLIGAMENT	77
3.2.- VARIACIÓ ISOENZIMÀTICA DE LES VARIETATS CULTIVADES DE C. AVELLANA	89
3.2.1.- CARACTERITZACIÓ VARIETAL	89
3.2.1.1.- CLASSIFICACIÓ DE LES VARIETATS BASADA EN	
ISOENZIMS.....	89
3.2.1.2.- GRUPS DE VARIETATS AMB EL MATEIX GENOTIP ISOENZIMÀTIC.....	91
3.2.1.3.- ESTUDI DE CLONS DE DIFERENTS VARIETATS.....	92
3.2.2.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS.....	92
3.2.2.1.- PROPORCIÓ DE GENS POLIMÒRFICS.....	93
3.2.2.2.- NOMBRE MIG D'AL·LELS PER LOCUS POLIMÒRFIC	93
3.2.2.3.- HETEROZIGOSI OBSERVADA	94
3.2.2.4.- HETEROZIGOSI ESPERADA	94
3.2.2.5.- ÍNDEX DE FIXACIÓ DE WRIGHT	94
3.2.2.6.- IDENTITAT GENÈTICA	94
4. DISCUSSIÓ.....	105
4.1.- GENÈTICA DELS ISOENZIMS	106
4.1.1.- ESTUDIS D'HERÈNCIA	106
4.1.1.1.- ACONITASA.....	107
4.1.1.2.- 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA	108
4.1.1.3.- FOSFOGLUCOISOMERASA.....	108
4.1.1.4.- FOSFOGLUCOMUTASA	109
4.1.1.5.- GLUTAMAT OXALACETAT TRANAMINASA	110
4.1.1.6.- MALAT DESHIDROGENASA.....	111

4.1.2.- ANÀLISI DEL LLIGAMENT	112
4.2.- VARIACIÓ ISOENZIMÀTICA DE LES VARIETATS CULTIVADES DE <i>C. AVELLANA</i>	126
4.2.1.- CARACTERITZACIÓ VARIETAL	126
4.2.1.1.- GRUPS DE VARIETATS AMB EL MATEIX GENOTIP ISOENZIMÀTIC	126
4.2.1.1.1.- <u>Confirmació d'algunes sinonímies</u>	127
4.2.1.1.2.- <u>Grups que inclouen varietats que podrien ser identificades com a sinonímes</u>	127
4.2.1.1.3.- <u>Grups de varietats amb el mateix genotip isoenzimàtic però amb caràcters morfològics clarament diferents</u> ...	129
4.2.1.2.- ESTUDI DE CLONS DE DIFERENTS VARIETATS	131
4.2.1.3.- APLICACIONS DELS RESULTATS OBTINGUTS	132
4.2.2.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS	133
5. CONCLUSIONS	139
6.- REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	142

1.-INTRODUCCIÓ

1.1.- L' AVELLANER

1.1.1.- EL GÈNERE *CORYLUS*

El gènere *Corylus* és d'origen molt antic. Trotter (1951) situa la seva aparició al període eocè de l'era quaternària. Segons Evreinoff (1958 i 1963), l'espècie *C. Mac-Quarri* Heer., considerada com l'espècie ancestral de *C. avellana* L., es trobava ja difosa a l'era terciària. Botànicament les plantes del gènere *Corylus* són Fanerògames que pertanyen a l'ordre de les Fagals i a la família de les Betulàcies. La seva àrea d'extensió es localitza a les regions de l'hemisferi nord. Els taxonomistes han descrit quinze d'espècies diferents (Krussman, 1986), amb un nombre de cromosomes d'11 o 14 depenent de les espècies (Duke, 1989). Per a *C. avellana* s'ha descrit un nombre somàtic de $2n=22$ (Salesses, 1973; Botta et al., 1986).

Entre les diferents espècies que configuren el gènere *Corylus* es poden destacar les següents pel seu interès:

- *C. avellana* L. - Es troba difosa per Europa, Àsia Menor, el Càucàs i els Urals. De forma natural creix en forma arbustiva (2-5 m d'alçada). És interessant pel seu consum de fruit, i a nivell econòmic és amb molta diferència l'espècie més important. Existeixen algunes varietats d'interès ornamental:

- *C. avellana* var. *contorta*: de branques sinuoses i amb un port plorós i dèbil.
- *C. avellana* var. *quercifolia*: arbre molt vigorós de port erecte, les fulles són molt segmentades.
- *C. avellana* var. *atropurpurea*: el color de les fulles i dels aments a l'hivern és de color vermellós.

- *C. pontica* C. Koch. - La seva àrea d'extensió es localitza a la costa del Mar Negre. Arbre d'uns 5 m d'alçada bastant rebrotant. Algunes de les varietats que serveixen per a la base de la producció Turca, se les ha considerat dins d'aquesta espècie (Bergougnoux et al., 1978).

- *C. maxima* Mill.- Es troba a la zona dels Balcans i d'Àsia Menor fins al Càucas. Creix en forma d'arbust (3-6 m d'alçada) i és molt rebrotant. La seva principal característica és que els fruits estan retinguts per involucre tubulars. El gra de forma allargada, és d'excel·lent qualitat gustativa. La varietat *C. maxima purpurea*, característica per les seves fulles vermelles es comercialitza com a planta ornamental, no obstant no és tan atractiva com la varietat atropurpurea de *C. avellana*.

- *C. americana* Marsh. i *C. cornuta* Marsh.- Es troben en estat silvestre a Amèrica del Nord en forma d'arbust. Són dues espècies molt resistents al fred. S'utilitzen com a genitors a les hibridacions (encreuats amb *C. avellana*) per obtenir varietats resistents al fred per al Canadà i EUA.

- *C. heterophylla* Fisch.- Estesa per Sibèria Oriental, a Rússia, Xina, Corea i Japó. Petit arbust poc vigorós (1-3 m d'alçada). Espècie molt rústica que s'adapta bé a sòls poc profunds i secs. Resisteix els grans freds d'hivern. És molt apreciada a Corea pel seu fruit, per consum i per extreure'n l'oli (Mehlenbacher, 1991). S'usa també com a patró de *C. avellana*. Aquesta espècie té molts caràcters desitjables, raó per la qual s'utilitza a Xina als programes de millora genètica (Weijian i Wanying, 1992).

- *C. sieboldiana* Bl. - Localitzada a l'Extrem Orient, principalment al Japó. És un arbust de 2-5 m d'alçada. Com *C. heterophylla*, resisteix els grans freds d'hivern, però és més exigent a les condicions climàtiques i del sòl. S'utilitza als programes de millora genètica de Corea i Xina (encreuaments amb *C. avellana*), (Mehlenbacher, 1991).

- *C. colurna* L.- Distribuïda per Turquia i la península Balcànica, arribant fins al Tíbet. El seu interès rau en el fet que és una espècie no rebrotant, encara que és molt sensible a l'asfíxia radicular. S'ha utilitzat com a peu de *C. avellana* als EUA però el seu maneig en viver és difícil observant-se també una certa reducció en la producció al cap d'uns 20 anys (Lagerstedt, 1974). Aquests desavantatges, fan que actualment no s'utilitzi directament *C. colurna* com a peu no rebrotant, però s'ha introduït als programes de millora genètica a la Universitat de Corvallis, Oregon (EUA) per a aquest fi, on s'han obtingut algunes seleccions interessants (Lagerstedt, 1990).

- *C. chinensis* Franch.- Localitzada a Xina Continental i Àsia Central. És interessant per a l'aprofitament de la seva fusta. Al ser un arbre poc rebrotant, s'utilitza també com *C. columna* als programes de millora, com a peu de *C. avellana*.

Els arbres de *C. columna* i *C. chinensis* adquireixen un gran desenvolupament arribant a alçades de 20-40 metres, a diferència de les altres espècies citades, de creixement natural en forma d'arbust (de 3-5 metres d'alçada) amb una clara tendència natural a l'emissió de rebrots.

Per bé que *C. avellana* és l'espècie on es suposa que pertanyen la majoria dels avellaners que es cultiven actualment als principals països productors, Trotter (1951), va proposar que genotips d'altres espècies com *C. maxima* i *C. pontica* o híbrids entre les tres espècies (amb *C. avellana*), podrien formar part del conjunt de varietats cultivades. D'altra banda, Mehlenbacher (1991), és del parer que tots els avellaners cultivats corresponen a una única espècie que seria *C. avellana*.

1.1.2.- *CORYLUS AVELLANA* L.: BOTÀNICA I ECOLOGIA

C. avellana creix de forma natural en forma d'arbust i en alguns llocs encara es cultiva d'aquesta manera, encara que els darrers anys s'estan incrementant les plantacions a un sol peu. Les varietats es propaguen tradicionalment per plançons obtinguts de les seves pròpies arrels. L'espècie és monoica i les flors masculines i femenines estan separades a l'arbre. L'avellaner és autoincompatible (Shuster, 1924), demostrant-se en diferents treballs que aquesta incompatibilitat és de tipus esporofític (Romisondo, 1978; Thompson, 1979; Germain et al., 1981; Rovira, 1989). La pol·linització és anemòfila, i degut a la incompatibilitat que presenta l'espècie, és necessària la presència d'arbres pol·linitzadors en les plantacions. La floració es produeix a l'hivern, però la fecundació no es realitza fins uns 4 mesos més tard (finals de maig-principis de juny), depenent de les varietats. Les avellanes creixen en infrutescències protegides per involucre d'una llargada variable. La collita, depenent dels països i de les varietats es produeix dins el període comprès entre finals d'agost- primers d'octubre.

Aquesta espècie cultivada sobre les seves pròpies arrels s'adapta a diferents tipus de sòls, amb diferències a nivell varietal. Requereix una profunditat mínima del sòl d'uns 70 cm. Prefereix terrenys fèrtils, permeables, amb un pH de 6 a 7.5 i amb un contingut de calç activa inferior al 8% (Tasias, 1975). No tolera els terrenys molt compactes ni la salinitat, ja provingui del sòl o de l'aigua de reg (Girona, 1987). L'avellaner tolera bé els freds d'hivern, és més, necessita unes determinades hores fred per desenvolupar la seva floració. Les flors masculines poden resistir fins a temperatures mínimes de -7°C i les femenines de -13°C. Contràriament les gelades de primavera el poden perjudicar a l'inici de la brotació (primers de març-mitjans abril) (Tous et al., 1987). És important també la temperatura durant els dies que segueixen la fecundació (finals de maig-principis de juny), temperatures màximes inferiors a 21°C i mínimes per sota dels 11°C, són una de les causes de l'aparició de fruits buits (Latorse, 1981). En ambients secs suporta malament la forta calor. Una humitat relativament alta, així com pluviometries de l'ordre de 1000 mm, regularment distribuïdes, principalment al període maig-juny, li són favorables. Durant tot el període vegetatiu (març-novembre), és important que no pateixi un dèficit hídric (Tous et al., 1992a). Degut a la seva pol·linització anemòfila, els vents suaus a l'època de la floració (gener-febrer) li són favorables (Tasias, 1975).

Tots aquests requeriments ecològics, condicionen que l'avellaner es trobi preferentment a zones protegides de forts vents d'hivern, sense gelades de primavera i amb un temps relativament temperat al principi d'estiu, amb una pluja regular durant aquesta estació i alta humitat durant el període vegetatiu. Aquestes condicions es troben principalment a zones amb un clima marítim a l'hemisferi nord entre 40^o i 50^o de latitud (Germain, 1990a).

1.1.2.1- SITUACIÓ MUNDIAL

Els principals països productors d'avellana, on el cultiu de l'avellaner hi és de forma tradicional són: Turquia (65% de la producció mundial), Itàlia (23%) i Espanya (5%). Altres països amb una producció més baixa són Estats Units (3%) i Grècia (2%). Un tercer grup el constitueix França, Iran i els països de la CEI (Comunitats d'Estats Independents), amb unes produccions força escasses (1%) (Vargas, 1989). Les característiques del conreu de l'avellaner als principals països productors, es detallen a continuació:

1.1.2.1.1.- Turquia

És el primer país productor d'avellana. Durant el període 1989-1992, la mitjana de la producció fou de 460.000 tones d'avellana en closca per any (Tarhan, 1993). El conreu es localitza a dues regions situades a la costa del Mar Negre. La de més extensió (350.000 ha) es troba al NE del país a regions muntanyoses (Trabzon, Giresun, Ordu i Samsun), és la zona tradicional de cultiu. Les plantacions més recents es localitzen a regions de més planúria a l'oest de l'anterior (Akçakoa, Bulu i Zonguldak), ocupant unes 100.000 ha. Les varietats turques més comercialitzades són "Tombul" (Giresun), "Palaz" (Ordu) i "Foça" (Trabzon). També "Sivri" i "Incekara" que s'utilitzen com a pol·linitzadors de "Tombul" (Ayfer, 1990). Les varietats "Tombul", "Sivri" i "Palaz", han estat classificades dins l'espècie *C. pontica* (Bergougnoux et al., 1978).

1.1.2.1.2.- Itàlia

El cultiu de l'avellaner es troba estès per tot el territori del país. La producció mitjana durant el període 1989-1992 fou de 125.000 tones d'avellana en closca per any (Tarhan, 1993). Les plantacions es concentren a les regions de Campània (Avellino i Salern) i del Laci (Viterbo), amb unes produccions que representen el 60% i el 26% respectivament, de la producció italiana. També es troben plantacions a la zona del Piemont (7%) (Alba i Cuneo) i a Sicília (6%) (Messina i Catània) (Monastra et al., 1990). A l'illa de Sicília l'avellaner està molt disseminat i en zones marginals, fet que està comportant el seu abandonament progressiu. Les varietats italianes són molt diverses, caracteritzant-se algunes d'elles per la seva bona qualitat del gra: "Tonda Gentile delle Langhe" (Piemont), "Tonda Romana" (Viterbo), "Mortarella", "Tonda di Giffoni" i "San Giovanni" (Campània), entre d'altres.

1.1.2.1.3.- Espanya

La producció espanyola durant els anys 1989-1992, fou de mitjana de 24.000 tones d'avellana en closca per any (Tarhan, 1993). Es pot dir que quasi bé tota la producció distribuïda per les 37.847 ha de l'Estat Espanyol es troba a Catalunya (95%). La resta es localitza principalment a Àlaba, Astúries, Castelló

i Terol. La situació de l'avellaner a Catalunya es tractarà amb més detall a l'apartat 1.1.2.2.

1.1.2.1.4.- Estats Units (EUA)

L'avellaner va ser introduït a aquest país pels europeus entre els anys 1885-1905. La producció durant el període 1989-1992 fou de mitjana de 19.000 tones d'avellana en closca per any (Tarhan, 1992), localitzada quasi en la seva totalitat a l'estat d'Oregon (el 99%) amb una superfície d'11.736 ha (USDA, 1993). La principal varietat és "Barcelona" que ocupa el 85% de les plantacions. La producció ha estat sempre pensada per a un mercat d'avellana grossa de taula. D'aquí que en els programes de millora iniciats al 1960, així com també en les seleccions locals, es tendeixi a una avellana gran. Fruit d'aquesta selecció han sorgit les varietats "Ennis" i "Butler". Darrerament el mercat de fruit de taula es troba saturat i és per aquest motiu que s'han iniciat plantacions de varietats de fruit petit per a la indústria com "Tonda Romana", "Tonda di Giffoni", "Negret", "Casina" i "Villamette" (Mehlenbacher i Miller, 1989).

1.1.2.1.5.- Grècia

La producció d'avellana d'aquest país fou durant el període 1989-1992 de 6.000 tones d'avellana en closca per any (Tarhan, 1993). Els avellaners es troben majoritàriament al nord del país, a Macedònia, ocupant una extensió de 7.000 ha. A part d'alguna varietat autòctona, les plantacions són de varietats turques i de "Negret" (espanyola) (Tsipourides, 1990).

1.1.2.1.6.- França

Es un país amb una petita producció, arribant a unes quantitats de 2.000 tones d'avellana en closca per any. Les primeres plantacions van iniciar-se als anys 1965-70 i actualment ocupen vora les 2.300 ha d'extensió. La majoria de les plantacions es troben localitzades al Sud-oest del país. Les varietats tradicionals que es conreen són "Fertile de Coutard" i "Segorbe". Darrerament s'han introduït les noves varietats "Ennis" i "Corabel" (nova selecció francesa),

amb els pol·linitzadors "Butler" i "Merveille de Bolwiler", de fruit gran per al consum de taula. Actualment s'està plantant "Pauetet", per a fruit d'indústria (Germain, 1990b i 1991).

1.1.2.2- SITUACIÓ A CATALUNYA

A Catalunya és on es concentra la producció d'avellaner dins l'Estat Espanyol. La quasi totalitat del cultiu es troba a la província de Tarragona (33.915 ha), amb molta menys quantitat es distribueix a les províncies de Girona (1.330 ha) i de Barcelona (845 ha) (Vargas, 1990). A la província de Tarragona, Trotter i Matons (1922), situen el conreu de l'avellaner ja al segle XII. Sembla ser que les primeres varietats cultivades vingueren de les zones silvestres de muntanya, l'establiment del cultiu data d'uns tres-cents anys. Les condicions de medi en les que es desenvolupa l'avellaner a moltes zones de Tarragona són força diferents a altres àrees de conreu de l'espècie (Tasias, 1975; Tous, 1991): escassa pluviometria (450-500 mm), estius força calorosos (temperatures fins a 35°C) i sòls calcaris, entre altres. El cultiu de l'avellaner sota aquestes condicions a Tarragona es troba, doncs, fora de la seva ecologia més idònia.

La majoria de les produccions s'obté de les 15.000 ha en regadiu (40% de les plantacions) que es troben principalment distribuïdes per les comarques del Baix Camp, l'Alt Camp i el Tarragonès. Durant els darrers anys, s'ha fet un gran esforç en l'ampliació de la zona de regadiu i s'ha produït també una millora de les tècniques del conreu. Contràriament, les plantacions de zones de muntanya (Priorat i Terra Alta) s'estan abandonant, la dificultat en emprar les adequades tècniques de conreu (mecanització) i la falta d'aigua, juntament amb els baixos preus de l'avellana dels darrers anys, en són les principals causes.

Cal remarcar la gran variabilitat del material vegetal existent a la província de Tarragona, posada de manifest en els diferents estudis realitzats per Trotter i Matons (1922), Riera (1962), Clavé (1976), Vidal-Barraquer i Tasias (1976). S'observa una diversificació clonal d'algunes de les varietats tradicionals, així com també la possible existència de diversos genotips dins de la mateixa denominació varietal, principalment en la varietat "Negret" (Tasias, 1975). En general l'estat sanitari del material vegetal és bastant defectuós, trobant-se a

les plantacions molts individus amb afeccions viròtiques. Actualment, i fruit dels treballs realitzats els darrers anys, es comença a disposar de material sanejat de les principals varietats conreades.

Les varietats més importants que constitueixen la base de la producció a Tarragona són: "Negret", "Gironell", "Pauetet", "Trenet", "Morell", "Grifoll", "Culplà" i "Ribet". "Negret" és, amb molta diferència encara, la varietat més estesa (79% de la superfície conreada) ja que comercialment és la que sempre s'ha cotitzat més i la que s'ha utilitzat per a la indústria. Als últims anys, en les plantacions, realitzades sempre en regadiu, les varietats més utilitzades han estat "Pauetet", "Negret" i "Gironell" (M.A.P.A.,1977 i 1987) (Taula 1).

TAULA 1 SUPERFÍCIES DE LES PRINCIPALS VARIETATS D'AVELLANER A LA PROVÍNCIA DE TARRAGONA

VARIETAT	1977		1987	
	ha	%	ha	%
Negret	24.967	78.50	23.137	78.60
Gironell	749	2.40	958	3.25
Pauetet	65	0.20	396	1.34
Altres varietats ¹	6.086	18.90	4.940	16.81
Total ¹	31.799	100.00	29.435	100.00

¹ L'any 1977 inclou 10 varietats i l'any 1987, 13

Recentment ha augmentat l'interès en plantar les varietats italianes "Tonda di Giffoni" i "Tonda Romana", degut a les seves bones característiques agronòmiques i comercials.

1.1.3.- MILLORA GENÈTICA

La diversitat genètica en l'avellaner europeu *C. avellana*, és fàcilment detectable amb la simple observació de les varietats dels diferents països i zones de conreu (Bergougnoux et al., 1978; Baratta i Occorso, 1979; Manzo i Tamponi, 1982; Garcia i Clavé, 1985; Ayfer et al., 1986). Fins i tot dins d'una mateixa àrea de cultiu s'aprecia força la variabilitat del material vegetal. L'estudi de les varietats revela notables diferències en el vigor i forma de l'arbre, mida i forma de fruit, tipus d'involucre i molts d'altres caràcters morfològics, sense comptar resistències a plagues, a afeccions viròtiques o les adaptacions a diferents zones climàtiques o de conreu. Una mostra d'aquesta variabilitat es pot apreciar en la quantitat de caràcters morfològics a tenir en compte a l'hora d'avaluar les varietats (Eynard, 1969; Thompson et al., 1978; UPOV, 1979). Són interessants també les diferències que s'han observat en la composició química del gra de les diferents varietats (Fregoni i Marcazzan, 1965; Roversi, 1976; Soliva et al., 1983).

El fet que les varietats d'avellaner s'hagin originat a partir de plantes procedents de llavor, juntament amb la marcada autoincompatibilitat de l'espècie, el que comporta una pol·linització encreuada forçosa, podrien considerar-se les principals causes de la variabilitat existent. Gràcies a aquesta riquesa genètica es pot pensar que existeix una base suficient per a una resposta altament positiva de l'espècie a la selecció per a molts dels caràcters d'interès en la millora genètica.

Es realitzen programes de millora genètica a diferents països, utilitzant diferents mètodes com la selecció clonal, la selecció de descendències d'encreuaments controlats, la selecció de plantes procedents de llavors de pol·linització lliure o la mutagènesi induïda. Lagerstedt (1975) fa una revisió dels treballs realitzats als diferents Centres d'Investigació, i exposa els caràcters més importants a tenir present als programes de millora de l'avellaner, que entre altres són: bona producció (precocitat, absència de fruits buits), alta qualitat del gra (pelat, torrat, bon gust, atractiu, bon calibre, alt rendiment en gra, etc.), rusticitat i resistència de l'arbre a plagues i a malalties.

1.1.3.1.- SELECCIÓ CLONAL

Els programes de selecció clonal es desenvolupen als països de cultiu tradicional de l'avellaner on es troba encara força material genètic d'interès. A Itàlia s'han realitzat seleccions de "Tonda di Giffoni" a la regió de Campània (Limongelli, 1983, 1987 i 1989), i de "Tonda Gentile delle Langhe" a la zona del Piemont (Romisondo et al., 1979 i 1983b). Al nostre país s'han seleccionat clons de "Negret", "Gironell" (Mena, 1987) i, recentment, de "Pauetet".

1.1.3.2.- ENCREUAMENTS DIRIGITS

Els programes de millora per encreuaments dirigits, varen començar fa més de 20 anys a les Universitats italianes de Torí (Romisondo, 1967; Romisondo et al., 1976; Me et al., 1979), de Perusa (Tombesi i Preziosi, 1987) i de Pàdua (Ponchia i Ferroli, 1988); a la Universitat de Corvallis a Oregon (EUA) (Thompson, 1974 i 1976; Mehlenbacher, 1991), a l'INRA de Bordeus a França (Germain, 1986) i al Centre de Mas Bové-IRTA de Reus a Espanya (Rovira, 1983; Mena, 1987). Darrerament també se'n realitzen a Giresun a Turquia (Mehlenbacher, 1991). Fins al moment, el programa de Torí a Itàlia ha produït més de 2.000 plantes fruit de l'encreuament entre 40 parelles diferents de parentals, havent-se obtingut algunes seleccions interessants (Romisondo et al., 1987). El programa de la Universitat d'Oregon ha produït 40.000 plantes; d'aquest programa s'ha obtingut una nova varietat "Villamete" (Mehlenbacher et al., 1991). Del programa de l'INRA de Bordeus de 100 encreuaments diferents amb unes 4.000 plantes en total, s'ha obtingut la varietat "Corabel" que ha estat enregistrada recentment (Germain, com. per.). Finalment el programa de Mas Bové a Reus, de 46 encreuaments diferents realitzats s'han obtingut unes 3.000 plantes, conservant-se alguns individus d'interès (Mena, 1987). Les seleccions més interessants de tots aquests programes s'estan estudiant a nivell experimental en col·leccions a varis Centres d'Investigació.

Els coneixements que es tenen de genètica i de transmissió dels caràcters en l'avellaner, no són gaire extensos si es comparen amb els d'altres fruiters (Janick i Moore, 1975). Romisondo et al. (1976) estudia la transmissió de diferents caràcters (vigor de l'arbre, quantitat d'aments, rendiment en gra, fibrositat i forma de l'avellana, entre altres). Les dades de Thompson (1977a),

revelen una relativa alta correlació entre la mitjana de les descendències i les dels parentals per a alguns caràcters estudiats: rendiment en gra ($r=0.92$), pes del gra ($r=0.84$) o pelat del gra ($r=0.89$), per exemple. El que indica que aquests caràcters estan controlats predominantment per gens amb una acció gènica aditiva. Respecte al pelat del gra, Mehlenbacher i Smith (1988), troben un valor de regressió molt més baix ($r=0.48$).

S'exposen a continuació alguns exemples dels estudis d'herència realitzats en l'avellaner:

- Resistència a l'àcar de les gemes *Phytoptus avellanae* L. ("Badoc").

Aquest àcar ataca els borrons de l'avellaner, causant una disminució considerable de la producció. En les diferents varietats s'ha observat resistència genètica així com també diferents graus de sensibilitat. És interessant mantenir el caràcter de resistència en els programes de millora. Es constata que la sensibilitat a *P. avellanae* és altament heredable i sembla ser que està controlada per molts gens amb acció predominantment aditiva (Thompson, 1977b).

- Deficiència de clorofil·la.

S'ha detectat una deficiència de clorofil·la que es manifesta en l'esgrogueïment de les fulles. Després de l'estudi genètic, s'atribueix aquest fet a un al·lel recessiu d'un gen que està en heterozigosi en algunes varietats. Al moment d'encreuar dues d'aquestes varietats, apareix 1/4 de la descendència amb aquesta característica. Els arbres acaben morint. S'ha intentat associar aquest caràcter amb el que presenta una varietat d'avellaner ornamental de fulles grogues (*C. avellana* var. *aurea*), però no s'ha trobat cap mena de relació, ja que aquests dos caràcters estan determinats per gens diferents i s'hereden independentment (Mehlenbacher i Thompson, 1991).

- Lligament entre el locus d'incompatibilitat i la pigmentació vermella.

Els avellaners amb fulla vermella, també expressen aquesta pigmentació als involucre i als aments a l'hivern. Tenen valor ornamental, com a patrons i com a marcadors genètics en algunes investigacions. Existeixen dos loci A i C que determinen aquest caràcter. Ambdós han de tenir l'al·lel dominant per produir pigmentació vermella. S'ha vist que l'al·lel S d'incompatibilitat es troba estretament lligat al locus A i aquest al locus C (Thompson, 1985). Un

l·ligament semblant, "pigmentació vermella- S" s'ha trobat també als gèneres *Nicotiana* (Brieger i Mangelsdorf, 1926) i *Brassica* (Sampson, 1967; Ockendon, 1977 i 1980).

1.1.3.3.- SELECCIÓ DE PLANTES PROCEDENTS DE LLAVORS DE POL·LINITZACIÓ LLIURE

D'aquesta selecció de plantes, han sorgit la majoria de les varietats d'Oregon als EUA ("Ennis" i "Butler", entre altres) (Lagerstedt, 1980). També a Itàlia s'han obtingut algunes seleccions d'interès (Paglietta, 1976).

1.1.3.4.- MUTAGÈNESI INDUÏDA

En aquest camp es varen iniciar els treballs a la Universitat d'Oregon als EUA (Lagerstedt i Hubert, 1976). Les radiacions, provocaven un retard en el creixement i una distorsió de les fulles, encara que aquestes alteracions vegetatives no eren permanents, ja que no es varen observar al següent any de creixement. Als treballs realitzats a la Universitat de Torí a Itàlia (Romisondo et al., 1983a), també es varen notar semblants alteracions al material irradiat. Per tant, amb les mutacions induïdes en l'avellaner, fins ara, no s'han obtingut resultats d'interès.

1.2.- ELECTROFORESI D'ISOENZIMS

1.2.1.- PRINCIPIS BÀSICS

Market i Moller (1959) van establir el terme **isoenzim** per descriure les diferents formes moleculars d'enzims amb la mateixa especificitat de substrate. El mètode generalment utilitzat per a la identificació d'isoenzims és l'electroforesi, que és el procés de separació de molècules carregades elèctricament quan se les sotmet a un camp elèctric. Dues de les contribucions més importants per a l'estudi dels isoenzims van ser: primer, la millora en la tècnica de l'electroforesi que va suposar l'ús del midó com a medi de suport (Smithies, 1955); i segon, el desenvolupament de tincions específiques que permetien visualitzar els isoenzims directament sobre els gels (Hunter i Markert, 1957).

El resultat de l'electroforesi d'isoenzims és un patró de bandes colorejades al gel característic del genotip de la planta i de l'enzim utilitzat, que s'anomena **zimograma**. El polimorfisme observat al zimograma, és funció de l'estructura quaternària de l'enzim, del nombre d'isoenzims i dels al·lels de cada locus que produeixen diferents enzims anomenats **al·loenzims**. Aquest patró de bandes, així com la seva activitat i resolució varia per a un mateix genotip en funció de molts factors, alguns d'ells derivats de les tècniques de separació i tinció, com el tipus de gel que s'usi com a medi de suport (midó o acrilamida, generalment); les característiques de les solucions tampó del gel i dels elèctrodes (composició, pH i concentració); la porositat del gel (concentració de midó o acrilamida); les condicions d'electroforesi (voltatge, intensitat i temps), i la composició de la solució de tinció. Altres factors susceptibles de produir variacions als zimogrames són el teixit de la planta utilitzat per a l'extracció (fulla, pol·len, arrel, etc.) o l'estat fisiològic d'aquest teixit (edat). És per tant necessari establir detalladament aquestes condicions per assegurar la necessària repetitivitat dels resultats.

1.2.2.- INTERPRETACIÓ GENÈTICA DE LA VARIABILITAT ISOENZIMÀTICA

Davant d'un zimograma, es tracta de determinar quants gens són responsables de les bandes aparegudes, i com aquestes bandes poden ser traduïdes en termes de genotips. Els al·lels dels gens que codifiquen les proteïnes són generalment codominants, és a dir, cada al·lel s'expressa a l'heterozigot. Per tant, es poden distingir els individus homozigots i els heterozigots, el que permet associar tots els fenotips observats a genotips precisos. Aquest és un dels aspectes més importants d'aquest tipus de gens marcadors, ja que permet que els zimogrames es puguin interpretar amb relativa facilitat en termes de gens i d'al·lels.

Les investigacions dutes a terme a diferents espècies diploides mostren que els isoenzims corresponents als productes dels al·lels d'un mateix gen formen, als individus heterozigots, bandes electroforètiques típiques, que permeten identificar els genotips a primera vista. No obstant també es troben zimogrames "atípics", on es poden confondre homozigots i heterozigots. Wendel i Weeden (1990), fan un ampli recull de diferents zimogrames amb la interpretació genètica corresponent. A continuació s'expliquen els casos més corrents en espècies diploides basats en l'estructura quaternària dels enzims monomèrics i dimèrics:

1.2.2.1.- ENZIM DIMORF I MONOMÈRIC

Zimograma:



Fenotip:

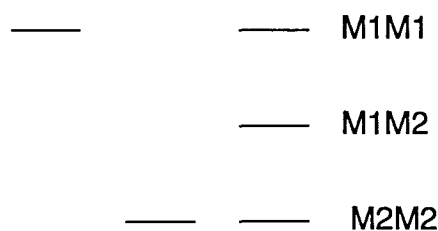
A B C

Considerem un gen amb dos al·lels *a* i *b*. Cadascun d'ells codifica per a un polipèptid diferent. Als individus homozigots (*aa* o *bb*) es produirà un sol tipus de molècula, la determinada per l'al·lel *a* o la determinada per l'al·lel *b*. Al zimograma, aquests individus presentaran una sola banda, i s'interpreten com

homozigots per a al·lells que codifiquen per a un enzim de migració ràpida (*aa*) (fenotip A) o per a un enzim de migració més lenta (*bb*) (fenotip B). Els individus de dues bandes corresponen a heterozigots (*ab*) (fenotip C), amb una banda de la mateixa mobilitat electroforètica que la de l'homozigot *aa* (A) i l'altra de la mateixa mobilitat que la de l'homozigot *bb* (B).

1.2.2.2.- ENZIM DIMORF I DIMÈRIC

Zimograma:

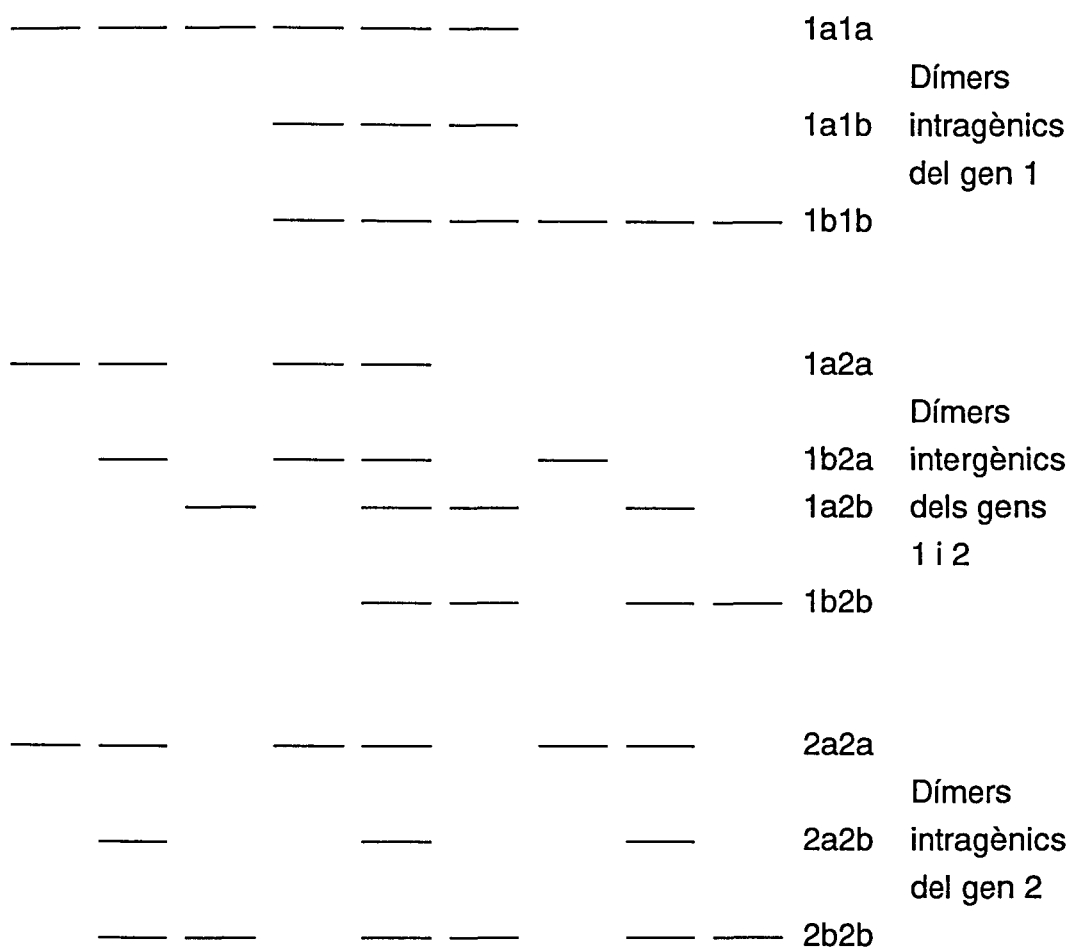


Fenotip: **A** **B** **C**

Com en el cas anterior, els individus homozigots *aa* o *bb* presenten una sola banda, la determinada per l'al·lel *a* o la determinada per l'al·lel *b* (fenotip A i B, respectivament). Aquests homozigots, només poden produir un monòmer M1 o M2. Amb un monòmer, només es pot formar un dímer: M1M1 o M2M2. Als individus heterozigots (fenotip C), degut a l'estructura dimèrica de l'enzim (es necessiten dos monòmers perquè l'enzim sigui actiu), els dos monòmers produeixen tres tipus de dímers diferents: dos homodímers (M1M1 i M2M2) i un heterodímer (M1M2), aquesta és una molècula híbrida que sol tenir una mobilitat intermèdia. Si els monòmers produïts per cada al·lel s'associen a l'atzar, la banda de l'heterodímer presentarà el doble d'intensitat que les altres dues bandes (la meitat dels dímers serien heterodímers i de l'altra meitat un quart correspondria a cada homodímer).

1.2.2.3.- ENZIMS DIMORFS I DIMÈRICS AMB FORMACIÓ DE DÍMERS INTERGÈNICS

Zimograma:



Quan dos gens codifiquen per a enzims dimèrics i actius en el mateix compartiment cel·lular, es poden formar dímers intergènics (entre monòmers codificats per diferents loci) i dímers intragènics (entre monòmers produïts per un mateix gen). Si considerem dos gens 1 i 2 amb dos al·lels cadascun *a* i *b* i anomenem 1a i 1b els monòmers codificats pel gen 1, i 2a i 2b els monòmers codificats pel gen 2, es pot produir un zimograma com el que mostra l'esquema. Algunes vegades, només apareixen les bandes d'un isoenzim i les corresponents als dímers intergènics, la presència d'aquestes dues zones permet deduir el genotip de l'altre gen.

1.2.2.4.- LOCUS DIMORF AMB UN AL·LEL NUL

Alguns gens isoenzimàtics poden presentar al·lells que no són actius. Conseqüentment, no es veuen en els zimogrames. Aquests al·lells anomenats "al·lells nuls", fan que l'expressió del gen sigui dominant. Un heterozigot que tingui un al·lel nul (n) i un d'actiu (a), presentarà el mateix fenotip electroforètic que l'homozigot (aa). Un individu homozigot per a l'al·lel nul (nn), no presentarà cap banda.

Només es podrà determinar l'herència d'un gen amb un al·lel nul, estudiant la descendència de dos individus heterozigots per a l'al·lel nul o la d'un homozigot per al nul i un heterozigot. La segregació esperada a les descendències serà 3(actiu):1(nul) o 1(actiu):1(nul), respectivament.

1.2.3.- APLICACIONS DELS ISOENZIMS A LA GENÈTICA I MILLORA DE PLANTES

Durant molt de temps s'han usat com a marcadors genètics de les plantes, els seus caràcters morfològics. Aquests caràcters però, tenen algunes característiques que fan que el seu ús en la millora sigui molt limitat (són generalment d'expressió dominant i tardana, i es veuen afectats per la seva interacció amb l'ambient i amb altres gens) (Tanksley, 1983a). Els gens isoenzimàtics ofereixen la possibilitat de desenvolupar noves aproximacions als procediments de millora, ja que presenten una sèrie de propietats que permeten superar alguns dels aspectes problemàtics dels marcadors de tipus morfològic:

- Els seus al·lells són codominants, és a dir, es poden distingir els individus heterozigots dels homozigots.
- Poden ser identificats en estadis molt primaris del desenvolupament de la planta (llavors, cotiledons, fulles).
- Rarament presenten interaccions epistàtiques.

- No interaccionen amb el medi, o no ho fan de manera que el medi pugui interferir en la seva interpretació genètica.

El conjunt de tots aquests avantatges, ha fet dels gens isoenzimàtics una eina molt útil per a estudis de genètica i millora de plantes. No obstant, el seu ús es veu limitat per l'escàs nombre de marcadors isoenzimàtics que es coneixen (en molt poques espècies se'n coneixen més de 50). D'aquí sorgeix la necessitat de la utilització d'altres marcadors moleculars més potents (RFLPs i RAPDs), on la limitació en el nombre no existeix, i per tant, permeten investigar en més detall el genoma de les plantes (Tanksley et al., 1989; Arús i Moreno-González, 1993).

1.2.3.1.- APLICACIONS A LA MILLORA

Les diferents aplicacions dels marcadors isoenzimàtics dins l'àmbit de la millora de plantes, s'especifiquen a Tanksley (1983b) i Arús i Moreno-González (1993). A continuació es fa una breu descripció de les mateixes:

1.2.3.1.1.- Estudis de genealogia

El coneixement del genotip isoenzimàtic del parental masculí, del parental femení o de la descendència d'un determinat encreuament, permet establir hipòtesis molt precises sobre la procedència d'individus d'interès. Aquest principi s'ha usat per a moltes i molt diverses aplicacions dels isoenzims a problemes concrets de la millora genètica.

Els isoenzims han servit per a la detecció d'híbrids interespecífics sexuals (Parfitt et al., 1985; Arulsekhar et al., 1985; McGranahan et al., 1986; Chaparro et al., 1987 i 1989; Byrne i Littleton, 1988a i 1989a), i parasexuals (Lo Schiavo et al., 1983). S'han emprat també en la determinació de l'origen zigòtic o nucel·lar en plantes de cítrics (Torres, 1990); la identificació d'haplòides i dihaplòides en cultiu d'anteres (Zamir et al., 1981); l'estimació del sistema d'encreuament (Tanksley et al., 1984), o per a estudis de pol·linització en plantacions de fruiters (Jackson i Clarke, 1991)

1.2.3.1.2.- Identificació i caracterització del material vegetal: control de qualitat

Molts investigadors han utilitzat isoenzims per a la caracterització dels genotips de les plantes (Moore i Collins, 1983). El fet que els isoenzims es puguin reconèixer en estadis molt primaris del desenvolupament, permet, en les espècies llenyoses, la seva identificació ja en el primer any de viver, aspecte de gran importància per al control de la identitat de tot tipus de material: a nivell d'espècies, de varietats, de patrons (Recupero et al., 1989), o en la determinació de puresa de lots de llavor híbrida (Arús, 1983).

1.2.3.1.3.- Marcatge de gens majors lligats a isoenzims

L'avantatge d'usar isoenzims com a marcadors és que són ideals per fer estudis de lligament i per a la construcció de mapes genètics. La possible existència de lligament estret entre un marcador isoenzimàtic i un gen que determina un caràcter d'interès, és un dels punts clau de l'aplicació dels isoenzims a la millora de plantes; ja que amb la selecció precoç d'aquests caràcters ajudada pels marcadors es pot aconseguir un gran estalvi de temps i de diner. Un llistat dels isoenzims que s'han utilitzat com a marcadors de gens majors en millora de plantes, es pot trobar a Arús i Moreno-González (1993).

En els darrers anys, s'estan fent grans esforços en llenyoses per tal de realitzar estudis de genètica d'isoenzims i elaborar posteriorment mapes cromosòmics (Adams, 1983; Mitton, 1983; Torres, 1990). En aquestes espècies, una selecció precoç dels caràcters importants seria especialment útil degut al seu llarg període intergeneracional.

1.2.3.1.4.- Recuperació del genoma del parental recurrent en programes de retroencreuament

L'objectiu dels programes de millora on s'utilitza el retroencreuament com a mètode, és obtenir un individu amb el mateix genotip del genitor recurrent i amb algun gen cedit per l'altre genitor. Per tal d'arribar al final de tot el procés, s'han de fer normalment cinc o sis generacions de retroencreuaments com a mínim (Allard, 1960). Aquesta recuperació del genoma del parental recurrent es pot accelerar amb la utilització de marcadors moleculars (Tanksley et al.,

1989), reduint d'aquesta manera el nombre de generacions necessàries per obtenir una nova varietat.

1.2.3.2.- APLICACIONS A LA GENÈTICA DE POBLACIONS I EVOLUCIÓ

Algunes de les aplicacions més importants dels isoenzims a la sistemàtica i evolució de plantes són les següents:

1.2.3.2.1.- Estudi de la variabilitat en poblacions

L'electroforesi d'isoenzims permet fer una estima de la variabilitat genètica existent en una població. S'han descrit una sèrie de paràmetres (proporció de gens polimòrfics, nombre i freqüència d'al·lels per gen polimòrfic, proporció de gens heterozigots per individu, etc.), que s'usen per a l'estudi d'aquesta variabilitat (Gottlieb, 1981; Hamrick, 1990). A part de les propietats favorables dels isoenzims per a aquest tipus d'estudi ja descrites anteriorment (apartat 1.2.3.), cal afegir que generalment es poden establir homologies entre els isoenzims de diferents espècies, el que permet comparar el polimorfisme d'un conjunt de gens homòlegs entre diferents taxons.

Gottlieb (1981), posà de manifest la notable diferència existent entre el nivell de variabilitat i l'organització d'aquesta, en les espècies autògames i les al·lògames. D'una manera general, les primeres presenten molta menys variabilitat que les segones. La major part o tots els individus d'una població autògama típica són homozigots per als mateixos al·lels a tots els gens, la variació intrapoblacional, és per tant, quasi nul·la, i la poca variabilitat existent es troba entre poblacions. Contràriament, a les espècies al·lògames, la component més important de la variació és la intrapoblacional mentre que les poblacions entre elles són molt semblants; l'al·lel més comú a una població és generalment també el més comú a altres poblacions coespecífiques, a la vegada que els al·lels menys freqüents estan diferentment presents a les poblacions. Resultats semblants a aquests en referència a l'organització de la variabilitat genètica, s'han trobat a les espècies llenyoses, tant en fruiters (Byrne, 1990), com en forestals (Mitton, 1983; Malvolti et al., 1993).

1.2.3.2.2.- Comparacions a nivell d'espècie i de gènere

Els resultats obtinguts quan es comparen poblacions d'espècies congenèriques, indiquen que les diferències són molt més acusades que les observades entre poblacions d'una mateixa espècie, ja que normalment, aquestes darreres comparteixen els mateixos al·lels (Crawford, 1983). Les diferències que es poden esperar entre subespècies o varietats d'una mateixa espècie, són comparables a les trobades entre poblacions coespecífiques (Gottlieb, 1981; Crawford, 1983).

1.2.3.2.3.- Determinació del nivell de ploidia d'una espècie

El nombre d'isoenzims dels sistemes enzimàtics que es tenyeixen amb substrats naturals és constant en les espècies diploides (Gottlieb, 1982). Això implica que cada sistema enzimàtic té un nombre "esperable" d'isoenzims o el que és el mateix, de gens els quals codifiquen per a aquests. Un increment en el nombre d'isoenzims, és doncs, indicatiu de duplicacions. Aquestes, es poden referir a duplicacions de gens o de petits fragments cromosòmics (si el nombre de gens duplicats és baix) o a duplicacions degudes a poliploidia (si les duplicacions són generalitzades per a tots o quasi tots els gens). Els estudis isoenzimàtics permeten també determinar l'origen dels poliploids i especular sobre si la poliploidia és d'origen recent o no (Crawford, 1983).

1.3.- CONEIXEMENTS SOBRE ISOENZIMS EN EL GÈNERE *CORYLUS*

Els pocs estudis isoenzimàtics realitzats fins al moment en l'avellaner revelen polimorfisme al gènere *Corylus*, i concretament a *C. avellana*, una gran variabilitat. Ahmad et al., (1987), observà que *C. avellana*, *C. colurna*, *C. heterophylla* i *C. maxima*, presenten variabilitat per a la peroxidasa, la fenol oxidasa i la fosfatasa àcida. Todorovic (1989), trobà també polimorfisme per a la peroxidasa a *C. pontica*.

En *C. avellana* és on s'ha analitzant un nombre més alt de sistemes enzimàtics (Taula 2, p. 24). La diversitat de zimogrames existents ha estat molt útil per a la caracterització del material vegetal, el que ha permès la identificació d'un gran nombre de varietats (Loukas et al., 1984, Truco et al., 1989, Cheng et al., 1990). Malgrat els coneixements que es tenen del polimorfisme isoenzimàtic en l'avellaner, els estudis de genètica dels isoenzims són mínims. Només es coneixen els resultats de Rovira et al., (1993), que en més detall, s'exposen en aquesta tesi.

TAULA 2 SISTEMES ENZIMÀTICS ESTUDIATS EN L'AVELLANER

SISTEMA ENZIMÀTIC	REFERÈNCIA BIBLIOGRÀFICA ¹
Fosfatasa àcida (ACP)	3
Aconitasa (ACO)	2, 3, 4
Alanina aminopeptidasa (AAP)	3
Esterasa (EST)	1
Fosfoglucoisomerasa (PGI)	1, 2, 3, 4
Fosfoglucomutasa (PGM)	1, 2, 3, 4
6- Fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD)	1, 2, 3, 4
Glucosa- 6- fosfat deshidrogenasa (G-6-PD)	1
Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT)	2, 3, 4
Leucil amino peptidasa (LAP)	1
Malat deshidrogenasa (MDH)	1, 2, 3, 4
Peptidasa (PEP)	1
Xiquimat deshidrogenasa (SDH)	3

¹ 1: Loukas et al., (1984); 2: Truco et al., (1989); 3: Cheng et al., (1990);
4: Rovira et al., (1993)

1.4.- OBJECTIUS

- 1.- Desenvolupament de la tècnica d'electroforesi d'isoenzims en l'avellaner, per tal que pugui ser utilitzada com a font de marcadors genètics en aquesta espècie.
- 2.- Estudi de l'herència de la variabilitat observada en els sistemes enzimàtics on s'ha obtingut polimorfisme i bona resolució, i del lligament entre els gens isoenzimàtics trobats.
- 3.- Determinació dels genotips isoenzimàtics d'una col·lecció de les varietats conreades d'avellaner: avaluació de la variabilitat isoenzimàtica de *C. avellana* i estudi de l'interès de l'electroforesi d'isoenzims per a la identificació varietal.

2.-MATERIAL I MÈTODES

2.1.- MATERIAL VEGETAL

2.1.1.- COL·LECCIÓ DE VARIETATS

Per a l'estudi dels isoenzims de l'avellaner, s'utilitzà material clonat de la col·lecció de varietats del Centre de Mas Bové. Aquesta col·lecció reuneix les varietats més importants dels diferents països productors d'avellana: Alemanya, Bèlgica, Espanya, EUA, França, Grècia, Hongria, Itàlia, Portugal, Regne Unit, Turquia i Zona dels Balcans. La col·lecció també inclou diferents clons d'una mateixa varietat, seleccions procedents de prospeccions a diferents zones, principalment de Tarragona, així com també seleccions obtingudes dels programes de millora genètica de diversos Centres d'Investigació.

La majoria de varietats pertanyen a l'espècie *C. avellana*, no obstant hi ha algunes varietats que s'han descrit dins d'altres espècies: *C. maxima* i *C. pontica* (Bergougnoux et al., 1978).

Amb independència de l'espècie de la qual es tracti, s'ha de tenir present que s'ha treballat amb material molt divers: varietats que constitueixen la base de la producció de diferents països, clons d'una mateixa varietat, varietats de prospecció local i seleccions fruit d'encreuaments controlats. A les Taules 3 i 4 (p. 30-32) s'exposa el material vegetal utilitzat en aquest estudi.

2.1.2.- DESCENDÈNCIES

Per a l'estudi genètic de la variació isoenzimàtica s'utilitzaren 14 descendències de *C. avellana*, que s'escolliren d'acord amb els fenotips dels parentals i el nombre d'individus de les famílies: interessaven famílies tan grans com fos possible (mínim de 40-50 individus) i de genitors amb un alt grau de polimorfisme isoenzimàtic. Totes les descendències provenien de pol·linitzacions controlades.

La majoria de les descendències (9) pertanyen al programa de millora genètica de la "Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière" de l'INRA de Bordeus. El material s'anà a recollir a França durant els hiverns 1989 i 1990, la fusta s'empeltà a Mas Bové i es guardà el material en viver. Per aprofundir en l'estudi genètic d'alguns sistemes enzimàtics es realitzaren 5 nous encreuaments al Centre de Mas Bové, l'hivern de 1991. A la Taula 5 (p. 33) es mostren les 14 descendències utilitzades per a aquest estudi.

2.1.2.1.- REALITZACIÓ DELS ENCREUAMENTS

El procés seguit per a la realització dels encreuaments que es feren al Centre de Mas Bové, fou el següent:

- Control de les floracions de les varietats. Per a la descripció i seguiment dels estats fenològics s'utilitzà la terminologia descrita a Bergougnoux et al. (1978).
- Recollida de pol·len de les varietats utilitzades com a parental masculí. Aquest es recol·lectà quan els aments es trobaven en plena antesi, estat Fm2, moment de plena emissió del pol·len. Els aments es portaren al laboratori, es deixaren una nit damunt d'un full de paper i l'endemà es recollí el pol·len que es conservà dins de tubs de vidre a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Aïllament de les flors femenines de les varietats utilitzades com a parental femení. Al moment de l'aparició dels estigmes, estat Ef, s'embossaren 8 branques per varietat amb paper sulfuritzat, traient els aments de les mateixes i deixant-hi les flors femenines i els borrons.
- Pol·linització. Al moment de plena floració, màxima receptivitat de la flor femenina (Ef2), quan els estigmes estigueren completament oberts, s'obrí la bossa de paper per la part de dalt, i, amb l'ajuda d'un pinzell es va anar col·locant el pol·len (guardat al congelador) damunt dels estigmes. Un cop feta aquesta operació es tancà de nou la bossa. En alguns casos, no totes les flors es trobaren al moment òptim de receptivitat al mateix moment, per la qual cosa es va tornar a passar uns dies més tard per pol·linitzar les flors que s'havien desenvolupat més tard. Les pol·linitzacions es realitzaren els mesos de gener i febrer, depenent de l'evolució de les flors femenines. Les bosses es deixaren dues o tres setmanes a les branques, es tragueren quan els estigmes ja

estaven secs, estat EF, i no hi havia risc d'una contaminació de pol·len extern. Aquestes branques es marcaren, i s'esperà al moment de la collita.

2.1.2.2.- GERMINACIÓ DE LES LLAVORS

A finals d'agost es colliren els fruits directament de l'arbre. S'emmagatzemaren en una cambra a $7\pm 2^{\circ}\text{C}$, fins la tercera setmana del mes de setembre. Per tal que les avellanes germinessin el més aviat possible se'ls aplicà un tractament hormonal: es trencaren i el gra es deixà 24 hores amb àcid giberèlic a una concentració de 100 ppm. Es posaren després en perlita humida, en una cambra d'ambient controlat a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ i a les fosques, per facilitar la germinació. A mesura que les llavors van anar germinant, es col·locaren en torretes, amb una barreja formada per 3/4 de torba i 1/4 de sorra. Aquestes es deixaren a la mateixa cambra d'ambient controlat però amb llum. Quan totes les plàntules ja tingueren fulles es feren les anàlisis isoenzimàtiques.

TAULA 3 VARIETATS UTILITZADES PER A L'ANÀLISI ISOENZIMÀTICA EN L'AVELLANER

PAÍS	Núm.	VARIETATS
ALEMANYA	1	Gunslebert
BÈLGICA	1	Bergeri
ESPANYA	75	Alcover, Amandi, Ametllenca, Apegalós, Artell de Palma, Artellet, Casina, Castanyera, Ceret, Clon la Masó (C.L.M.), Closca Molla, Colldejou, Común Àlava, Culplà, Curcia, David, Del Norte, Del País, Enric, Espinaredo, Falset, Febró, Feliuet, Ferrota, Francolí, Garrofi, Gironell, Grande, Grifoll, Jardinera, Laureà, Llangueta, Lluenta, Mallol, Martinet, Martorella, Marxant, Moll, Morell, Negret, Negret Capellut, Negret Primerenc, Panser, Pauetet, Pere Mas, PG La Selva, Planeta, Pirineu, Pinyolenc, Puntxenc, Queixal de Llop, Queixal de Ruc, Quirós, Ratllada, Ratolí, Ribet, Roca, Roig, Ros, Rosset, Sant Jaume, Sant Joan, Sant Pere, Savall, Segorbe, Selvatà, Simó, Sugranyes, Tomasina, Trenet, Valls, Vermellet, Víctor, Vimbodí i Xato
EUA	6	Butler, Ennis, Henneman-3, Jemstegaard-5, Lansing i Royal
FRANÇA	4	Corabel, Fertile de Coutard, Macrocarpa i Merveille de Bolwiller
GRÈCIA	1	Extra Giaghli

TAULA 3 (continuació)

PAÍS	Núm.	VARIETATS
HONGRIA	1	Romai
ITÀLIA	13	Belle di Giubilino, Campanica, Mortarella, Nocchione, Riccia di Talanico, San Giovanni, Santa Maria del Gesu, Tonda Bianca, Tonda Gentile delle Langhe, Tonda di Giffoni, Tonda Italiana, Tonda Romana i Tonda Rossa
PORTUGAL	1	Grada
REGNE UNIT	6	Cosford, Daviana, Dowton, Emperatrice Eugenie, Grosse Longue i Nottingham
TURQUIA	8	Badem, Imperiale de Trebizonda, Incekara, Karidaty, Kalinkara, Palaz ¹ , Sivri ¹ i Tombul ¹
ZONA DELS BALSANS	2	Fructo Albo ² i Fructo Rubro ²

¹ Varietats en les que s'ha proposat a seva adscripció dins l'espècie *C. pontica* (Bergougnoux et al., 1978)

² Varietats en les que s'ha proposat la seva adscripció dins l'espècie *C. maxima* (Bergougnoux et al., 1978)

TAULA 4 VARIETATS D'AVELLANER EN LES QUE ES VA ANALITZAR MÉS D'UN CLON

PAÍS	VARIETAT	Núm. DE CLONS	NOM
ESPANYA	Garrofi	2	Garrofi Fatarella i Garrofi Figuerola
	Grifoll	2	Grifoll d'Alforja i Grifoll Fatarella
	Morell	3	Morell Alforja, Morell Cambrils i Morell Vimbodí
	Negret	4	Negret Alforja, Negret Almofter, Negret La Masó, Negret Mas Bové
	Trenet	2	Trenet Riudoms i Trenet G.F.(França)

**TAULA 5 DESCENDÈNCIES UTILITZADES PER A L'ESTUDI GENÈTIC
DELS SISTEMES ENZIMÀTICS POLIMÒRFICS**

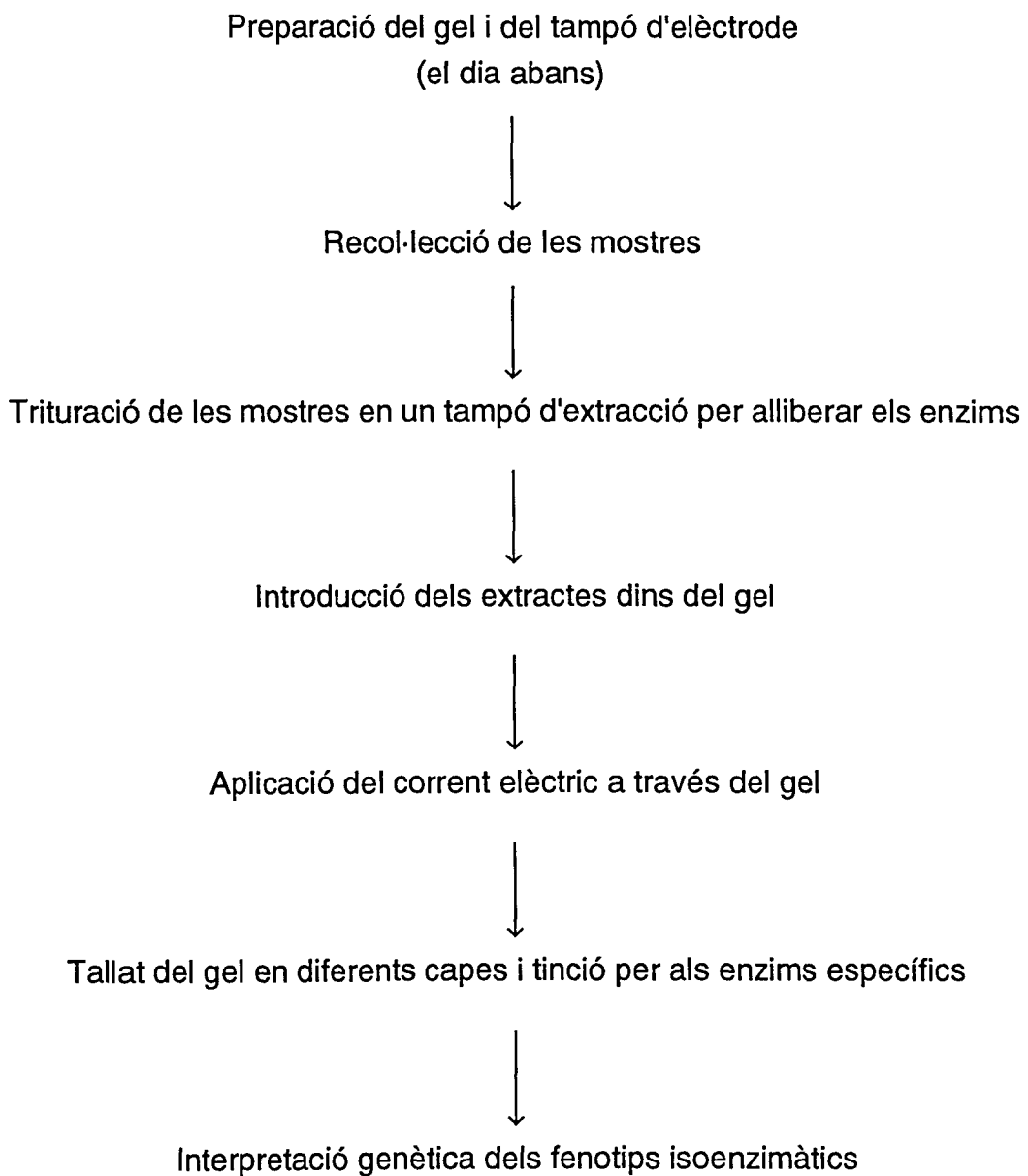
Núm. DE REFERÈNCIA¹	ENCREUAMENT	Núm. D'INDIVIDUS
H-268	Butler x Ennis	32
H-313	Ennis x Butler	53
H-364	Santa Maria del Gesu x Butler	44
H-368	Tonda Romana x Tonda Gentile delle Langhe	17
H-370	Tonda Romana x Segorbe	34
H-383	Ennis x Merveille de Bolwiler	46
H-491	Romai x Butler	45
H-501	Fertile de Coutard x Cosford	86
H-510	Corabel x Tonda di Giffoni	54
MBT-1	Imperiale de Trebizonda x Tonda di Giffoni	7
MBT-2	Tombul x Tonda di Giffoni	28
MBT-3	Gunslebert x Tonda di Giffoni	3
MBT-4	Tonda Bianca x Segorbe	9
MBT-5	Segorbe x Tonda di Giffoni	2

¹ Les descendències H- van ser obtingudes a l'INRA de Bordeus, i les MBT- al Centre de Mas Bové

2.2.- MÈTODES

2.2.1.- METODOLOGIA D'ELECTROFORESI

El procediment seguit per a l'electroforesi d'isoenzims es resumeix al diagrama següent:



2.2.1.1.- APARELL D'ELECTROFORESI

S'utilitzà el model d'aparell d'electroforesi horitzontal descrit per Shields et al., (1983). Consisteix essencialment en dues cubetes de metacrilat (17,8 x 4; 0 x 5,4 cm) unides per un suport horitzontal en forma de pont, sobre el qual es situa el gel. Aquestes dues cubetes funcionen com a elèctrodes i estan connectades als pols d'una font d'alimentació. S'afegí tampó d'elèctrode a les cubetes i la connexió entre el tampó i el gel es féu mitjançant esponges de cuina (tipus "Spontex"). La unitat es col·locà en una nevera per mantenir les condicions d'electroforesi a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.2.- SOLUCIONS TAMPÓ DE GEL I ELÈCTRODE

S'utilitzaren diferents tampons de gel i elèctrode en funció dels enzims que s'estudiaren. Els diferents tampons, permeten treballar en un marge de pH bastant ampli i tenen una composició i propietats diferents. Cada tampó de gel va associat a un tampó d'elèctrode determinat, pel que generalment se'ls anomena "tampons gel/elèctrode". A la Taula 6 (p. 54) es descriuen els tampons emprats en aquest treball.

2.2.1.3.- PREPARACIÓ DEL GEL

S'utilitzaren gels de midó. Un cop preparat el volum necessari de tampó de gel (250 ml/gel), es portaren a ebullició les tres quartes parts d'aquest volum, mentre que la resta s'utilitzà per fer una suspensió a l'11% p:v de midó hidrolitzat per a electroforesi (Connaught). Seguidament es barrejà aquesta suspensió amb el tampó en ebullició dins un kitasato agitant constantment. Per tal de treure totes les bombolles d'aire es féu el buit, abocant seguidament el gel calent i líquid sobre un motlle de vidre (15.8 x 18.5 x 0.5 cm). Es deixà refredar a temperatura ambient i es tapà el motlle amb una placa de vidre per tal d'aconseguir un gruix homogeni del gel (8 mm), i per evitar el dessecament del mateix (podria produir distorsions en la posterior migració de les proteïnes).

El gel sempre es preparà el dia anterior al seu ús deixant-lo a temperatura ambient. Amb la finalitat que els gels i els tampons dels elèctrodes estiguessin

freds al moment de la seva utilització, es col·locaren a la nevera d'una a dues hores abans de fer-ne ús.

2.2.1.4.- EXTRACCIÓ DE LES MOSTRES

2.2.1.4.1.- Teixit utilitzat

S'utilitzà com a teixit d'extracció fulla en creixement (aproximadament 0.01 g). La recollida de les mostres de fulla es féu sempre just abans de l'inici del procés d'electroforesi. En alguns casos s'utilitzà pol·len. Aquest es recollí al moment de plena floració masculina durant els mesos de gener i febrer depenent de les varietats. El pol·len es conservà a una temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dins de tubs de vidre, l'electroforesi es realitzà amb una mostra d'uns 0.002 g de pol·len.

Les mostres (tant de fulla com de pol·len) es trituraren juntament amb 75-100 μl de tampó d'extracció amb una mà de morter damunt d'un recipient de plàstic.

2.2.1.4.2.- Tampó d'extracció

El tampó d'extracció, ha de permetre el manteniment d'un bon nivell d'activitat dels enzims una vegada realitzada l'homogeneïtat del teixit. El tampó utilitzat en aquest treball, modificat del d'Arulsekara i Parfitt (1986), fou el següent:

	<u>quantitats/10ml</u>
0.05 MTris	0.061 g
0.007 M àcid cítric	0.013 g
0.1% cisteïna HCl	0.01 g
0.1% àcid ascòrbic	0.01 g
1% polietilenglicol	0.1 g
1 mM 2-mercaptoetanol	6 μl
8% PVP-40	0.8 g

Amb un pH final aproximat de 8.0

L'extracte es recollí en un paper de filtre (Whatmann núm.3 de 8 x 3 mm). Tot aquest procés d'extracció es duagué a terme amb la major rapidesa possible, per tal d'evitar una possible pèrdua d'activitat dels enzims.

2.2.1.5.- CÀRREGA DEL GEL

Es féu un tall al gel perpendicular a la direcció del camp elèctric a uns 5 cm de l'extrem catòdic (aproximadament 1/3 part del gel), separant el gel en dues parts. Les mostres, papers de filtre impregnats en extracte vegetal, normalment en nombre de 25 a 30, es col·locaren seqüencialment en el gel. Prèviament, l'excés d'extracte de cada mostra es va eliminar posant la mostra en contacte amb un paper de filtre sec. Als gels de morfolina-citrat pH 6.1 (MC 6.1), histidina-citrat pH 5.7 (HC 5.7) i histidina pH 7 (H 7.0), s'introduí una mostra amb paper de filtre d'un marcador/indicador (Blau de Bromofenol) per tal de tenir una referència de la migració de les mostres sotmeses a electroforesi. Als gels de tris-citrat pH 8.3 (TC 8.3) això no fou necessari ja que es formà un front clarament visible.

Un cop posades les mostres s'uniren les dues parts del gel, i es col·locà damunt la unitat d'electroforesi dins de la nevera. Es posaren les esponges dins els elèctrodes en contacte amb els dos pols del gel i es regulà el voltatge de les fonts d'alimentació de l'electroforesi.

2.2.1.6.- CONDICIONS D'ELECTROFORESI

El procés d'electroforesi es duagué a terme en dues fases. Les condicions de voltatge depengueren dels diferents "tampons gel/elèctrode" utilitzats (Taula 7, p. 38).

TAULA 7 CONDICIONS DE VOLTATGE DE LES DUES FASES DEL PROCÉS D'ELECTROFORESI

GELS ¹	FASE I VOLTATGE / TEMPS	FASE II VOLTATGE / TEMPS
HC 5.7	100 v / 15 min	200 v / 2-3 h
MC 6.1	200 v / 15 min	200 v / 2-3 h
H 7.0	100 v / 15 min	200 v / 2-3 h
TC 8.3	150 v / 15 min	300 v ² / 3 h

¹ Els gels estan descrits a la Taula 6 (p. 54)

² El voltatge s'anà incrementant gradualment vigilant de no sobrepassar una intensitat de 40 mA (per evitar un sobreescalfament del gel)

Un cop passats els 15 min de la Fase I, es retiraren els papers de filtre del gel netejant la superfície de contacte entre el gel i els papers amb un cotó fluix per tal d'eliminar els possibles restes de mostra que hi poguessin quedar. Seguidament es tornaren a ajuntar les dues parts del gel. Els col·locà una vareta de vidre a la part superior (entre el gel i el motlle) per assegurar un contacte constant entre les dues parts del gel. Aquest es tapà amb un full de plàstic per evitar la dessecació de la superfície. Es tornà a col·locar el gel damunt la unitat d'electroforesi dins de la nevera per seguir amb la Fase II.

2.2.1.7.- TALLAT DEL GEL

Un cop el Blau de Bromofenol (o el front, en el cas dels gels de TC 8.3) arribà a una distància de migració de 8-10 cm s'aturà el procés d'electroforesi.

Es tragueren els gels separant la part catòdica (per sota del punt d'inserció de les mostres), i la part anòdica (per damunt de l'indicador o front), quedant la part central de l'ànode del gel. A continuació, es procedí al seu tallat en la direcció del seu pla perpendicular al del seu gruix, per tal d'obtenir varies (3) capes útils que permetessin la tinció d'un enzim diferent a cadascuna. La primera capa útil correspondria a la més propera a la superfície del gel i la

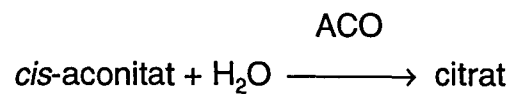
tercera a la més propera del motlle. Les capes extremes del gel (la més superficial i la que està en contacte directe amb el motlle) es varen descartar sempre. Per fer els talls s'utilitzà una serra de marqueteria en la qual s'havia substituït la fulla per una corda metàl·lica de guitarra molt tensada. Aquesta corda es feia lliscar sobre dues tires de plàstic del mateix gruix (0.15 cm) que es posaren una a cada costat del gel. Per evitar que el gel es deformés s'hi efectuà una pressió homogènia amb l'ajut d'un vidre que cobria tota la superfície. Cada capa es col·locà en una cubeta (33.5 x 11.5 x 2.8 cm) en la que prèviament s'hi havia posat la solució de tinció de l'enzim que es volia tenyir.

2.2.1.8.- TINCIONS

A continuació es descriuen d'una manera detallada les reaccions enzimàtiques sobre les quals es basa la tinció de cada enzim i les solucions de tinció emprades en cada cas. Aquestes solucions es varen elaborar a partir de les descrites per Vallejos (1983), amb algunes modificacions. La tinció per a aconitasa, es va fer tal com es descriu a Truco et al., (1989).

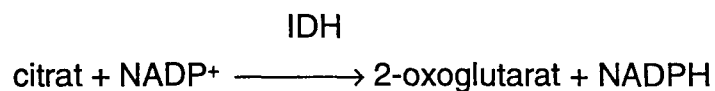
2.2.1.8.1.- Aconitasa (ACO) (EC.4.2.1.3.)

Reacció:



Tinció:

Acoblament enzimàtic catalitzat per la isocitrat-deshidrogenasa (IDH):

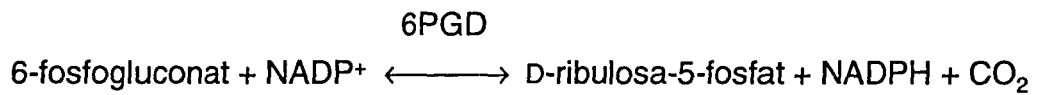


Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
àcid <i>cis</i> -aconític	60 mg
MgCl ₂ (10%)	4 ml
IDH	50 u
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

2.2.1.8.2.- 6-Fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD) (EC. 1.1.1.44)

Reacció:



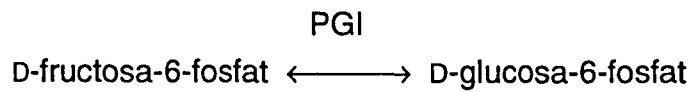
Tinció:

Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
àcid 6-fosfogluconic	25 mg
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

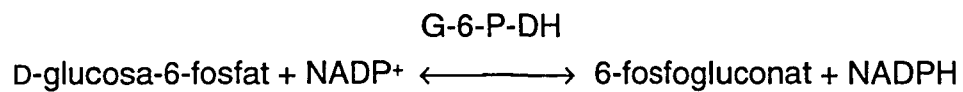
2.2.1.8.3.- Fosfoglucoisomerasa (PGI) (EC.5.3.1.9)

Reacció:



Tinció:

Acoblament enzimàtic catalitzat per la glucosa-6-fosfat-deshidrogenasa (G-6-P-DH):

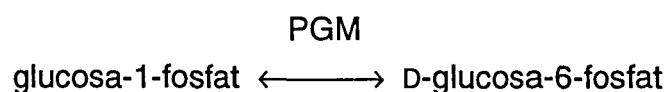


Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
fructosa-6-fosfat	15 mg
G-6-P-DH	20 u
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

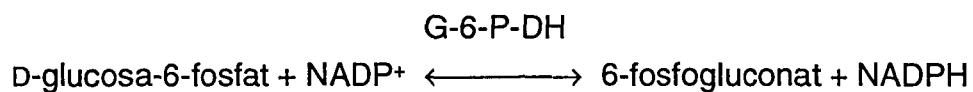
2.2.1.8.4.- Fosfoglucomutasa (PGM) (EC.2.7.5.1)

Reacció:



Tinció:

Acoblament enzimàtic catalitzat per la glucosa 6-fosfat-deshidrogenasa (G-6-P-DH):

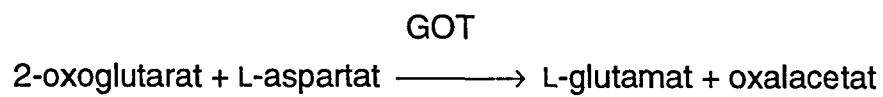


Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
glucosa-1-fosfat	20 mg
G-6-P-DH	20 u
MgCl ₂ (10%)	1.5 ml
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

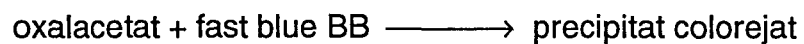
Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

2.2.1.8.5.- Glutamat oxalacetat transaminasa (GOT) (EC. 2.6.1.1)

Reacció:



Tinció:



solució GOT ¹	100 ml
piridoxal-5-fosfat	10 ml
sal "fast blue BB"	200 mg

¹1 litre de solució GOT a pH 8.0: 0.1 M Tris

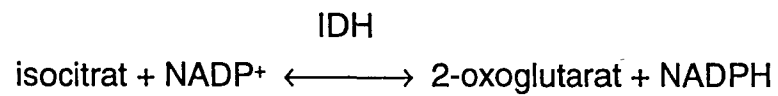
1.0 g àcid α -cetoglutàric

2.0 g àcid aspàrtic

Incubació: a temperatura ambient a les fosques durant 2-4 hores.

2.2.1.8.6.- Isocitrat deshidrogenasa (IDH) (EC. 1.1.1.42)

Reacció:



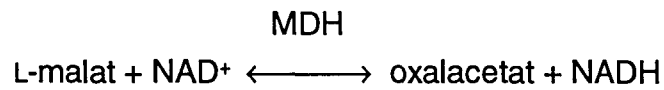
Tinció:

Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
àcid isocítric	25 mg
MgCl ₂ (10%)	1 ml
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

Incubació: la tinció s'incuba durant dues hores a 40°C. S'ha de tenir la precaució de tapar la cubeta amb plàstic, per tal d'evitar l'evaporació de la tinció.

2.2.1.8.7.- Malat deshidrogenasa (MDH) (EC. 1.1.1.37)

Reacció:



Tinció:

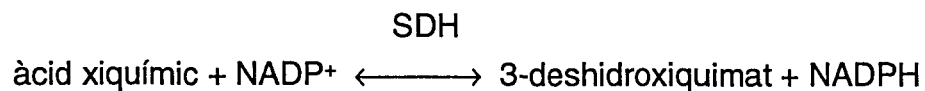
Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
solució L-malat ¹	25 ml
NAD ⁺	15 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

¹1 litre de solució L-malat 0.1M a pH 7.5 :13.4 g àcid màlic
(pH ajustat amb Na₂CO₃)

Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

2.2.1.8.8.- Xiquimat deshidrogenasa (SDH) (EC.1.1.1.25)

Reacció:



Tinció:

Tris-HCl 0.1M pH 8.0	75 ml
àcid xiquímic	25 mg
NADP ⁺	6 mg
MTT	15 mg
PMS	4 mg

Incubació: a temperatura ambient durant aproximadament 1 hora.

2.2.1.9.- NOMENCLATURA

La notació dels sistemes enzimàtics consistí en l'abreviació en majúscules del seu nom en anglès. El zimograma de cada sistema enzimàtic es dividí perpendicularment a la direcció de la migració en zones o regions d'activitat. Aquestes zones s'indicaren amb l'abreviatura de l'enzim seguida d'un número, amb ordre decreixent com més pròxima era la zona de l'ànode, o sia la regió de més mobilitat electroforètica fou la 1, la següent la 2, i així successivament.

La divisió d'un zimograma és, en un principi, arbitrària, però sovint s'intenta que cada regió correspongui a la zona de migració d'un conjunt de proteïnes que tinguin un sentit genètic determinat (per exemple on estiguin tots els enzims produïts per un mateix gen).

Els gens que codifiquen per a isoenzims (gens isoenzimàtics) es representaren amb l'abreviació de l'enzim en minúscules i en itàliques. El número que s'assignà a cada gen coincidí amb el que es donà a la regió d'activitat on migraren els seus productes. Cada al·lel dins d'un determinat gen isoenzimàtic es representà amb una lletra minúscula en itàliques. Amb aquesta lletra també es representà l'al·loenzim d'un al·lel determinat, encara que en aquest cas no es representà en itàliques. S'anomenaren els al·loenzims de major a menor mobilitat electroforètica seguint l'ordre alfabètic.

2.2.1.10.- CÀLCUL DE LA MOBILITAT ELECTROFORÈTICA

El càlcul de la mobilitat electroforètica (R_f) es féu segons la fórmula:

$$R_f = \frac{D_x}{D_f}$$

essent D_x la distància de l'origen a la banda, i D_f la distància de l'origen al front.

En el cas dels gels d'histidina, d'histidina-citrat i de morfolina-citrat, que a diferència dels de tris-citrat, no es pot observar el front, es considerarà la localització del colorant (Blau de Bromofenol) com a referència d'aquest.

2.2.2.- ANÀLISI ESTADÍSTICA

Es realitzà el test χ^2 per determinar l'ajust de les segregacions observades dels gens isoenzimàtics respecte a les esperades Mendelianes. Es consideraren significatius els valors de la χ^2 quan la seva probabilitat (P) fou menor de 0.05. Per a l'anàlisi de cosegregació de parelles de gens s'utilitzà el programa de lligament LINKAGE 1 (Suiter et al., 1983). Aquest programa, dissenyat per determinar la fracció de recombinació (r) entre parelles de loci amb el mètode de màxima versemblança quan es tracta de segregacions F_2 o primera generació de retroencreuament, no va ser útil per a tots els casos del nostre estudi (quan la segregació esperada d'un dels gens era del tipus 1:1:1:1). El lligament d'aquestes cosegregacions es resolgué també amb el mètode de màxima versemblança aplicant les fórmules generals descrites per Allard (1956). Quan un lligament entre dos gens es podia estudiar en més d'una descendència es va fer una estima conjunta de la seva distància genètica i també un test d'homogeneïtat de les diferents segregacions usades per fer aquesta estima.

2.2.3.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS

L'estudi de la variabilitat isoenzimàtica en poblacions d'espècies de reproducció sexual es fa a partir d'una sèrie de paràmetres que la descriuen i permeten comparar el nivell de variabilitat entre poblacions coespecífiques i entre espècies. Aquests paràmetres han estat elaborats per descriure poblacions que es reproduïen sexualment, situació, que és diferent a la de l'avellaner cultivat que es reproduïx vegetativament a escala comercial, pel que les poblacions agrícoles consisteixen en un gran nombre d'individus de genotip idèntic. Aquestes poblacions produeixen llavors d'origen sexual, però no s'utilitzen per a la seva reproducció ja que aquesta es fa per via asexual. La variabilitat de l'espècie cultivada resideix, per tant, entre diferents varietats, en les que s'hi pot assumir (i les dades isoenzimàtiques obtingudes en aquest treball ho confirmen) que s'han obtingut de la selecció entre individus procedents de llavor, i que per tant procedeixen de la reproducció sexual.

L'aproximació a l'estudi de la variabilitat isoenzimàtica de *C. avellana* usada en aquest treball, consistí en considerar cada varietat com un individu diferent d'una població hipotètica formada per totes les varietats estudiades. Es consideraren tres subpoblacions dins d'aquesta, formades cadascuna d'elles pel conjunt de varietats d'una mateixa àrea geogràfica (Turquia, Itàlia i Espanya), entenent que aquests grups de genotips podrien correspondre a una unitat de selecció diferenciada (per la seva adaptació a condicions climàtiques i agrícoles específiques, gustos del consumidor, etc.). Aquestes subpoblacions es triaren també, perquè dins de cadascuna s'hi podia incloure un nombre mínim de genotips (8 en el cas de les varietats turques, 13 en el cas de les italianes i 75 en el cas de les espanyoles), descartant-se altres possibles grups (total de 23 varietats de 9 països), per la seva mida massa petita.

Aquesta aproximació permetrà obtenir una mesura de la variabilitat isoenzimàtica en l'avellaner cultivat, podent-se comparar amb la d'altres espècies de reproducció sexual que han estat estudiades en detall. Al mateix temps, es podrà avaluar el nivell de similitud genètica entre grups de varietats d'avellaner de diverses procedències. No obstant, s'hauran d'interpretar amb precaució els paràmetres que indiquin com és l'organització interna de la variabilitat genètica d'aquesta població, ja que de la manera que ha estat construïda, el conjunt de genotips que la formen és difícilment comparable amb els que componen una població natural d'una espècie de reproducció sexual.

S'estudiaren els següents paràmetres poblacionals tal com estan definits a Gottlieb (1981):

2.2.3.1.- PROPORCIÓ DE GENS POLIMÒRFICS (L)

Sobre un nombre total de loci estudiats a nivell d'espècie, es considerarà un locus polimòrfic quan la freqüència de l'al·lel més comú era igual o inferior a 0.99.

2.2.3.2.- NOMBRE MIG D'AL·LELS PER LOCUS POLIMÒRFIC (A)

Nombre total d'al·lels als loci polimòrfics dividit pel nombre de loci polimòrfics.
Es considerà aquest paràmetre només a nivell d'espècie.

2.2.3.3.- HETEROZIGOSI OBSERVADA (Ho)

Es calculà comptant el nombre d'heterozigots per a un gen determinat en la població, dividit pel total de genotips analitzats.

2.2.3.4.- HETEROZIGOSI ESPERADA (He)

Es calculà per a cada gen segons la fórmula:

$$He = 1 - \sum X_i^2$$

essent X_i la freqüència de l'al·lel i

Es calculà també l'heterozigosi mitjana (HET), que fou la mitjana d'He per a tots els loci, considerant que als loci monomòrfics $He=0$.

2.2.3.5.- ÍNDEX DE FIXACIÓ DE WRIGHT (F)

És un índex que compara les Ho i He , segons la relació:

$$F = (He - Ho) / He$$

El càlcul d'aquest índex es féu només per estimar les freqüències dels al·lels nuls (apartat 2.2.3.7.).



2.2.3.6.- IDENTITAT GENÈTICA (I)

Aquest paràmetre mesura la similitud entre parelles de poblacions dins d'una espècie. La identitat genètica entre dues poblacions al locus j , ve definida per:

$$I_j = \frac{\sum x_i y_i}{(\sum x_i^2 \sum y_i^2)^{1/2}}$$

essent x_i i y_i les freqüències de l'al·lel "i" a les poblacions X i Y, respectivament.

Per a tots els loci estudiats, l'estima de la identitat genètica entre dues poblacions, es calcula segons la fórmula:

$$I = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}}$$

essent J_x , J_y i J_{xy} les mitjanes aritmètiques sobre tots els loci de $\sum x_i^2$, $\sum y_i^2$ i $\sum x_i \sum y_i$ respectivament.

Els valors d'identitat genètica I varien de 0 a 1. Aquest paràmetre proporciona una estimació del grau de semblança genètica entre dues poblacions. Identitats d'1 es troben quan totes les freqüències dels al·lells a tots els gens de les dues poblacions són iguals. Contràriament, el valor 0 indica que les dues poblacions no tenen cap al·lel en comú.

2.2.3.7.- GENS AMB AL·LELS NULS

Quan en algun gen es detectà un al·lel nul, les freqüències dels al·lells d'aquests gens es calcularen a partir de l'estima d' F de la següent manera:

- 1er.- Es determinà el valor de l'Índex de Fixació en tots els gens del mateix grup varietal que no tenien al·lells nuls, considerant que un gen no en tenia, quan no hi havia cap individu que expressés l'al·lel nul en homozigosi.

2on.- Amb la mitjana dels valors d' F calculats, es procedí a l'estima de la proporció de l'al·lel nul (p_n), segons la fórmula:

$$p_n^2 (1-F) + p_n F = v$$

essent v la freqüència d'homozigots per a l'al·lel nul en el gen considerat.

3er.- Les freqüències dels altres al·lells es calcularen multiplicant per $(1-p_n)$ la freqüència obtinguda, considerant únicament les plantes de la població que no tenien l'al·lel nul en homozigosi.

TAULA 6 TAMPONS DE GEL I ELÈCTRODE UTILITZATS PER ALS ESTUDIS ISOENZIMÀTICS EN L' AVELLANER

SOLUCIÓ TAMPÓ	TAMPÓ DEL GEL	pH	TAMPÓ DE L'ELÈCTRODE	pH
Morfolina-Citrat (MC 6.1)	1:20 de dilució del tampó d'elèctrode	6.1	0.04 M àcid cítric, pH ajustat amb N-(3-aminopropil-morfolina)	6.1
Histidina-Citrat (HC 5.7)	0.009 M L-Histidina, pH ajustat amb àcid cítric	5.7	àcid cítric (9.04 g/l), tris (16.35 g/l)	7.0
Histidina (H 7.0)	0.005 M DL-Histidina, pH ajustat amb àcid cítric	7.0	àcid cítric (9.04 g/l), tris (16.35 g/l)	7.0
Tris-Citrat (TC 8.3)	0.015 M Tris, pH ajustat amb àcid cítric	8.3	0.3 M àcid bòric, pH ajustat amb NaOH	8.2

3.- RESULTATS

3.1.- GENÈTICA DELS ISOENZIMS

3.1.1.- ESTUDIS D'HERÈNCIA

S'obtingué una bona resolució i una gran variabilitat per a la majoria dels sistemes enzimàtics estudiats (ACO, 6PGD, PGI, PGM, GOT i MDH), que permeté estudiar-ne la seva genètica. Contràriament, als sistemes IDH i SDH la variabilitat fou escassa i la resolució no fou tan clara. A la Taula 8 (p.79) es descriu la resolució i la variabilitat trobada en les diferents zones d'activitat per a cada sistema estudiat.

Per establir la genètica de la majoria dels sistemes analitzats, foren suficients les observacions dels fenotips de les 9 descendències del material provinent de França. Aquest estudi genètic va permetre la determinació dels genotips dels parentals (Taula 9, p.80). Per a l'estudi en més detall de dos sistemes (PGI i GOT), es va fer l'estudi isoenzimàtic d'un grup de descendències elaborades amb aquest propòsit al Centre de Mas Bové.

La descripció del zimograma de cada enzim que s'exposa als paràgrafs següents, s'ha fet d'acord amb el fenotip observat quan s'ha treballat amb extracte de fulla, especificant-se expressament quan es tracta dels zimogrames obtinguts amb extractes de pol·len.

3.1.1.1.- ACONITASA

S'observaren dues zones d'activitat a la part central del gel no massa distanciades entre elles ACO-1 i ACO-2, mostrant polimorfisme totes dues (Fig.1, p.57). La zona de l'ACO-1 mostrà 6 fenotips diferents, dos d'una sola banda i quatre de dues bandes. Els d'una sola banda presentaren una banda de migració lenta d ($R_f=0.20$) o una banda de migració intermèdia b ($R_f=0.24$). Els quatre fenotips de dues bandes foren els següents: un fenotip amb les bandes b i d, un segon amb la banda d i la de migració més ràpida a ($R_f=0.28$), un tercer amb les bandes de migració intermèdia b i c ($R_f=0.22$) i el darrer fenotip amb les bandes c i d. La zona de l'ACO-2 presentà 3 fenotips diferents,

un d'una sola banda de migració intermèdia b ($R_f=0.15$), i dos amb dues bandes: un amb la banda b i una de migració més ràpida a ($R_f=0.17$) i l'altre amb la banda b i una de migració més lenta c ($R_f=0.13$). El zimograma obtingut amb mostres de pol·len fou el mateix que l'observat amb teixit de fulla.

Segons les observacions de les descendències (Fig.2,3, p.58) i l'estudi dels resultats obtinguts en les segregacions (Taula 10, p.81), serien responsables d'aquest polimorfisme dos gens: *Aco-1* amb 4 al·lels: a, b, c i d i *Aco-2* amb tres al·lels: a, b i c. Per al gen *Aco-1*, les observacions de dues de les vuit descendències segregants (H-268 i H-510), varen diferir significativament de les esperades. Els resultats de l'encreuament H-370 (*dd x dd*) recolzaren la hipòtesi establerta, ja que tots els individus presentaren el fenotip de la banda d. Per al gen *Aco-2*, els resultats obtinguts de dos dels tres encreuaments polimòrfics (H-368 i H-370), es desviaren significativament dels esperats. Les descendències que no segregaren mostraren el fenotip b, tal com s'esperava d'acord amb els seus genitors, de genotip *bb*.

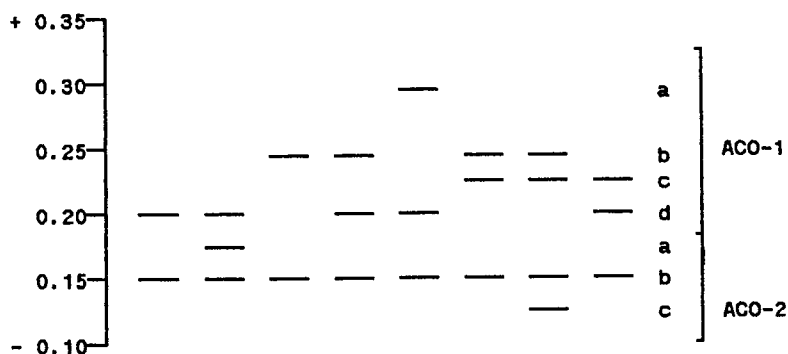


Fig.1.- Dibuix esquemàtic del zimograma d'ACO en l'avellaner.

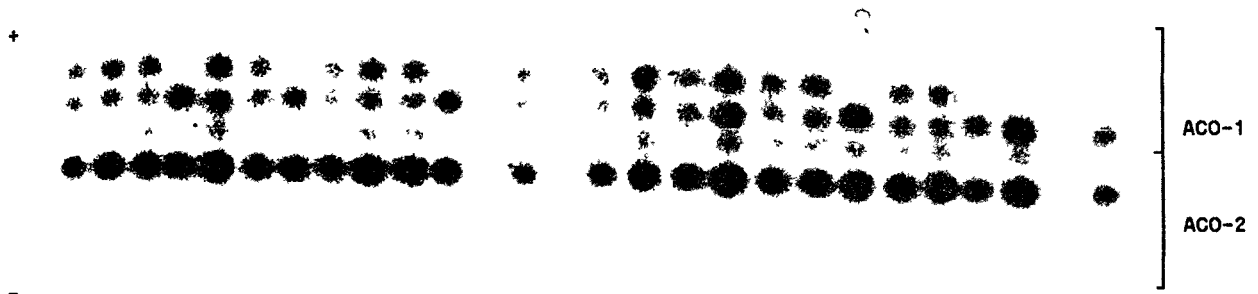


Fig.2.- Zimograma de l'enzim aconitasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-313. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Aco-1* són: *bd*, *bd*, *bd*, *dd*, *bd*, *bd*, *dd*, *bd*, *bd*, *bd*, *dd*, *bd*, *bd*, *bd*, *bd*, *bd*, *bd*, *dd*, *bd*, *bd*, *dd*, *dd* i *dd*; per a *Aco-2* tots els genotips són *bb*. Els parentals corresponen a les mostres 12 i 24.



Fig.3.- Zimograma de l'enzim aconitasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-491. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Aco-1* són: *cd*, *bd*, *cd*, *cd*, *cd*, *bc*, *cd*, *bd*, *bd*, *bd*, *bd*, *cd*, *cd*, *cd*, *bd*, *bd*, *bd*, *cd*, *bd*, *bd*, *cd*, *dd*, *cd*, *bd*, *bd*, *cd* i *cd*; per a *Aco-2*: *bc*, *bc*, *bb*, *bb*, *bb*, *bc*, *bc*, *bb*, *bc*, *bb*, *bb*, *bc*, *bb*, *bb*, *bb*, *bc*, *bc*, *bc*, *bb*, *bc*, *bc*, *bb*, *bc*, *bc*, *bb* i *bb*. Els parentals corresponen a les mostres 6 i 22.

3.1.1.2.- 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA

La utilització de gels d'histidina-citrat (HC 5.7), per a les tincions d'aquest sistema enzimàtic, permeteren fer visibles dues zones d'activitat, però la seva resolució no fou mai suficientment clara. S'intentà millorar la resolució amb gels de morfolina-citrat (MC 6.1) i s'obtingueren resultats satisfactoris, sobretot en la zona més catòdica del gel. Es distingiren dues zones d'activitat 6PGD-1 i 6PGD-2. La zona del 6PGD-1 ($R_f=0.22$) es mostrà monomòrfica per a les descendències i genitors estudiats, encara que la seva resolució continuava no essent neta del tot. Contràriament la zona de l'ànode de més lenta migració (6PGD-2), mostrà un clar polimorfisme (Fig.4, p.60). En aquesta zona aparegueren quatre fenotips diferents, dos d'una sola banda i dos de tres bandes. Amb una sola banda es distingiren els que presentaren una banda de migració ràpida a ($R_f=0.14$) i els que en mostraren una de migració més lenta b ($R_f=0.09$). Els individus de tres bandes presentaren: un, la banda a, la b i una intermèdia entre a i b; l'altre la banda a, una de migració més lenta que la b, c ($R_f=0.07$), i una banda intermèdia entre a i c.

Les segregacions de les descendències (Fig.5,6,7, p.60-61 i Taula 11, p.82), suggereixen que el responsable del polimorfisme a la zona del 6PGD-2 seria un gen, *6Pgd-2*, amb 3 al·lels: a, b i c. Només a una de les set descendències segregants estudiades (H-510) la segregació per a *6Pgd-2* diferí significativament dels valors esperats. Els encreuaments H-368 (*aa x aa*) i H-501 (*aa x bb*) mostraren en les descendències el fenotip de la banda a en el primer cas i el fenotip de tres bandes en el segon, tal com era d'esperar segons la hipòtesi establerta del funcionament del gen *6Pgd-2*. En extractes de pol·len s'observaren els mateixos fenotips per a *6Pgd-2*, amb la diferència que els individus heterozigots no tenien la banda intermèdia, d'acord amb la hipòtesi, de que *6Pgd-2* és un gen i que l'enzim és dimèric.

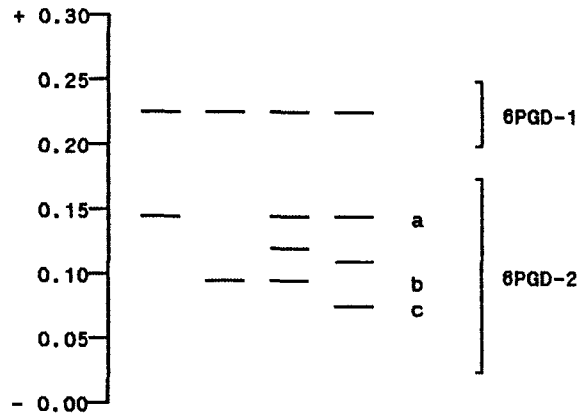


Fig.4.- Dibuix esquemàtic del zimograma de 6PGD en l'avellaner.



Fig.5.- Zimograma de l'enzim 6-fosfogluconat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-313. D'esquerra a dreta, els genotips per a *6Pgd-2* són: *aa*, *aa*, *ab*, *aa*, *ab*, *ab*, *ab*, *bb*, *ab*, *ab*, *ab*, *bb*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab*, *bb*, *aa*, *ab*, *aa*, *ab*, *ab* i *ab*. Els parentals corresponen a les mostres 9 i 10.

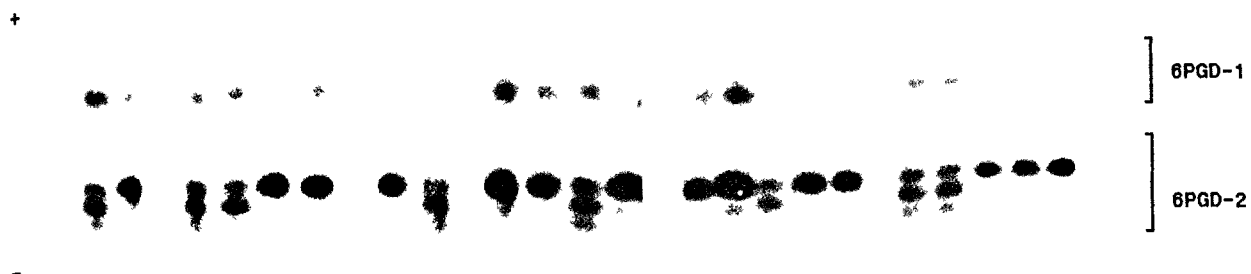


Fig.6.- Zimograma de l'enzim 6-fosfogluconat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-364. D'esquerra a dreta, els genotips per a *6Pgd-2* són: *ab, aa, ab, ab, aa, aa, aa, ab, aa, aa, ab, aa, aa, aa, ab, aa, aa, ab, ab, aa, aa* i *aa*. Els parentals corresponen a les mostres 7 i 8.

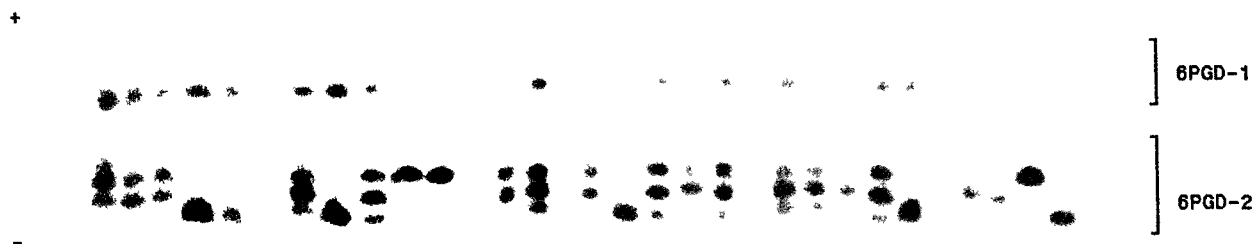


Fig.7.- Zimograma de l'enzim 6-fosfogluconat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-491. D'esquerra a dreta, els genotips per a *6Pgd-2* són: *ac, ac, ac, bc, bc, ab, bc, ac, aa, aa, ac, ab, ac, bc, ac, ab, ac, ab, ab, ab, ac, bc, ab, ac, aa, bc* i *ac*. Els parentals corresponen a les mostres 11 i 12.

3.1.1.3.- FOSCOGLUCOISOMERASA

Els zimogrames d'aquest sistema enzimàtic presentaren tres zones d'activitat (Fig.8, p.63). La més anòdica de totes elles (PGI-1, $R_f=0.45-0.50$) no mostrà cap variació en les descendències analitzades, per bé que la seva resolució no va ser molt clara i variants enzimàtics de mobilitat molt semblant podrien no haver-se detectat. Contràriament les altres dues regions (PGI-2 i PGI-3), amb una resolució molt bona, presentaren un gran polimorfisme. En la zona del PGI-2 aparegueren dos fenotips diferents un amb una banda de migració lenta b ($R_f=0.29$) i un altre de tres bandes format per la banda b , una de migració més ràpida a ($R_f=0.33$) i una banda intermèdia entre a i b . En la zona del PGI-3 es trobaren set fenotips diferents en els parentals i descendències estudiats. Dos d'ells presentaren una sola banda ($R_f=0.25$ o $R_f=0.19$), tres en tenien dues ($R_f=0.25$ i $R_f=0.23$; $R_f=0.23$ i $R_f=0.19$; $R_f=0.21$ i $R_f=0.19$), un en tenia tres ($R_f=0.25$, $R_f=0.23$ i $R_f=0.21$) i el darrer tenia quatre bandes ($R_f=0.25$, $R_f=0.23$, $R_f=0.21$ i $R_f=0.19$).

Els fenotips presentats pel pol·len mostraren també tres zones d'activitat (Fig.9, p.64). La zona del PGI-1 es mostrà també sempre monomòrfica. A la zona del PGI-2, aparegueren dos fenotips diferents, individus d'una sola banda (b) i individus de dues (a i b), és a dir, sense la banda intermèdia que s'observà en teixit esporofític. La zona del PGI-3 presentà el mateix fenotip que les mostres del teixit de fulla, en les varietats que es va analitzar.

Després de les observacions de les descendències (Fig.10, p.64) i l'anàlisi de les mateixes (Taula 12, p.83), es pot explicar el polimorfisme observat amb la següent hipòtesi. La zona del PGI-2 correspondria a un gen, *Pgi-2*, amb dos al·lels (a i b). Els resultats de les segregacions de *Pgi-2* no es desviaren significativament dels valors esperats en cap dels dos casos en que es va poder testar. Les descendències que no segregaren, presentaren el fenotip b , tal com era d'esperar ja que es tractava d'encreuaments entre individus de genotip bb . A la zona del PGI-3 les segregacions dels diferents genotips de les descendències segregants, així com la relació entre bandes de cada individu a la regió del PGI-3 i el genotips de *Pgi-2*, suggereixen que aquesta zona és on migren els dímers intergènics formats per un monòmer dels que codifica el gen *Pgi-2* i un altre produït per un gen, *Pgi-3*, els homodímers del qual no foren visibles en les nostres condicions d'electroforesi (probablement degut a un nivell baix o nul d'activitat). Aquest gen tindria tres al·lels (a , b i c), inferint-se el

genotip de cada individu del patró de bandes de la regió del PGI-3 i el del genotip *Pgi-2*. En les sis descendències on es va poder estudiar la segregació de *Pgi-3*, els valors observats estaven d'acord amb la hipòtesi de l'existència d'aquest gen.

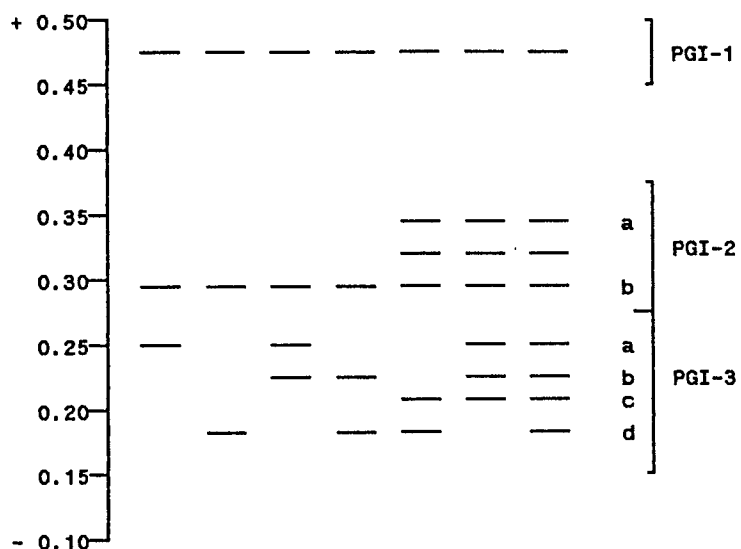


Fig.8.- Dibuix esquemàtic del zimograma de PGI en l'avellaner.



Fig.9.- Zimograma de l'enzim fosfoglucoisomerasa corresponent a mostres de fulla i de pol·len alternades. Es pot apreciar com en les mostres de pol·len, els individus heterozigots per a *Pgi-2* (mostres 2 i 10), presenten només dues bandes, una corresponent a l'al·lel *a* i l'altra a l'al·lel *b*.



Fig.10.- Zimograma de l'enzim fosfoglucoisomerasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-510. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Pgi-2* són: *ab, ab, ab, ab, bb, bb, bb, bb, ab, ab, bb, ab, ab, ab, ab, bb, bb, bb, ab, ab, bb, bb, bb, ab i ab*, per a *Pgi-3*: *ac, aa, aa, ac, ac, ac, aa, aa, ac, aa, ac, ac, ac, ac, ac, cc, cc, ac, ac, aa, ac, cc, aa, ac i ac*. Els parentals corresponen a les mostres 11 i 12.

3.1.1.4.- FOSFOGLUCOMUTASA

Aquest sistema enzimàtic presentà un gran polimorfisme a la part central del gel i molt bona resolució. En l'estudi dels parentals i de les descendències provinents del material del Centre de Bordeus, aparegueren 17 fenotips diferents. Aquests eren fruit de la combinació de 6 bandes de diferent mobilitat electroforètica amb les Rf següents: 0.38, 0.31, 0.26, 0.22, 0.16 i 0.08 (Fig.11, p.66). L'observació de les segregacions (Fig.12,13,14, p.67-68) i els resultats obtinguts de les mateixes (Taula 13, p.84) va permetre elaborar una hipòtesi sobre la base genètica de la variabilitat observada en aquest sistema enzimàtic, que s'explica com a resultat de l'acció de tres gens:

Pgm-1: Gen que codificaria per a la variació observada a la zona més anòdica del gel amb dos al·lells, un d'ells nul (*n*) i l'altre actiu (*a*) (Rf=0.38). Així doncs, els individus *an* i *aa* tindrien tots la banda *a* i no es podrien distingir l'un de l'altre al gel, mentre que els individus *nn* es podrien detectar per l'absència d'activitat enzimàtica en aquesta regió.

Pgm-2: Aquest gen amb 2 al·lells (*a* i *b*), seria el responsable de la variació observada a la part intermèdia del zimograma, corresponent a les bandes (Rf=0.31 i 0.26). Aquestes dues bandes, aparegueren sempre amb una tinció menys intensa que les restants. L'enzim codificat per l'al·lel *a* comigra amb el producte d'un altre al·lel que correspondria a un tercer gen (*Pgm-3*), tots dos amb un valor de Rf=0.31. Degut a aquest fet, no fou possible l'estudi genètic del *Pgm-2* per a algunes descendències (H-368, H-370, H-383 i H-501) en les que aquests dos al·lells segregaven.

Pgm-3: Seria el tercer gen implicat en l'expressió del PGM amb 4 al·lells actius (*a*, *b*, *c* i *d*) amb uns valors de Rf=0.31, 0.22, 0.16 i 0.08, respectivament, i un de nul (*n*). El fet que per a alguns encreuaments hi hagués superposició de bandes dels productes del l'al·lel *a* de *Pgm-3* i *Pgm-2*, resultà ser un problema per a la interpretació de *Pgm-3*, en dues descendències (H-370 i H-501) que no es pogueren analitzar. La interpretació genètica de *Pgm-3* es va veure afectada per l'existència d'al·lells nuls. Degut al patró de dominància que presenten aquest tipus d'al·lells no es va poder analitzar la segregació dels encreuaments H-268 i H-313, ja que eren del tipus *bn* x *bb*. Les descendències dels encreuaments H-364 i H-510, mostraren totes el fenotip *b*, tal com era d'esperar doncs ambdós parentals tenen el genotip *bb*.

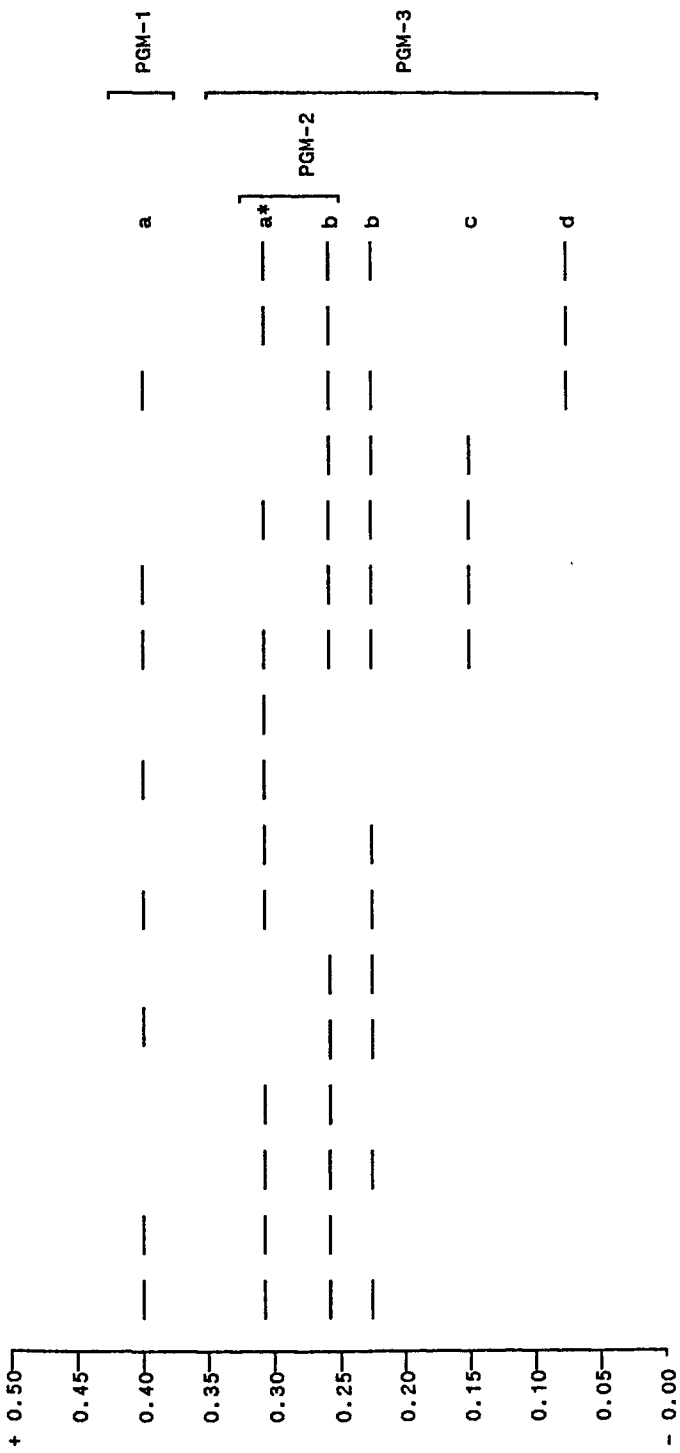


Fig.11.- Dibuix esquemàtic del zimograma de PGM en l'avellaner.
 * Els al·loenzims a de PGM-2 i PGM-3, migren a la mateixa posició.

Els resultats de la Taula 13 (p.84) mostren que per a totes les descendències analitzades, els valors observats s'ajustaren als esperats per als tres loci.

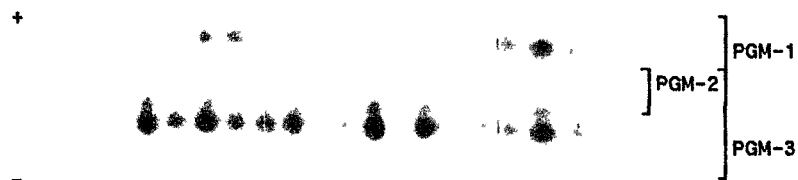


Fig.12.- Zimograma de l'enzim fosfoglucomutasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-313. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Pgm-1* són: *nn*, *nn*, *an*, *an*, *nn*, *nn*, *an*, *nn*, *nn*, *an*, *an*, *an*, *an* i *an*; per a *Pgm-2* els genotips són tots *bb* i per a *Pgm-3*, tots els individus presenten el fenotip b (genotip *bb* o *bn*). Els parentals corresponen a les mostres 7 i 8.

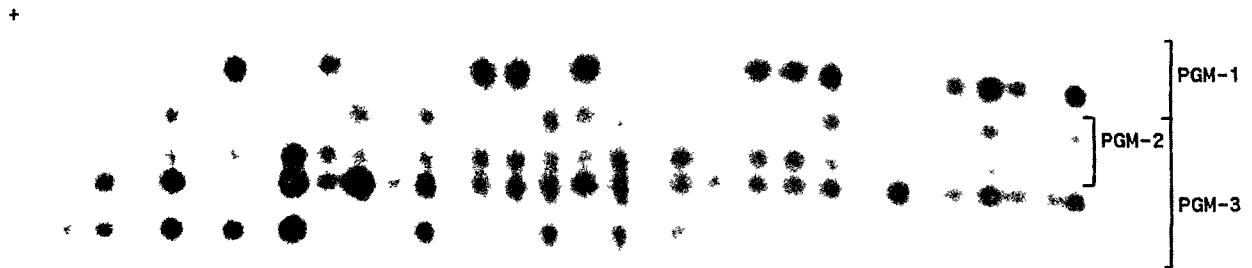


Fig.13.- Zimograma de l'enzim fosfoglucomutasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-491. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Pgm-1* són: *nn, nn, nn, nn, nn, an, nn, an, nn, nn, nn, an, an, nn, an, nn, nn, nn, an, an, an, nn, an, an, an, nn* i *an*; per a *Pgm-2*: *ab, bb, ab, ab, ab, ab, bb, bb, ab, bb, ab, bb, bb, ab, ab, ab, bb, bb, bb, ab, bb, ab, ab, ab, ab, i ab*; per a *Pgm-3*: *bc, bc, bc, bc, bc, cn, bc, bn, bn, bc, bc, bn, bn, bc, bn, bc, bc, bc, bn, bn, bn, bb, bn, bn, bn, bc* i *bn*. Els parentals corresponen a les mostres 6 i 22.

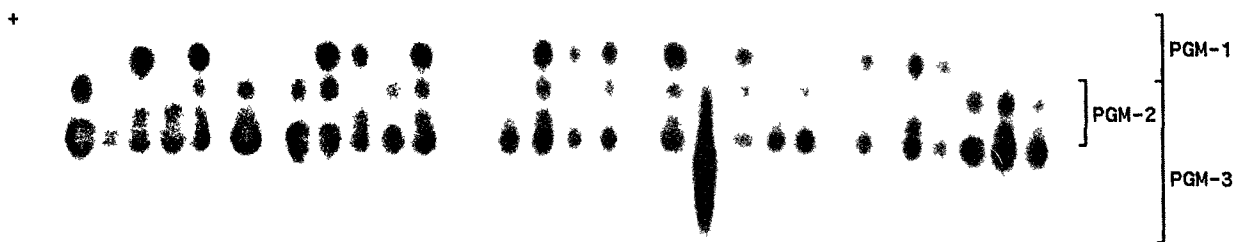


Fig.14.- Zimograma de l'enzim fosfoglucomutasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-510. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Pgm-1* són: *nn, nn, an, nn, an, nn, nn, an, an, an, an, an, nn, an, an, an, an, -, an, nn, nn, an, an, an, nn, nn* i *nn*; per a *Pgm-2*: *aa, aa, bb, bb, ab, ab, aa, aa, bb, aa, ab, bb, ab, ab, ab, aa, ab, -, aa, bb, aa, ab, bb, ab, aa, ab* i *ab*, per a *Pgm-3*, tots els genotips són *bb*. Els parentals corresponen a les mostres 6 i 22.

3.1.1.5.- GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA

Es detectaren dues zones d'activitat per al GOT, però només es va poder analitzar la zona de més lenta migració (GOT-2), ja que GOT-1 ($R_f=0.8$) va donar patrons de bandes mal resolts i poc actius (Fig.15, p.70). A la zona del GOT-2 aparegueren dos fenotips diferents, un amb una sola banda de migració lenta *b* ($R_f=0.22$) i un altre amb tres bandes. Aquest darrer presentà la banda *b*, una banda *a* de migració més ràpida ($R_f=0.5$) i una banda intermèdia entre *a* i *b*. El zimograma obtingut amb mostres de pol·len, presentà a la zona del GOT-2, també dos fenotips, un d'una sola banda (*b*), i l'altre de dues bandes (*a* i *b*), sense presentar aquest darrer, una banda intermèdia entre les dues.

La segregació observada per a GOT-2 (Fig.16), està d'acord amb l'existència d'un gen (*Got-2*) amb dos al·lels (*a* i *b*), com a responsable de la variació observada. A la Taula 14 (p.85) es mostra el resultat de les descendències analitzades. Només una d'elles (H-510) segregà per a aquest sistema enzimàtic. Tots els individus de les altres descendències presentaren el fenotip *b*, idèntic al dels seus genitors, de genotip *bb*.

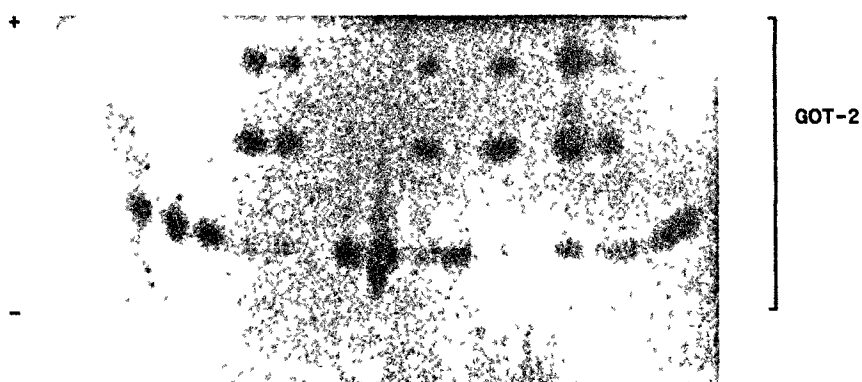


Fig.16.- Zimograma de l'enzim glutamat oxalacetat transaminasa corresponent a la descendència de l'encreuament H- 510. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Got-2* són: *bb*, *bb*, *bb*, *ab*, *ab*, *bb*, *bb*, *ab*, *bb*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab* i *bb*.

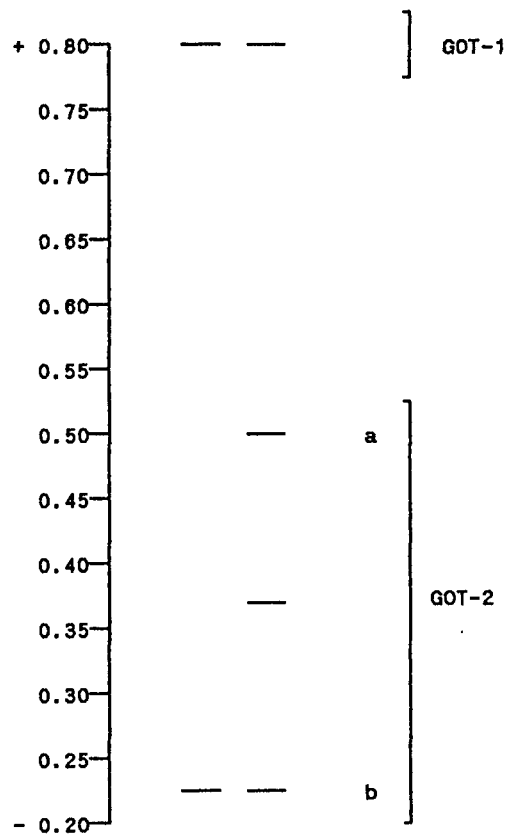


Fig.15.- Dibuix esquemàtic del zimograma de GOT en l'avellaner.

3.1.1.6.- ISOCITRAT DESHIDROGENASA

Aquest sistema enzimàtic presentà problemes de resolució. S'observà activitat a una zona molt pròxima a l'origen de migració. La millor resolució s'obtingué quan s'utilitzà el gel d'histidina a pH 7.0 (H 7.0).

El patró de bandes d'aquest enzim permeté distingir dues zones d'activitat IDH-1 i IDH-2. La zona més anòdica, resultà sempre molt poc tenyida, fet que comportà que ens fixéssim només en la zona del IDH-2 ($R_f=0.4$). Aquesta, tampoc arribà mai a veure's en completa claredat, pel que no es va poder determinar si era variable, ni per tant fer una anàlisi genètica de la seva variació.

3.1.1.7.- MALAT DESHIDROGENASA

Sistema enzimàtic on es distingiren clarament tres zones d'activitat : MDH-1, MDH-2 i MDH-3, però només una d'elles la més anòdica (MDH-1), mostrà polimorfisme (Fig.17, p.72). En aquesta zona s'observaren dos fenotips diferents, un d'una sola banda de migració lenta b ($R_f=0.4$) i l'altre de tres bandes: la banda b, una de migració més ràpida a ($R_f=0.46$) i una tercera, intermèdia entre a i b. La zona del MDH-2 ($R_f=0.35$), presentà una banda a tots els individus analitzats. La regió més catòdica, de més lenta migració, presentà el mateix patró de bandes (2 bandes) ($R_f=0.18$ i 0.15) en totes les descendències i genitors.

Les proves amb pol·len mostraren les tres regions ja observades en fulla. La diferència fou que per al gen *Mdh-1*, els individus heterozigots *ab*, mostraren només les dues bandes (a i b).

Les observacions dels diferents zimogrames (Fig.18, p.72) suggereixen que el responsable de la variació observada a la zona del MDH-1 seria un gen (*Mdh-1*) amb dos al·lells (*a* i *b*). La zona del MDH-2 podria correspondre a un gen monomòrfic. Els resultats de les descendències (Taula 15, p.86), mostren que en tots els casos, menys a l'encreuament H-368, els resultats observats estaven d'acord amb la hipòtesi establerta. A les descendències no segregants H-268, H-313, H-364, H-383 i H-501 aparegué només un sol fenotip b, el que era d'esperar, ja que es tractava d'encreuaments entre individus de genotip *bb*.

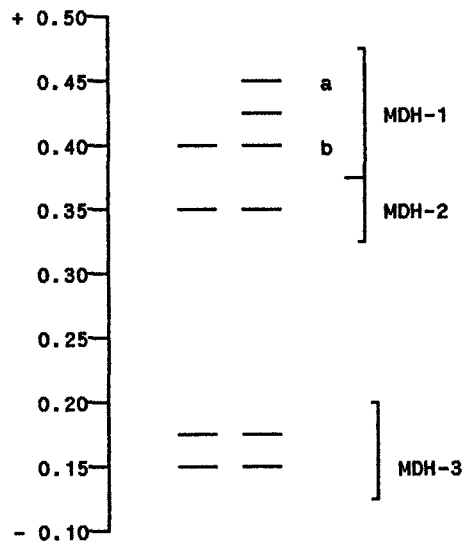


Fig.17.- Dibuix esquemàtic del zimograma de MDH en l'avellaner.

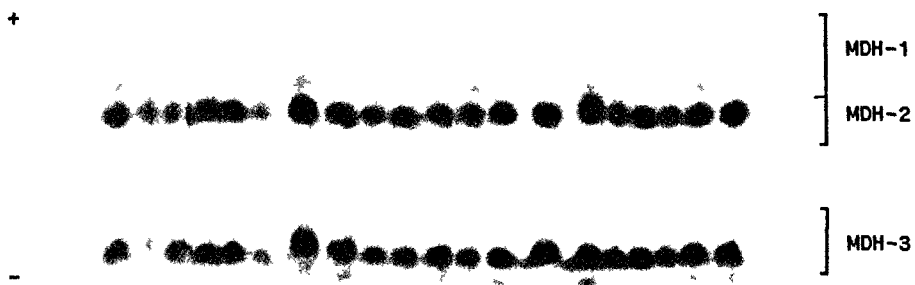


Fig.18.- Zimograma de l'enzim malat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-510. D'esquerra a dreta, els genotips per a *Mdh-1* són: *bb*, *ab*, *bb*, *bb*, *ab*, *bb*, *bb*, *ab*, *bb*, *bb*, *ab*, *bb*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab*, *ab*, *bb* i *ab*. Els parentals corresponen a les mostres 7 i 14.

3.1.1.8.- XIQUIMAT DESHIDROGENASA

La resolució més bona per a aquest sistema enzimàtic, s'aconseguí emprant gels de morfolina-citrat a pH 6.1 (MC 6.1). S'observà una sola zona d'activitat amb 4 fenotips diferents: un de 2 bandes, un de 6 bandes i dos de 4 bandes, per als diferents individus analitzats (Fig.19;20,21, p.75), amb uns valors entre $R_f=0.30-0.15$. No obstant la resolució del sistema no fou sempre òptima. Aquest fet, juntament amb la poca variabilitat que mostraren els genitors, no va permetre fer-ne l'estudi genètic.

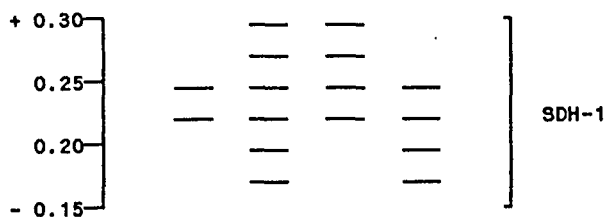


Fig.19.- Dibuix esquemàtic del zimograma de SDH en l'avellaner.

3.1.1.9.- APROFUNDIMENT EN L'ESTUDI DELS SISTEMES PGI I GOT

Als gens *Pgi-2* i *Got-2* aparegueren individus heterozigots *ab* i individus homozigots *bb*, però mai el fenotip corresponent a l'homozigot *aa*. L'hivern de 1991 es realitzaren al Centre de Mas Bové encreuaments entre varietats heterozigòtiques per a aquests gens, a fi de poder localitzar individus *aa* que serien d'esperar d'acord amb la hipòtesi d'existència d'aquests gens. Els encreuaments varen ser els següents:

Núm. de Referència	Encreuaments	Fruits	Llavors germinades
MBT-1	Imperiale de Trebizonda x Tonda di Giffoni	12	7
MBT-2	Tombul x Tonda di Giffoni	45	28
MBT-3	Gunslebert x Tonda di Giffoni	12	3
MBT-4	Tonda Bianca x Segorbe	22	9
MBT-5	Segorbe x Tonda di Giffoni	3	2

Els encreuaments es realitzaren seguint la metodologia habitual, encara que s'obtingué un nombre reduït de fruits. La germinació es produí dues/tres setmanes després del tractament de l'avellana amb àcid giberèlic, al cap d'un mes ja es tingueren les plàntules crescudes i es realitzà l'electroforesi.

Per a l'anàlisi isoenzimàtic del gen *Pgi-2* s'utilitzaren les plantes procedents de llavors dels encreuaments MBT-4 i MBT-5, en que els parentals eren heterozigots per a aquest gen; per a l'estudi de *Got-2* les dels encreuaments MBT-1, MBT-2 i MBT-3; essent els genitors heterozigots per a *Got-2*. D'acord amb les nostres prediccions per als dos loci, aparegué un nou fenotip d'una sola banda corresponent a la banda de migració més ràpida per a aquests loci (Fig. 22,23, p.76) que s'atribuí al genotip *aa*, el que confirma l'existència dels gens *Pgi-2* i *Got-2* amb dos al·lels (*a* i *b*). Els resultats obtinguts foren els següents:

LOCUS	GENOTIP	Núm. D'INDIVIDUS
<i>Pgi-2</i>	<i>aa</i>	2
	<i>ab</i>	6
	<i>bb</i>	3
<i>Got-2</i>	<i>aa</i>	2
	<i>ab</i>	24
	<i>bb</i>	12

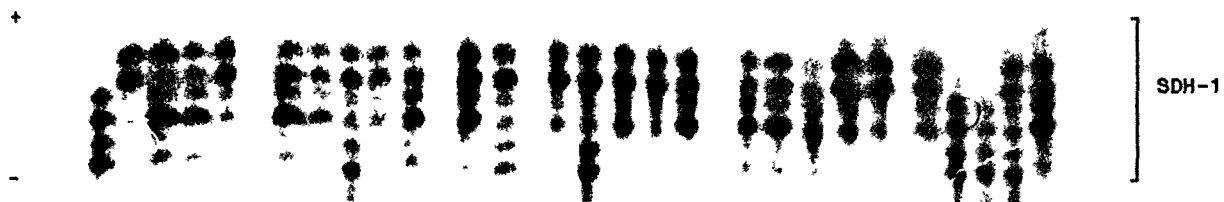


Fig.20.- Zimograma de l'enzim xiquimat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-368.

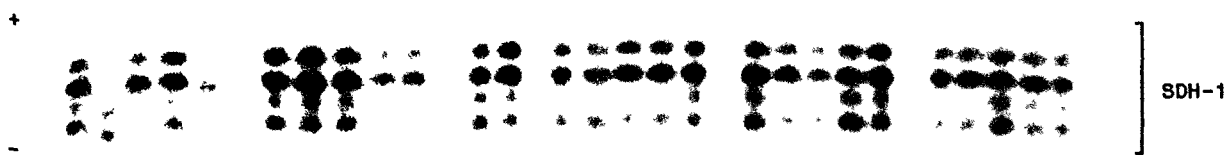


Fig.21.- Zimograma de l'enzim xiquimat deshidrogenasa corresponent a la descendència de l'encreuament H-491

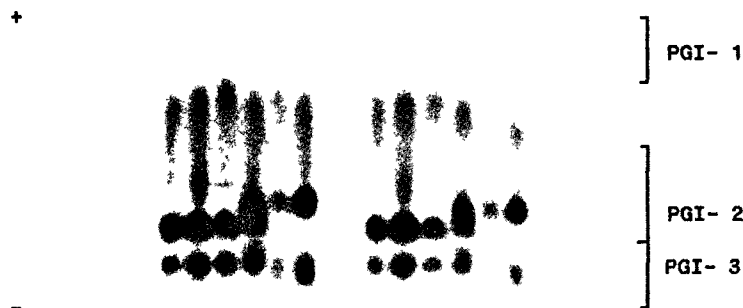


Fig. 22.- Zimograma de l'enzim fosfoglucoisomerasa corresponent a la descendència de l'encreuament MBT-4 (el segon grup és una repetició de les mostres del primer grup). D'esquerra a dreta, els genotips de les 6 mostres són per a *Pgi-2*: *bb*, *bb*, *bb*, *ab*, *aa*, i *aa*; per a *Pgi-3*: *aa*, *aa*, *aa*, *aa*, *cb* i *cb*. S'observa el nou fenotip de *Pgi-2* corresponent a la banda a (mostres 5 i 6).

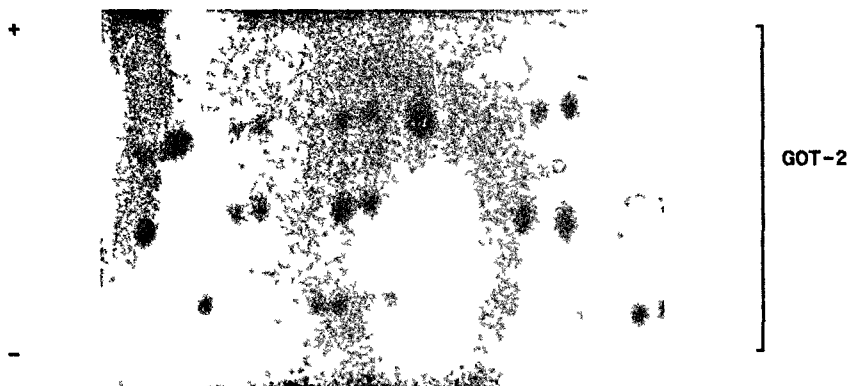


Fig. 23.- Zimograma de l'enzim glutamat oxalacetat transaminasa corresponent a la descendència de l'encreuament MBT-2. D'esquerra a dreta, els genotips de les 12 mostres per a *Got-2* són: *ab*, *aa*, *bb*, *ab*, *ab*, *bb*, *ab*, *ab*, *bb*, *aa*, *ab*, *ab* i *bb*. S'observa el nou fenotip corresponent a la banda a (mostres 2 i 10).

3.1.2.- ANÀLISI DEL LLIGAMENT

Es féu l'anàlisi de les cosegregacions de 40 parelles de loci isoenzimàtics, sobre les 45 combinacions possibles entre els 10 gens estudiats (Taula 16, p.87). Es trobaren diferències significatives entre els valors esperats i els observats sota la hipòtesi de segregació independent en 10 casos, que correspongueren a 8 parelles de gens.

En quatre d'aquestes parelles de gens (*Aco-2-Pgm-2*, *6Pgd-2-Pgm-2*, *Pgm-1-Pgm-3* i *Mdh-1-Pgi-2*) la causa de les desviacions sobre les segregacions esperades si els gens fossin independents era deguda al lligament (Taula 17, p.88). De les quatre parelles de loci restants, tres (*Aco-1-6Pgd-2*, $r=0.39\pm 0.04$; *6Pgd-2-Pgm-1*, $r=0.38\pm 0.04$ i *Pgm-1-Pgm-2*, $r=0.39\pm 0.05$), foren significativament diferents de les esperades segons la hipòtesi d'independència en un encreuament (H-268, H-383 i H-510, respectivament), però aquests resultats no es confirmaren en altres encreuaments en els que aquestes parelles de gens pogueren ésser testades, indicant que el lligament entre aquests gens és molt feble o no existeix. Finalment, tampoc s'ajustà a la hipòtesi d'independència la cosegregació entre *6Pgd-2* i *Got-2* a l'encreuament H-510, però la raó d'aquesta desviació no era el lligament, ja que l'estima de r no fou significativament diferent de 0.5 ($r=0.47\pm 0.09$).

Aquests resultats permeteren confeccionar el següent mapa de lligament en l'avellaner (Fig.24, p.78).

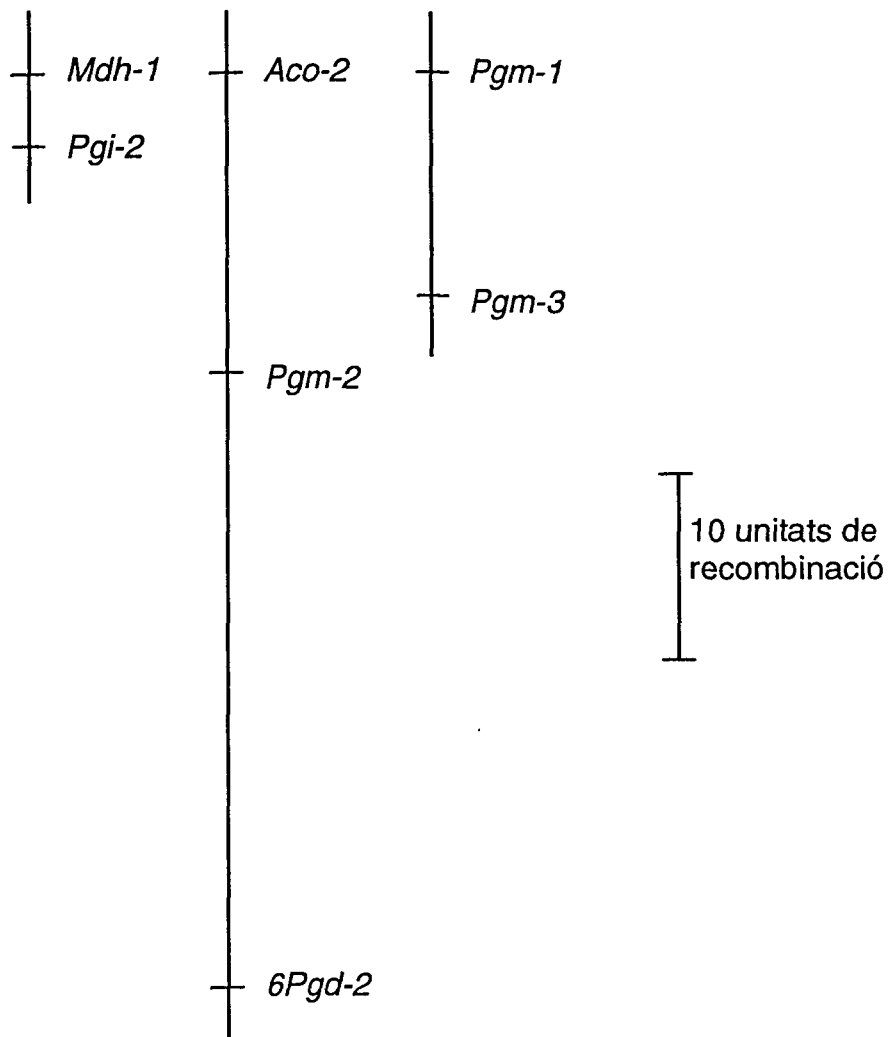


Fig.24.- Mapa de lligament de gens isoenzimàtics en l'avellaner.

TAULA 8 TAMPÓ GEL/ELÈCTRODE, CAPA DEL GEL UTILITZADA, ZONES D'ACTIVITAT, RESOLUCIÓ I VARIABILITAT DELS SISTEMES ENZIMÀTICS ESTUDIATS EN L'AVELLANER

ENZIM	GEL	CAPA DEL GEL	ZONA D'ACTIVITAT	RESOLUCIÓ	VARIABILITAT
ACO	H 7.0	1	ACO-1 ACO-2	bona bona	si si
6PGD	MC 6.1	1	6PGD-1 6PGD-2	mitjana bona	no si
PGI	H 7.0	3	PGI-1 PGI-2 PGI-3	mitjana bona bona	no si si
PGM	H 7.0	2	PGM-1 PGM-2 PGM-3	bona bona bona	si si si
GOT	TC 8.3	3	GOT-1 GOT-2	mitjana bona	no si
IDH	H.7.0	2	IDH-1 IDH-2	dolenta mitjana	- si
MDH	HC 5.7	2	MDH-1 MDH-2 MDH-3	bona bona mitjana	si no no
SDH	MC 6.1	3	SDH-1	mitjana	si

TAULA 9 GENOTIPS DELS PARENTALS UTILITZATS ALS ESTUDIS D'HERÈNCIA PER ALS 10 LOCI VARIABLES

PARENTALS	LOCI VARIABLES									
	Aco-1	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-1	Pgi-2	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1
BUTLER	dd	bb	ab	bb	aa	nn	bb	bb	bb	bb
CORABEL	bc	bb	ab	bb	ac	nn	ab	bb	bb	bb
COSFORD	dd	bb	bb	bb	aa	nn	bb	ab	bb	bb
ENNIS	bd	bb	ab	bb	ac	an	bb	bn	bb	bb
FERTILE DE COUTARD	bd	bb	aa	bb	ac	an	ab	bn	bb	bb
MERVEILLE DE BOLWILER	bb	bb	aa	bb	aa	nn	ab	aa	bb	bb
ROMAI	bc	bc	ac	bb	aa	an	ab	cn	bb	ab
SANTA MARIA DEL GESU	bd	bb	aa	bb	aa	an	ab	bb	bb	bb
SEGORBE	dd	bb	ab	ab	ab	an	bb	bn	bb	bb
TONDA GENTILE DELLE LANGHE	ad	bb	aa	bb	aa	an	ab	dn	bb	bb
TONDA DI GIFFONI	bd	bb	ab	ab	ac	an	ab	bb	ab	ab
TONDA ROMANA	dd	ab	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	ab

TAULA 10 SEGREGACIÓ PER A ACONITASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS PARENTALS		GENOTIPS DESCENDÈNCIES		SEGREGACIÓ ESPERADA		χ^2	g.d.l.	P
Aco-1	H-268	31	dd x bd	bd:21 dd:10	1:1	3.90*	1	0.04			
	H-313	48	bd x dd	bd:22 dd:26	1:1	0.33	1	0.56			
	H-364	44	bd x dd	bd:24 dd:20	1:1	0.36	1	0.55			
	H-368	17	dd x ad	ad:11 dd:6	1:1	1.47	1	0.23			
	H-383	42	bd x bb	bb:19 bd:23	1:1	0.38	1	0.54			
	H-491	45	bc x dd	bd:21 cd:24	1:1	0.20	1	0.65			
	H-501	85	bd x dd	bd:38 dd:47	1:1	0.95	1	0.33			
	H-510	54	bc x bd	bb:14 bc:2 bd:17 cd:21	1:1:1:1	14.89*	3	0.00			
	H-370	53	dd x dd	dd	—	—	—	—			
	Aco-2	H-368	17	ab x bb	ab:1 bb:16	1:1	13.24*	1	0.00		
		H-370	34	ab x bb	ab:9 bb:25	1:1	7.53*	1	0.01		
		H-491	45	bc x bb	bb:21 bc:24	1:1	0.20	1	0.65		
		H-268	32	bb x bb	bb	—	—	—	—		
H-313		50	bb x bb	bb	—	—	—	—			
H-364		44	bb x bb	bb	—	—	—	—			
H-383		46	bb x bb	bb	—	—	—	—			
H-501		85	bb x bb	bb	—	—	—	—			
H-510		54	bb x bb	bb	—	—	—	—			

* P < 0.05

TAULA 11 SEGREGACIÓ PER A 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS		χ ²	g.d.l.	P
			PARENTALS	GENOTIPS DESCENDÈNCIES			
6Pgd-2	H-268	32	ab x ab	aa:9 ab:14 bb:9	1:2:1	2	0.78
	H-313	50	ab x ab	aa:15 ab:25 bb:10	1:2:1	2	0.61
	H-364	44	aa x ab	aa:25 ab:19	1:1	1	0.37
	H-370	33	aa x ab	aa:11 ab:22	1:1	1	0.06
	H-383	46	ab x aa	aa:26 ab:20	1:1	1	0.38
	H-491	45	ac x ab	aa:5 ab:16 ac:14 bc:10	1:1:1:1	3	0.10
	H-510	53	ab x ab	aa:9 ab:36 bb:8	1:2:1	2	6.85*
	H-368	17	aa x aa	aa	—		
	H-501	85	aa x bb	ab	—		

* P < 0.05

TAULA 12 SEGREGACIÓ PER A FOSFOGLUCOISOMERASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS PARENTALS	GENOTIPS DESCENDÈNCIES	SEGREGACIÓ ESPERADA	χ^2	g.d.l.	P
Pgi-2	H-370	33	bb x ab	ab:16 bb:17	1:1	0.03	1	0.86
	H-510	54	bb x ab	ab:27 bb:27	1:1	0.00	1	1.00
	H-268	32	bb x bb	bb	—			
	H-313	50	bb x bb	bb	—			
	H-364	44	bb x bb	bb	—			
	H-368	17	bb x bb	bb	—			
	H-383	46	bb x bb	bb	—			
	H-491	45	bb x bb	bb	—			
	H-501	85	bb x bb	bb	—			
	Pgi-3	H-268	32	aa x ac	aa:14 ac:18	1:1	0.50	1
H-313		52	ac x aa	aa:20 ac:32	1:1	2.77	1	0.10
H-370		34	aa x ab	aa:18 ab:16	1:1	0.12	1	0.73
H-383		46	ac x aa	aa:17 ac:29	1:1	3.13	1	0.08
H-501		86	aa x ac	aa:41 ac:45	1:1	0.19	1	0.67
H-510		52	ac x ac	aa:21 ac:23 cc:10	1:2:1	5.67	2	0.06
H-364		44	aa x aa	aa	—			
H-368		17	aa x aa	aa	—			
H-491		45	aa x aa	aa	—			

TAULA 13 SEGREGACIÓ PER A FOSFOGLUCOMUTASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS		χ ²	g.d.l.	P	
			PARENTALS	DESCENDÈNCIES				
			SEGREGACIÓ					
				ESPERADA				
Pgm-1	H-268	31	nn x an	an:18 nn:13	1:1	1	0.81	
	H-313	53	an x nn	an:26 nn:27	1:1	1	0.02	
	H-364	44	an x nn	an:22 nn:22	1:1	1	0.00	
	H-368	17	nn x an	an:7 nn:10	1:1	1	0.53	
	H-370	34	nn x an	an:12 nn:22	1:1	1	2.94	
	H-383	46	an x nn	an:24 nn:22	1:1	1	0.09	
	H-491	45	an x nn	an:23 nn:22	1:1	1	0.02	
	H-501	86	an x nn	an:42 nn:44	1:1	1	0.05	
	H-510	53	nn x an	an:25 nn:28	1:1	1	0.17	
								0.40
Pgm-2	H-364	44	ab x bb	ab:26 bb:18	1:1	1	1.45	
	H-491	45	ab x bb	ab:26 bb:19	1:1	1	1.09	
	H-510	50	ab x ab	aa:11 ab:30 bb:9	1:2:1	2	2.16	
	H-268	31	bb x bb	bb	—			
	H-313	53	bb x bb	bb	—			
								0.23
								0.30
Pgm-3	H-368	17	ab x dn	ad:1 an:3 bd:6 bn:7	1:1:1:1	3	5.35	
	H-383	46	bn x aa	ab:26 an:20	1:1	1	0.78	
	H-491	45	cn x bb	bc:23 bn:22	1:1	1	0.02	
	H-268	31	bb x bn	b- (bb + bn)	—			
	H-313	53	bn x bb	b- (bb + bn)	—			
	H-364	44	bb x bb	bb	—			
	H-510	53	bb x bb	bb	—			
								0.15
							0.38	
							0.88	

TAULA 14 SEGREGACIÓ PER A GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS		DESCENDÈNCIES	SEGREGACIÓ		χ^2	g.d.l.	P
			PARENTALS	GENOTIPS		ESPERADA				
Got-2	H-510	54	bb x ab		ab:29 bb:25	1:1	0.30	1	0.59	
	H-268	32	bb x bb		bb	—				
	H-313	50	bb x bb		bb	—				
	H-364	44	bb x bb		bb	—				
	H-368	17	bb x bb		bb	—				
	H-370	34	bb x bb		bb	—				
	H-383	46	bb x bb		bb	—				
	H-491	45	bb x bb		bb	—				
	H-501	85	bb x bb		bb	—				

TAULA 15 SEGREGACIÓ PER A MALAT DESHIDROGENASA EN LES DESCENDÈNCIES D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	ENCREUAMENT	N	GENOTIPS		DESCENDÈNCIES	SEGREGACIÓ		χ ²	g.d.l.	P
			PARENTALS	GENOTIPS		ESPERADA				
<i>Mdh-1</i>	H-368	17	ab x bb	ab:3	bb:14	1:1	7.12*	1	0.01	
	H-370	34	ab x bb	ab:15	bb:19	1:1	0.47	1	0.49	
	H-491	45	ab x bb	ab:28	bb:17	1:1	2.69	1	0.10	
	H-510	54	bb x ab	bb:29	ab:25	1:1	0.30	1	0.59	
	H-268	32	bb x bb	bb		—				
	H-313	50	bb x bb	bb		—				
	H-364	44	bb x bb	bb		—				
	H-383	46	bb x bb	bb		—				
	H-501	85	bb x bb	bb		—				

* P < 0.05

TAULA 16 PARELLES DE GENS ON ES VA PODER ESTUDIAR EL LIGAMENT EN ELS ENCREUAMENTS D'AVELLANER ESTUDIATS ¹

	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1
Aco-1	7	1,2,6,7,9	9	1,2,6,8,9	1,2,3,4,5,6,7,8	3,7,9	4,6,7	9	7,9
Aco-2		7	—	—	7	5,7	4,7	—	4,5,7
6Pgd-2			5,9	1,2,5,6,9	1,2,5,6,7,9	7,9	6,7	9	7,9
Pgi-2			5,9	5,9	5,9	9	—	9	9
Pgi-3					1,2,4,5,9	9	6	9	9
Pgm-1						3,7,9	4,6,7	9	8,9
Pgm-2							7	9	5,7,9
Pgm-3								—	4,7
Got-2									9

¹ Els números corresponen als encreuaments següents: 1:H-268, 2:H-313; 3:H-364, 4:H-368, 5:H-370, 6:H-383, 7:H-491, 8:H-501 i 9:H-510

— Parelles de gens on no es va poder estudiar el lligament

TAULA 17 ESTIMA DE LA FREQUÈNCIA DE RECOMBINACIÓ EN LES PARELLES DE GENS QUE MOSTRAREN LLIGAMENT

Parella de gens	Encreuament	Parentals	Genotips de les descendències	χ^2	(r)	ES	(r')	ES	χ^2_a	χ^2_h
Aco-2-Pgm-2	H-491	bc/ab x bb/bb	20 bb/ab; 1 bb/bb; 6 bc/ab; 18 bc/bb	22.65*	0.16	0.054				
6Pgd-2-Pgm-2	H-491	ac/ab x ab/bb	4 aa/ab; 1 aa/bb; 12 ab/ab; 4 ab/bb; 5 ac/ab; 9 ac/bb; 5 bc/ab; 5 bc/bb	6.00	0.33	0.070				
	H-510	ab/ab x ab/ab	3 aa/aa; 3 aa/ab; 3 aa/bb; 6 ab/aa; 24 ab/bb; 2 ab/bb; 1 bb/aa; 3 bb/ab; 4 bb/bb	11.91*	0.30	0.058	0.32	0.045	0.69	
Pgm-1-Pgm-3	H-368	nm/ab x an/dh	0 an/ad; 3 an/an; 0 an/bd; 4 an/bn; 1 nm/ad; 0 nm/an; 6 nm/bd; 3 nm/bn	9.92*	0.18	0.092				
	H-383	an/bn x nm/aa	5 an/ab; 19 an/an; 21 nm/ab; 1 nm/an;	26.00*	0.13	0.050				
	H-491	an/cn x nm/bb	2 an/bc; 21 an/bn; 21 nm/bc; 1 nm/bn	33.87*	0.07	0.038	0.11	0.030	1.82	
Mdh-1-Pgi-2	H-510	bb/bb x ab/ab	0 ab/ab; 25 ab/bb; 27 bb/ab; 2 bb/bb	46.55*	0.04	0.026				

* P < 0.05

(r) Freqüència de recombinació

(r') Freqüència de recombinació conjunta

ES Error estàndard

a Test de χ^2 per a l'homogeneïtat

3.2.- VARIACIÓ ISOENZIMÀTICA DE LES VARIETATS CULTIVADES DE *C. AVELLANA*

3.2.1.- CARACTERITZACIÓ VARIETAL

Per a la caracterització varietal, s'utilitzaren els mateixos sistemes enzimàtics que per a l'estudi genètic (ACO, 6PGD, PGI, PGM, GOT i MDH), obtenint-se bons resultats en les tincions. La poca variabilitat manifestada per als sistemes IDH i SDH (ja observada als estudis de les descendències), i la manca d'una bona resolució per a IDH no permeté utilitzar aquests dos sistemes enzimàtics per a la caracterització varietal.

3.2.1.1.- CLASSIFICACIÓ DE LES VARIETATS BASADA EN ISOENZIMS

El gran polimorfisme isoenzimàtic manifestat per l'espècie *C. avellana* va permetre identificar amb un genotip isoenzimàtic únic 74 de les 119 varietats estudiades. Les 45 varietats restants quedaren agrupades en 13 grups genotípics diferents (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m). Ja que l'estudi previ realitzat en les progènies va permetre establir la genètica dels sistemes enzimàtics, fou possible associar als fenotips apareguts, els genotips corresponents per a totes les varietats i per a tots els gens amb l'excepció de *Pgm-1* i *Pgm-3*, que al tenir al·lels nuls no fou possible saber el seu genotip complet per a algunes varietats. No obstant es van poder determinar els genotips per a aquests dos gens a les varietats que s'utilitzaren com a parentals als encreuaments estudiats. A la Taula 18 (p.95-99) es mostren els genotips per als 10 loci polimòrfics responsables de la variabilitat trobada, de les 119 varietats d'avellaner estudiades.

La variabilitat isoenzimàtica observada en la identificació de les varietats fou idèntica per a tots els sistemes enzimàtics, que l'observada en l'estudi de les descendències. Aparegueren fenotips no detectats en l'anàlisi d'herència als loci *Pgm-3* (bd, cd, c, i n) (Fig.25, p.90) i *Mdh-1* (a). A la Taula 19 (p.100) es mostren els diferents fenotips observats per a cada locus i el nombre de varietats que els presentaren.



Fig.25.- Zimograma de l'enzim fosfoglucomutasa corresponent a 25 varietats d'avellaner. Per a *Pgm-3* apareixen dos nous genotips: *cd*, corresponent a la varietat "Henneman-3" (mostra núm.8); i *bd*, corresponent a la varietat "Jardinera" (mostra núm.13 i 24); D'esquerra a dreta, els genotips complets de totes les varietats són: per a *Pgm-1*: *nn, a-, a-, nn, a-, a-, nn, nn, a-, a-, a-, a-, nn, a-, a-; a-, a-, nn, nn, a-, nn, a-, a-, nn* i *a-*; per a *Pgm-2*: *ab, bb, bb, ab, aa, ab, aa, bb, ab, ab, ab, bb, ab, ab, ab, bb, bb, ab, aa, ab, ab, ab, ab, ab* i *ab*; per a *Pgm-3*: *b-, b-, b-, ab, b-, b-, ab, cd, a-, a-, a-, b-, bd, b-, b-, a-, b-, b-, b-, b-, b-, a-, bd* i *b-*.

Els sistemes que mostraren més polimorfisme i que donaren més informació per a la identificació de varietats foren ACO i PGI, tots dos amb dos gens polimòrfics *Aco-1* amb 4 al·lels (6 fenotips), *Aco-2* amb 3 al·lels (3 fenotips), *Pgi-2* amb 2 al·lels (2 fenotips) i *Pgi-3* amb 3 al·lels (4 fenotips). Contràriament, els sistemes amb menys polimorfisme foren MDH i GOT, ambdós presentant només un locus variable *Mdh-1* i *Got-2* amb 2 al·lels (3 fenotips per a *Mdh-1* i dos per a *Got-2*). 6PGD presentà també un sol gen variable *6Pdg-2* amb 3 al·lels que permeté separar les varietats en 4 fenotips diferents. Finalment, PGM presentà un polimorfisme força alt, però no fou massa útil per a la identificació varietal, degut a l'existència d'al·lels nuls per a dos loci d'aquest sistema (*Pgm-1* i *Pgm-3*). La determinació dels genotips de *Pgm-2*, també resultà difícil per a algunes varietats, ja que era difícil apreciar la banda a del *Pgm-2*, quan tenia superposada, i amb molta més intensitat, la banda a del *Pgm-3*. En aquests casos es determinà el genotip de *Pgm-2*, per la intensitat en la tinció de la banda b d'aquest gen. Quan aquesta banda era intensa, es considerà l'individu homozigot *bb* i quan era menys tenyida es considerà l'heterozigot *ab*. En absència de la banda b l'individu es considerà homozigot *aa*.

Es trobaren només dues varietats amb un fenotip únic per a algun dels loci estudiats: concretament "Tonda Gentile delle Langhe" i "Culplà" tenien els genotips *ad* i *cd*, respectivament a *Aco-1*.

Per a dos gens (*Pgi-2* i *Got-2*), no aparegueren individus homozigots *aa*, i els individus heterozigots es presentaren amb una freqüència molt baixa, el que suggereix que l'al·lel *a* d'ambdós gens és rar en l'avellaner.

3.2.1.2.-GRUPS DE VARIETATS AMB EL MATEIX GENOTIP ISOENZIMÀTIC

Després de la caracterització varietal quedaren els següents grups de varietats amb el mateix genotip isoenzimàtic:

- **Grup a:** "Artellet", "Pauetet", "Planeta" (Espanya), "Santa Maria del Gesu" i "Tonda Italiana" (Itàlia).

- **Grup b:** "Castanyera", "Feliuet", "Grande", "Garroff" (Espanya), "Fertile de Coutard" (França), "Grada" (Portugal) i "Belle de Giubilino" (Itàlia).

- **Grup c:** "Casina" i "Clon La Masó" ("C.L.M.")(Espanya).
- **Grup d:** "Curcia", "Colldejou" i "Segorbe" (Espanya).
- **Grup e:** "Gironell" (Espanya) i "San Giovanni" (Itàlia).
- **Grup f:** "Ferrota", "Laureà", "Llargueta", "Moll", "Negret", "Panser", "Simó", "Sugranyes" i "Víctor" (Espanya).
- **Grup g:** "Apegalós", "Lluenta", "Marxant" i "Pinyolenc" (Espanya).
- **Grup h:** "Febró" i "Morell" (Espanya).
- **Grup i:** "Rosset" i "Selvatà" (Espanya).
- **Grup j:** "Henneman-3" (EUA) i "Macrocarpa" (França).
- **Grup k:** "Palaz" (Turquia) i "Extra Giaghi" (Grècia).
- **Grup l:** "Fructo Albo", "Fructo Rubro" (Zona dels Balcans) i "Jardinera" (Espanya).
- **Grup m:** "Bergeri" (Bèlgica) i "Jemstegaard-5" (EUA).

3.2.1.3.- ESTUDI DE CLONS DE DIFERENTS VARIETATS

Els diferents clons de la mateixa varietat que s'analitzaren isoenzimàticament, resultaren ser idèntics entre ells dins de cada varietat per als 10 gens estudiats.

3.2.2.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS

Els paràmetres poblacionals de *C. avellana* s'estudiaren a partir dels genotips isoenzimàtics de les varietats analitzades. Les sinonímies que es van

corroborar en l'estudi de la caracterització varietal ("Castanyera", "Grada", "Grande" i "Fertile de Coutard") i ("Henneman-3" i "Macrocarpa"), es tingueren presents en aquests estudi: es contemplà només una varietat de cadascun d'aquests dos grups, considerant 115 varietats, en comptes de les 119 caracteritzades. Els valors de les freqüències al·lèliques calculades per a cadascun dels gens isoenzimàtics polimòrfics es poden trobar a la Taula 20 (p.101).

3.2.2.1.- PROPORCIÓ DE GENS POLIMÒRFICS

En els sis sistemes enzimàtics estudiats, es distingiren 15 regions corresponents a 10 loci polimòrfics i 5 regions monomòrfiques que correspondrien a 5 gens fixats (*6Pgd-1*, *Pgi-1*, *Got-1*, *Mdh-2* i *Mdh-3*), el que ens donà un valor de:

$$L(s) = 66.67\%$$

Els 5 gens monomòrfics, es tingueren també en compte en el càlcul de l'heterozigosi esperada i de la identitat genètica entre poblacions.

3.2.2.2.- NOMBRE MIG D'AL·LELS PER LOCUS POLIMÒRFIC

Locus	Núm. al·lèls	Locus	Núm. al·lèls
<i>Aco-1</i>	4	<i>Pgm-1</i>	2
<i>Aco-2</i>	3	<i>Pgm-2</i>	2
<i>6Pgd-2</i>	3	<i>Pgm-3</i>	5
<i>Pgi-2</i>	2	<i>Got-2</i>	2
<i>Pgi-3</i>	3	<i>Mdh-1</i>	2

$$A = 2.8 \text{ al·lèls/locus polimòrfic}$$

3.2.2.3.- HETEROZIGOSI OBSERVADA

Es calculà separatament per als tres grups de varietats de procedència distinta (Turquia, Itàlia i Espanya), i la general de totes les varietats estudiades (Taula 21, p.102). El valor mig d' H_o per al conjunt de totes les varietats, considerant únicament els gens polimòrfics que no presentaren al·lels nuls fou de:

$$H_o=0.32$$

3.2.2.4.- HETEROZIGOSI ESPERADA

Es calcularen també separatament les H_e de Turquia, Itàlia i Espanya i després la de totes les varietats (Taula 22, p.103). A partir del valors d' H_e , s'obtingueren els de l'heterozigosi mitjana per a l'espècie:

$$HET=0.23$$

3.2.2.5.- ÍNDEX DE FIXACIÓ DE WRIGHT

Els valors de l'Índex de Fixació de Wright foren: 0.02 per a *Aco-1*, 0 per a *Aco-2*, 0.06 per a *6Pgd-2*, 0.17 per a *Pgi-2*, -0.09 per a *Pgi-3*, -0.42 per a *Pgm-2*, -0.15 per a *Got-2* i -0.16 per a *Mdh-1*. La mitjana de tots els loci, donà un valor de:

$$F= - 0.07$$

3.2.2.6.- IDENTITAT GENÈTICA

Es calculà la identitat genètica de cada locus comparant els grups de varietats de cada país de dos en dos: Turquia-Itàlia, Turquia-Espanya i Itàlia-Espanya (Taula 23, p.104). La identitat genètica entre totes les subpoblacions estudiades fou de:

$$I=0.95$$

TAULA 18 GENOTIPS DE LES 119 VARIETATS D'AVELLANER ESTUDIADES PER A 10 LOCI ISOENZIMÀTICS

VARIETATS	ORIGEN	Aco-1	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1	I ¹
Alcover	(E)	dd	bb	ab	bb	ac	a-	bb	nn	bb	ab	*
Amandi	(E)	dd	bb	bb	bb	ac	a-	bb	nn	bb	ab	*
Ametllenca	(E)	bc	bb	bb	bb	aa	a-	ab	b-	ab	bb	*
Apegalós	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	a-	ab	a-	bb	bb	g
Artell de Palma	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	nn	bb	ab	bb	bb	*
Artellet	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	bb	a
Badem	(T)	dd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	ab	bb	*
Belle di Giubilino	(I)	bd	bb	aa	bb	ac	an	ab	b-	bb	bb	b
Bergeri	(B)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	m
Butler	(U)	dd	bb	ab	bb	aa	nn	bb	bb	bb	bb	*
Campanica	(I)	bd	bb	ac	bb	aa	a-	ab	b-	bb	bb	*
Casina	(E)	bc	bb	aa	bb	ac	a-	ab	a-	bb	bb	c
Castanyera	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	b
Ceret	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	a-	aa	b-	bb	ab	*
Clon La Masó	(E)	bc	bb	aa	bb	ac	a-	ab	a-	bb	bb	c
Closca Molla	(E)	dd	ab	ac	bb	ac	a-	ab	a-	bb	aa	*
Colldejou	(E)	dd	bb	ab	bb	ab	a-	bb	b-	bb	bb	d
Común Alava	(E)	dd	ab	ac	bb	ac	a-	ab	a-	bb	bb	*
Corabel	(F)	bc	bb	ab	bb	ac	nn	ab	bb	bb	bb	*
Cosford	(RU)	dd	bb	bb	bb	aa	nn	bb	ab	bb	bb	*
Culplà	(E)	cd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	d-	bb	ab	*
Curcia	(E)	dd	bb	ab	bb	ab	a-	bb	b-	bb	bb	d
Daviana	(RU)	dd	bb	bb	bb	aa	nn	ab	b-	bb	bb	*
David	(E)	bc	bb	ab	bb	aa	nn	bb	ab	bb	bb	*
Del Norte	(E)	bd	bb	ac	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	*
Del País	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	a-	aa	ab	bb	ab	*
Downton	(RU)	dd	bb	ab	bb	ac	nn	ab	ab	bb	bb	*

TAULA 18 (continuació)

VARIETATS	ORIGEN	Aco-1	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1	l ¹
Emperatrice Eugenie	(RU)	bd	bb	ab	bb	aa	nn	ab	ab	bb	ab	*
Ennis	(U)	bd	bb	ab	bb	ac	an	bb	bn	bb	bb	*
Enric	(E)	dd	bc	aa	bb	ac	nn	ab	ab	bb	bb	*
Espinaredo	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	a-	bb	ab	*
Extra Giaghli	(G)	dd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	d-	bb	bb	k
Falset	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	nn	aa	a-	bb	bb	*
Febró	(E)	dd	bc	ac	bb	ac	nn	ab	ab	bb	bb	h
Feliuet	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	b
Fertile de Coutard	(F)	bd	bb	aa	bb	ac	an	ab	bn	bb	bb	b
Ferrotà	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Francolí	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	aa	*
Fructo Albo	(ZB)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	ab	bd	bb	ab	l
Fructo Rubro	(ZB)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	ab	bd	bb	ab	l
Garroff	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	b
Gironell	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	b-	ab	bb	e
Grada	(P)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	b
Grande	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	b
Grifoll	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	aa	b-	bb	bb	*
Grosse Longue	(RU)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	bb	ab	bb	bb	*
Gunslebert	(D)	bb	bb	ab	bb	aa	nn	bb	ab	ab	bb	*
Henneman-3	(U)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	bb	cd	bb	bb	j
Imperiale de Trebizonda	(T)	dd	bc	aa	bb	cc	a-	ab	a-	ab	ab	*
Incekara	(T)	dd	bb	aa	bb	aa	nn	bb	ad	bb	ab	*
Jardinera	(E)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	ab	bd	bb	ab	l
Jemstegaard-5	(U)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	m
Kalinkara	(T)	dd	bb	aa	bb	aa	nn	bb	ad	bb	bb	*
Karidaty	(T)	dd	bc	aa	bb	cc	a-	ab	a-	bb	ab	*

TAULA 18 (continuació)

VARIETATS	ORIGEN	Aco-1	Aco-2	6Pg-d-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1	I'
Lansing	(U)	bd	bb	ab	bb	ac	an	ab	aa	bb	bb	*
Laureà	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Llargaeta	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Lluenta	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	a-	ab	a-	bb	bb	g
Macrocarpa	(F)	dd	bb	aa	bb	ac	nn	bb	cd	bb	bb	j
Mallol	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	nn	ab	b-	bb	ab	*
Martinet	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	*
Martorella	(E)	bb	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	ab	bb	*
Marxant	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	a-	bb	a-	bb	bb	g
Merveille de Bolwiler	(F)	bb	bb	aa	bb	aa	nn	ab	aa	bb	bb	*
Moll	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Morell	(E)	dd	bc	ac	bb	ac	nn	ab	ab	bb	bb	h
Mortarella	(I)	bd	bb	ac	bb	ac	an	ab	bn	bb	bb	*
Negret	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	an	ab	bn	bb	ab	f
Negret Capellut	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	aa	ab	bb	ab	*
Negret Primerenc	(E)	bd	bb	bb	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	*
Nocchione	(I)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	ab	bb	bb	*
Nottingham	(RU)	bd	bb	aa	bb	cc	nn	ab	cd	bb	bb	*
Palaz	(T)	dd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	d-	bb	bb	k
Panser	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Pauetet	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	an	ab	b-	bb	bb	a
Pere Mas	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	aa	a-	bb	ab	*
PG La Selva	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	bb	b-	bb	bb	*
Planeta	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	bb	a
Pirineu	(E)	bc	bb	aa	bb	aa	nn	aa	a-	ab	ab	*
Pinyolenc	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	a-	ab	a-	bb	bb	g
Puntxenc	(E)	dd	bb	aa	bb	ac	a-	aa	b-	bb	ab	*

TAULA 18 (continuació)

VARIETATS	ORIGEN	Aco-1	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1	I ¹
Queixal de Llop	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	b-	bb	ab	*
Quexal de Ruc	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	ab	*
Quiros	(E)	bc	bb	aa	bb	ac	a-	ab	a-	ab	ab	*
Ratlada	(E)	dd	bb	ac	bb	aa	a-	ab	c-	ab	bb	*
Ratolí	(E)	dd	bc	aa	bb	aa	a-	aa	a-	bb	ab	*
Riccia di Talanico	(I)	bd	bb	ab	bb	ac	a-	ab	b-	bb	bb	*
Ribet	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	a-	ab	b-	bb	bb	*
Roca	(E)	bb	bb	aa	bb	aa	a-	bb	a-	bb	bb	*
Roig	(E)	bd	bb	aa	bb	ac	a-	ab	nn	ab	ab	*
Romai	(H)	bc	bc	ac	bb	aa	an	ab	cn	bb	ab	*
Ros	(E)	dd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	nn	bb	bb	*
Rosset	(E)	bc	bb	aa	bb	ac	nn	ab	b-	ab	bb	i
Royal	(U)	dd	bb	ab	bb	aa	nn	bb	ab	bb	bb	*
San Giovanni	(I)	bd	bb	aa	bb	aa	nn	ab	b-	ab	bb	e
Santa Maria del Gesu	(I)	bd	bb	aa	bb	aa	an	ab	b-	bb	bb	a
Sant Jaume	(E)	bd	bb	ab	bb	aa	a-	bb	b-	bb	bb	*
Sant Joan	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	nn	aa	ab	bb	ab	*
Sant Pere	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	aa	ab	bb	ab	*
Savall	(E)	bd	bb	ac	bb	aa	nn	ab	a-	bb	bb	*
Segorbe	(E)	dd	bb	ab	bb	ab	an	bb	bn	bb	bb	d
Selvata	(E)	bc	bb	aa	bb	ac	nn	ab	b-	ab	bb	i
Simó	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Sivri	(T)	bb	bb	aa	bb	ac	nn	aa	bd	ab	ab	*
Sugranyes	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Tomasina	(E)	bb	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	*
Tombul	(T)	dd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	nn	ab	bb	*
Tonda Bianca	(I)	bb	bc	ab	ab	ac	nn	bb	b-	ab	bb	*

TAULA 18 (continuació)

VARIETATS	ORIGEN	Aco-1	Aco-2	6Pgd-2	Pgi-2	Pgi-3	Pgm-1	Pgm-2	Pgm-3	Got-2	Mdh-1	I ¹
Tonda Gentile delle Langhe	(I)	ad	bb	aa	bb	aa	an	ab	d-	bb	bb	*
Tonda di Giffoni	(I)	bd	bb	ab	ab	ac	an	ab	b-	ab	ab	*
Tonda Italiana	(I)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	bb	a
Tonda Romana	(I)	dd	ab	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	ab	*
Tonda Rossa	(I)	bb	bb	aa	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	*
Trenet	(E)	bc	bb	ac	bb	ac	a-	ab	a-	bb	bb	*
Valls	(E)	bb	bb	ab	bb	aa	a-	ab	nn	bb	bb	*
Vermellet	(E)	dd	bb	ab	bb	aa	nn	ab	ab	bb	bb	*
Víctor	(E)	bd	bb	aa	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	f
Vimbodí	(E)	bb	bb	aa	bb	aa	nn	ab	b-	bb	ab	*
Xato	(E)	bd	bb	ab	bb	aa	a-	ab	b-	bb	ab	*

ORIGEN: (B): Bèlgica, (D): Alemanya, (E): Espanya, (F): França, (G): Grècia, (H): Hongria, (I): Itàlia, (P): Portugal, (RU): Regne Unit, (T): Turquia, (U): EUA i (ZB): Zona dels Balcans

¹ Identificació varietal: * varietats amb genotip únic

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m, les varietats amb la mateixa lletra presenten el mateix genotip isoenzimàtic

- Es deconeix l'al·lel, (la varietat pot ser homozigòtica per a l'al·lel conegut, o heterozigòtica amb el nul (n))

TAULA 19 GENOTIPS OBSERVATS ALS DIFERENTS SISTEMES ENZIMÀTICS EN L'ESTUDI DE 119 VARIETATS D'AVELLANER

SISTEMA ENZIMÀTIC	GEN POLIMÒRFIC	GENOTIP	Núm. DE VARIETATS
ACO	<i>Aco-1</i>	<i>ad</i>	1
		<i>bb</i>	10
		<i>bc</i>	11
		<i>bd</i>	49
		<i>cd</i>	1
	<i>Aco-2</i>	<i>dd</i>	47
		<i>ab</i>	3
		<i>bb</i>	108
		<i>bc</i>	8
6PGD	<i>6Pgd-2</i>	<i>aa</i>	76
		<i>ab</i>	27
		<i>ac</i>	11
		<i>bb</i>	5
PGI	<i>Pgi-2</i>	<i>ab</i>	6
		<i>bb</i>	113
	<i>Pgi-3</i>	<i>aa</i>	70
		<i>ab</i>	3
		<i>ac</i>	43
		<i>cc</i>	3
PGM	<i>Pgm-1</i>	<i>aa o an</i>	71
		<i>nn</i>	48
	<i>Pgm-2</i>	<i>aa</i>	13
		<i>ab</i>	88
		<i>bb</i>	18
	<i>Pgm-3</i>	<i>ab</i>	24
		<i>ad</i>	2
		<i>aa o an</i>	21
		<i>bd</i>	4
		<i>bb o bn</i>	53
		<i>cd</i>	3
		<i>cc o cn</i>	2
	<i>dd o dn</i>	4	
	<i>nn</i>	6	
GOT	<i>Got-2</i>	<i>ab</i>	17
		<i>bb</i>	102
MDH	<i>Mdh-1</i>	<i>aa</i>	2
		<i>ab</i>	43
		<i>bb</i>	74

TAULA 20 FREQUÈNCIES AL·LÈLIQUES (p) ALS GRUPS DE VARIETATS D'ORIGEN TURC (8), ITALIÀ (13) I ESPANYOL (74), I AL TOTAL DE LES 115 VARIETATS D'AVELLANER ESTUDIADAES

LOCUS	AL·LEL	TURQUIA		ITALIA		ESPANYA		TOTES LES VARIETATS	
		N ¹	p	N	p	N	p	N	p
<i>Aco-1</i>	<i>a</i>	—	—	1	0.04	—	—	1	0.00
	<i>b</i>	2	0.13	13	0.50	50	0.34	77	0.33
	<i>c</i>	—	—	—	—	10	0.07	12	0.05
	<i>d</i>	14	0.88	12	0.46	88	0.59	140	0.61
<i>Aco-2</i>	<i>a</i>	—	—	1	0.04	2	0.01	3	0.01
	<i>b</i>	14	0.88	24	0.92	142	0.96	219	0.95
	<i>c</i>	2	0.13	1	0.04	4	0.03	8	0.03
<i>6Pgd-2</i>	<i>a</i>	16	1.00	21	0.81	118	0.80	182	0.79
	<i>b</i>	—	—	3	0.12	22	0.15	37	0.16
	<i>c</i>	—	—	2	0.08	8	0.05	11	0.05
<i>Pgi-2</i>	<i>a</i>	—	—	2	0.08	4	0.03	6	0.03
	<i>b</i>	16	1.00	24	0.92	144	0.97	224	0.97
<i>Pgi-3</i>	<i>a</i>	9	0.56	21	0.81	123	0.83	182	0.79
	<i>b</i>	—	—	—	—	3	0.02	3	0.01
	<i>c</i>	7	0.44	5	0.19	22	0.15	45	0.20
<i>Pgm-1²</i>	<i>a</i>	—	0.37	—	0.41	—	0.43	—	0.36
	<i>n</i>	—	0.63	—	0.59	—	0.57	—	0.64
<i>Pgm-2</i>	<i>a</i>	7	0.44	14	0.54	74	0.50	111	0.48
	<i>b</i>	9	0.56	12	0.46	74	0.50	119	0.52
<i>Pgm-3²</i>	<i>a</i>	—	0.26	—	0.09	—	0.24	—	0.23
	<i>b</i>	—	0.13	—	0.66	—	0.44	—	0.44
	<i>c</i>	—	—	—	—	—	0.01	—	0.02
	<i>d</i>	—	0.22	—	0.06	—	0.02	—	0.06
	<i>n</i>	—	0.39	—	0.18	—	0.29	—	0.25
<i>Got-2</i>	<i>a</i>	4	0.25	3	0.12	9	0.06	17	0.07
	<i>b</i>	12	0.75	23	0.88	139	0.94	213	0.93
<i>Mdh-1</i>	<i>a</i>	4	0.25	2	0.08	36	0.24	46	0.20
	<i>b</i>	12	0.75	24	0.92	112	0.76	184	0.80

¹ Nombre de vegades que s'ha observat l'al·lel

² Les freqüències de cada al·lel als gens amb al·lells nuls, s'han estimat com s'explica a l'apartat 2.2.3.7.



TAULA 21 VALORS DE L'HETEROZIGOSI OBSERVADA (H_o) EN ELS GENS ISOENZIMÀTICS POLIMÒRFICS

LOCUS ²	TURQUIA (8) ¹		ITÀLIA (13)		ESPANYA (74)		TOTES LES VARIETATS (115)	
	het. ³	%	het.	%	het.	%	het.	%
<i>Aco-1</i>	0	0.00	10	0.77	41	0.55	59	0.51
<i>Aco-2</i>	2	0.25	2	0.15	6	0.08	11	0.10
<i>6Pgd-2</i>	0	0.00	5	0.38	24	0.32	38	0.33
<i>Pgi-2</i>	0	0.00	2	0.15	4	0.05	6	0.05
<i>Pgi-3</i>	3	0.38	5	0.38	25	0.34	42	0.37
<i>Pgm-2</i>	5	0.63	12	0.92	52	0.70	82	0.71
<i>Got-2</i>	4	0.50	3	0.23	9	0.12	17	0.15
<i>Mdh-1</i>	4	0.50	2	0.15	32	0.43	42	0.37
H_o^4		0.28		0.39		0.32		0.32

¹ Entre parèntesi, nombre de varietats estudiades de cada procedència

² No s'han inclòs els gens *Pgm-1* i *Pgm-3*, perquè al tenir al·lels nuls no era possible saber el nombre d'heterozigots entre els grups de fenotips que tenien una sola banda

³ Individus heterozigots a cada locus

⁴ H_o mitjana dels 8 loci estudiats

TAULA 22 VALORS DE L'HETEROZIGOSI ESPERADA (He) EN ELS GENS ISOENZIMÀTICS ESTUDIATS

LOCUS	TURQUIA (8)¹	ITÀLIA (13)	ESPANYA (74)	TOTES LES VARIETATS (115)
<i>Aco-1</i>	0.21	0.54	0.53	0.52
<i>Aco-2</i>	0.21	0.15	0.08	0.10
<i>6Pgd-1</i>	0	0	0	0
<i>6Pgd-2</i>	0	0.32	0.34	0.35
<i>Pgi-1</i>	0	0	0	0
<i>Pgi-2</i>	0	0.15	0.06	0.06
<i>Pgi-3</i>	0.49	0.31	0.29	0.34
<i>Pgm-1</i>	0.47	0.48	0.49	0.46
<i>Pgm-2</i>	0.49	0.50	0.50	0.50
<i>Pgm-3</i>	0.71	0.52	0.66	0.68
<i>Got-1</i>	0	0	0	0
<i>Got-2</i>	0.38	0.21	0.11	0.13
<i>Mdh-1</i>	0.38	0.15	0.36	0.32
<i>Mdh-2</i>	0	0	0	0
<i>Mdh-3</i>	0	0	0	0
HET	0.22	0.22	0.23	0.23

¹ Entre parèntesi, nombre de varietats estudiades de cada procedència

TAULA 23 IDENTITAT GENÈTICA ENTRE SUBPOBLACIONS DE *C. AVELLANA*

LOCUS	TURQUIA-ITÀLIA	TURQUIA-ESPANYA	ITÀLIA-ESPANYA
<i>Aco-1</i>	0.78	0.92	0.96
<i>Aco-2</i>	1.00	0.99	1.00
<i>6Pgd-2</i>	0.99	0.98	1.00
<i>Pgi-2</i>	1.00	1.00	1.00
<i>Pgi-3</i>	0.90	0.88	1.00
<i>Pgm-1</i>	1.00	0.98	0.96
<i>Pgm-2</i>	1.00	1.00	1.00
<i>Pgm-3</i>	0.72	0.71	0.92
<i>Got-2</i>	0.97	0.97	0.99
<i>Mdh-1</i>	0.97	1.00	0.97
I¹	0.93	0.95	0.98

¹ Estima de la identitat genètica conjunta

4.-DISCUSSIÓ

4.1.- GENÈTICA DELS ISOENZIMS

4.1.1.- ESTUDIS D'HERÈNCIA

L'estudi d'herència de sis sistemes enzimàtics en l'avellaner ens ha permès establir la base genètica de 10 gens isoenzimàtics variables en aquesta espècie (*Aco-1*, *Aco-2*, *6Pgd-2*, *Pgi-2*, *Pgi-3*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgm-3*, *Got-2* i *Mdh-1*) i identificar 5 regions addicionals: 6PGD-1, PGI-1, GOT-1, MDH-2 i MDH-3 aparentment monomòrfiques. Els enzims presents en aquestes regions, podrien estar codificats per 5 loci (*6Pgd-1*, *Pgi-1*, *Got-1*, *Mdh-2* i *Mdh-3*), fixats pel mateix al·lel en totes les plantes estudiades.

De les 46 segregacions analitzades en aquest treball, 6 han presentat desviacions respecte a les proporcions esperades, el que representa un 13% de casos. Les distorsions en les segregacions són un fenomen freqüent que s'ha trobat a la majoria d'espècies on s'ha estudiat la genètica dels isoenzims (Wendel i Weeden, 1990). El lligament entre alguns isoenzims i altres gens o segments de cromosomes que estiguessin sotmesos a forta selecció en estadis pre o post zigòtics, sembla la causa més probable de moltes d'aquestes desviacions. Zamir i Tadmor (1986) van estimar en un gran nombre de descendències entre espècies dels gèneres *Lens*, *Capsicum* i *Lycopersicon* la proporció de segregacions no mendelianes als gens isoenzimàtics en encreuaments intra i interespecífics, trobant que hi havia una proporció mitjana del 13% en els primers i del 54% en els segons. Per bé que Torres (1990) considera que les distorsions en les segregacions es produeixen més freqüentment en fruiters que en altres espècies de plantes, la proporció de 13% que nosaltres hem trobat en l'avellaner coincideix amb l'estimada per Zamir i Tadmor (1986) en espècies herbàcies, suggerint que es tracta d'un percentatge de segregacions distorsionades que podem considerar dins la normalitat.

Seguidament es presenta una anàlisi detallada dels resultats obtinguts en els sistemes enzimàtics que hem analitzat en l'avellaner, comparant aquest resultat amb els obtinguts per altres autors en diferents espècies, respecte a estructura quaternària de l'enzim, polimorfisme, nombre de gens per sistema

enzimàtic i altres característiques que hem considerat d'interès en la genètica i evolució de *C. avellana*.

S'ha posat un èmfasi especial en comparar els resultats d'aquest treball amb els coneguts en altres espècies incloses dins la Fruticultura (un resum dels treballs sobre herència d'isoenzims en aquestes espècies es pot trobar a la Taula 24, p.114). Aquesta comparació més detallada no es deu a la presumpció d'un major nivell de similaritat genètica entre l'avellaner i altres conreus fruiters que entre aquell i les demás espècies cultivades, sinó a l'interès professional superior que, per a una persona dedicada a la recerca en Fruticultura té el coneixement en profunditat de la genètica de les espècies incloses dins d'aquesta àrea de l'Agricultura.

4.1.1.1.- ACONITASA

L'aconitasa és un enzim monomèric on s'han descrit de 1 a 3 gens nuclears en espècies diploides (Kephart, 1990). L'enzim s'ha localitzat al citosol i a les mitocòndries (Weeden i Wendel, 1990).

Els resultats obtinguts en l'avellaner confirmen l'estructura quaternària monomèrica de l'enzim ja que els fenotips dels individus heterozigots han presentat la suma de les bandes dels dos homozigots sense cap banda híbrida intermèdia, indistintament del teixit utilitzat (fulla o pol·len). La descripció de 2 gens per a aquesta espècie com a responsables del polimorfisme manifestat està d'acord també en el que s'ha trobat en la majoria d'espècies diploides.

La informació que es té sobre l'aconitasa en general, i concretament en espècies de fruiters (Taula 25, p.115) és bastant escassa en comparació amb altres sistemes enzimàtics. En les espècies on s'ha estudiat s'ha confirmat la presència de dos o tres gens responsables del polimorfisme. Es pot destacar el cas de la xirimoia on s'han descrit tres gens, un d'ells (*Aco-3*), actiu en fulla però no en endosperm (Lee i Ellstrand, 1987).

4.1.1.2.- 6-FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA

En les espècies on s'ha estudiat aquest enzim, s'ha posat de manifest la naturalesa dimèrica del 6PGD (Gottlieb, 1981; Weeden i Wendel, 1990; Aletà et al., 1993). En la majoria d'espècies diploides hi ha dos gens nuclears per a aquest enzim, els productes dels quals estan localitzats un al citosol i l'altre a les plàstides (Gottlieb, 1982; Weeden, 1983).

L'existència en l'avellaner de dos gens (*6Pgd-1* i *6Pgd-2*) localitzats en dos compartiments subcel·lulars diferents (no formen dímers intergènics), concorda amb aquesta descripció general. També queda confirmada l'estructura dimèrica de l'enzim amb la presència de tres bandes (més intensa la del mig), als individus heterozigots en els teixits de fulla, i l'absència de la banda intermèdia en extractes de pol·len (com és d'esperar en teixits haploides als enzims dimèrics).

A la Taula 26 (p.116) es mostra el polimorfisme del 6PGD en diferents espècies de fruiters. Es pot destacar la presència de més de dos gens en la pomera. Aquests dos gens (*6Pgd-2* i *6Pgd-3*) formen dímers intergènics el que indica una duplicació dels mateixos. Weeden i Lamb (1987), proposaren la seva localització al citosol, i Manganaris (1989), va determinar que aquests dos gens no estan lligats. Un cas també a destacar, és el del noguer on hi ha dos gens capaços de formar dímers intergènics que no estan lligats (Aletà et al., 1993).

4.1.1.3.- FOSFOGLUCOISOMERASA

El PGI és un enzim dimèric que en les espècies vegetals diploides està generalment codificat per dos gens nuclears (Gottlieb, 1982; Weeden i Wendel, 1990). Un dels dos isoenzims està localitzat al citosol i l'altre a les plàstides (Kephart, 1990). Quan s'han descrit més de dos gens, s'ha observat la formació de dímers intergènics, el que indica l'existència de duplicacions.

Els resultats trobats en l'avellaner per a aquest enzim estan d'acord amb les observacions esmentades. La naturalesa dimèrica del PGI està recolzada pel fet que els heterozigots per a *Pgi-2* presenten tres bandes als estudis realitzats en teixit de fulla i dues bandes als extractes en pol·len (sense la banda híbrida

intermèdia). Els tres isoenzims detectats estarien en dos compartiments diferents, *Pgi-1* en un, i *Pgi-2* i *Pgi-3* en l'altre, com es dedueix del fet que aquests dos gens formen dímers intergènics. El fet que *Pgi-2* i *Pgi-3* no estiguin lligats indica que no es tracta d'una duplicació tàndem.

Per al PGI, s'ha observat que els isoenzims del citosol solen ser variables mentre que els de les plàstides acostumen a ser monomòrfics (Weeden i Wendel, 1990). Tot i que no s'han fet assaigs en avellaner per determinar la localització subcel·lular dels isoenzims del PGI, aquesta informació avalaria la hipòtesi de que els productes de *Pgi-1* (monomòrfic) es localitzarien a les plàstides, mentre que els de *Pgi-2* i *Pgi-3* (polimòrfics) ho farien al citosol. El fet que els isoenzims del PGI de les plàstides acostumin a tenir una migració més anòdica que els del citosol (Weeden i Gottlieb, 1980) confirma aquesta observació, per bé que aquesta evidència no és gaire forta ja que s'han trobat casos en els que això no es compleix (Weeden i Wendel, 1990).

En la major part de les espècies de fruiters en les que s'ha estudiat aquest enzim (Taula 27, p.117-118), s'han observat dos gens en dos compartiments subcel·lulars diferents. Hi ha també algun exemple de duplicacions, particularment d'enzims citosòlics en l'alvocater i en la pomera, on l'activitat del PGI ve determinada per tres gens. Estudis en altres espècies, posen de manifest que aquestes duplicacions també es poden produir a les plàstides (Weeden i Wendel, 1990).

4.1.1.4.- FOSFOGLUCOMUTASA

Aquest enzim és monomèric en les espècies de plantes en les que s'ha estudiat (Kephart, 1990) i està codificat per dos gens nuclears, un dels quals s'expressa al citosol i l'altre a les plàstides en la majoria d'espècies diploides (Gottlieb, 1982; Weeden i Wendel, 1990).

La interpretació genètica d'aquest sistema enzimàtic, ha resultat complexa en l'avellaner degut a l'existència de zones d'activitat i al·loenzims superposats, i també a la presència d'al·lels nuls. Gràcies però, a la bona resolució obtinguda en els zimogrames, ha estat possible arribar a establir i testar una hipòtesi sobre la genètica d'aquest enzim en el que hi intervenen tres gens, dos d'ells (*Pgm-1* i *Pgm-3*) amb al·lels nuls, i un tercer *Pgm-2* només amb al·lels actius.

La presència de tres gens suggereix que hi ha una duplicació. No obstant, al ser el PGM un enzim monomèric i a diferència de quan es tracta d'enzims dimèrics en els que els gens duplicats formen dímers intergènics, no és possible amb la informació de que disposem determinar quina és la parella de gens duplicada. Una manera de saber-ho, seria estudiant la localització subcel·lular de cada isoenzim i, en cas de trobar-ne dos que s'expressessin al mateix compartiment, serien aquests probablement els que s'haurien originat a partir d'una duplicació.

Una característica associada sovint al fenomen de la duplicació és la presència d'al·lels nuls (Weeden i Wendel, 1990), que es poden mantenir a freqüències relativament elevades ja que si hi ha dos gens en funcionament és molt més difícil que puguin produir-se individus sense enzim actiu i probablement letals. *Pgm-1* i *Pgm-3* tenen freqüències considerables per a un al·lel nul cadascun (estimades en 0.65 i 0.25, respectivament). Aquest motiu els fa els candidats més probables, a falta de dades més conclusives, com a parella de gens duplicats. També s'ha trobat lligament entre *Pgm-1* i *Pgm-3*, suficientment feble però ($r=0.11$), com per descartar que es tracti d'una duplicació tàndem.

El PGM ha estat analitzat en moltes espècies de fruiters, on s'han trobat en general dos gens codificant per a la variabilitat observada en aquest enzim (Taula 28, p.119-120). Una excepció és la pomera amb quatre. No és sorprenent però, l'alt nombre d'isoenzims d'aquesta espècie al PGM i en altres sistemes enzimàtics ja que en base a evidències citogenètica i isoenzimàtica, es tracta d'una espècie al·lotetraploide (Chevreau, 1984). Es pot destacar també la descripció d'al·lels nuls per a aquest sistema en l'albercoquer (Byrne, 1990).

4.1.1.5- GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA

L'herència i la variabilitat d'aquest enzim s'ha estudiat a moltes espècies de plantes. L'anàlisi genètica ha demostrat que els isoenzims del GOT de les plantes són dimèrics (Kephart, 1990). En la majoria de plantes s'han descrit 3 o 4 gens nuclears responsables del polimorfisme del GOT (Gottlieb, 1982). Els isoenzims s'han localitzat a les mitocòndries, citosol, cloroplasts i microcossos (Newton, 1983).

Els resultats obtinguts en l'avellaner confirmen l'estructura dimèrica de l'enzim, al observar-se per a *Got-2* en teixit de fulla la banda híbrida intermèdia als individus heterozigots, a més de les bandes dels homozigots, i ser-hi absent als extractes de pol·len.

A la Taula 29 (p.121) es mostra el polimorfisme que s'ha trobat en fruiters. Es pot destacar el cas de la palmera de dàtils, on al locus *Got-1* hi ha un genotip (s/s) que només s'ha trobat en individus mascle i no en individus femella (Torres i Tisserat, 1980). En arbres de fruita seca no hi ha gaires exemples d'estudis de la genètica del GOT. Només es coneixen referències en ametller on hi ha dos gens polimòrfics responsables de la variabilitat manifestada.

4.1.1.6.- MALAT DESHIDROGENASA

L'estructura dimèrica de l'enzim i la seva l'herència Mendeliana s'ha posat de manifest en les espècies on s'ha estudiat (Kephart, 1990). Als estudis realitzats en plantes, s'han descrit en la majoria dels casos almenys 3 gens nuclears que codifiquen per MDH (Gottlieb, 1982). Els isoenzims s'han localitzat al citosol, mitocòndries i microcossos (Weeden i Wendel, 1990).

En l'avellaner l'estructura quaternària de l'enzim és també dimèrica, ja que quan s'ha utilitzat teixit de fulla els individus heterozigots han presentat, a més de les bandes dels homozigots, la banda híbrida intermèdia, característica dels enzims dimèrics, mentre que aquesta banda era absent als fenotips dels extractes de pol·len. La localització de 3 gens en l'avellaner està d'acord amb el nombre descrit en altres espècies diploides. En aquest cas només un dels gens és polimòrfic el que ha facilitat la interpretació genètica del MDH.

S'observa un gran polimorfisme d'aquest sistema enzimàtic en els diferents fruiters on s'ha estudiat (Taula 30, p.122-123). En molts casos, l'MDH presenta una complexitat que fa difícil la seva interpretació genètica, com en són exemples el pecaner (Marquard, 1987), el noguer amb la presència de dues zones de dímers intergènics (Aletà et al., 1993), l'alvocater amb superposició de bandes entre diferents zones d'activitat (Torres i Bergh, 1980) o la pomera (Manganaris, 1989), on es presenten gens duplicats i bandes superposades.

4.1.2.- ANÀLISI DEL LLIGAMENT

De les 8 parelles de gens, les cosegregacions dels quals van mostrar desviacions significatives de la hipòtesi d'independència, tres (*Aco-1-6Pgd-2*, *6Pgd-2-Pgm-1* i *Pgm-1-Pgm-2*) van ser descartades perquè els resultats que indicaven lligament no eren consistents en les diverses descendències que es podien fer servir per analitzar-los, i una (*6Pgd-2-Got-2*) perquè la distorsió en la cosegregació no era deguda al lligament. Les quatre restants (*Aco-2-Pgm-2*, *6Pgd-2-Pgm-2*, *Pgm-1-Pgm-3* i *Mdh-1-Pgi-2*), es van considerar lligades, el que va permetre confeccionar el primer mapa de lligament de l'avellaner amb tres grups: un amb tres gens (*Aco-2*, *Pgm-2* i *6Pgd-2*), i dos més amb dos gens (*Pgm-1*, *Pgm-3* i *Mdh-1*, *Pgi-2*). Els tres gens no inclosos en aquests grups es van considerar independents i, afegits als anteriors podrien marcar com a màxim sis dels onze cromosomes de l'avellaner.

A la Taula 31 (p.124) es mostren els grups de lligament que es coneixen en diferents espècies de fruiters, la informació no és gaire extensa, però en els darrers anys s'està realitzant un important esforç per al desenvolupament de mapes de lligament en moltes d'elles (Torres, 1990). Cap dels lligaments detectats en fruiters s'assembla a algun dels que hem observat en l'avellaner, el que no és sorprenent donada la poca informació de la que es disposa sobre lligaments a aquestes espècies i a la llunyania filogenètica existent entre *C. avellana* i les altres espècies en les que hi ha aquest tipus de dades. No és aquest el cas de les espècies molt més properes, com l'ametller, el cirerer i la pomera, on es detecta lligament entre un gen de LAP i un de GOT (AAT) a les tres espècies, i un gen de IDH i un de GOT (AAT) a l'ametller i la pomera. La conservació de grups de lligament s'ha vist en molts altres casos, i de fet s'ha observat el manteniment de lligament entre gens isoenzimàtics de gèneres molt allunyats com *Gossypium*, *Camellia* i *Pinus* (Weeden i Wendel, 1990).

Els resultats d'herència i lligament d'isoenzims poden tenir un gran interès aplicat a la millora de l'avellaner si s'aconsegueix trobar lligament entre aquests marcadors i loci responsables de caràcters qualitius o quantitius de valor econòmic en aquesta espècie. Un resum de les dades de lligaments trobats entre isoenzims i caràcters morfològics en fruiters es pot veure a la Taula 32 (p.125). Cal destacar que el lligament trobat en pomera entre *Got-1* i el gen d'autoincompatibilitat (Manganaris i Alston, 1987), seria molt interessant

si també pogués detectar-se una associació semblant en avellaner, ja que la incompatibilitat en aquesta espècie està regulada, igualment per una sèrie al·lèlica "S" d'incompatibilitat (Thompson, 1979), amb la diferència que en la pomera la incompatibilitat és gametofítica i en l'avellaner és esporofítica.

TAULA 24 ESPÈCIES DE FRUITERS ON S'HAN REALITZAT ESTUDIS D'HERÈNCIA D'ISOENZIMS

ESPÈCIES	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<u>Arbres de fruita seca</u>	
Ametller (<i>Prunus amygdalus</i> L.)	Hauagge et al., 1987a; Arús et al., 1993
Avellaner (<i>Corylus avellana</i> L.)	Rovira et al., 1993
Castanyer (<i>Castanea</i> spp.)	Anagnostakis, 1991
Noguer (<i>Juglans regia</i> L.) (<i>Juglans</i> spp.)	Arulsekar et al., 1986b; Aletà et al., 1993 Arulsekar et al., 1985
Pecaner (<i>Carya illinoensis</i> C. Koch.)	Marquard, 1987 i 1991; Marquard i Skorpenske, 1989
<u>Altres fruiters</u>	
Albercoquer (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	Byrne, 1989 i 1990
Alvocater (<i>Persea americana</i> Mill.)	Torres i Bergh, 1980; Goldring et al., 1985
Cirerer (<i>Prunus avium</i> L.)	Santi i Lemoine, 1990
Cítrics (<i>Citrus</i> spp.)	Soost i Torres, 1981; Durham et al., 1992
Figuera (<i>Ficus carica</i> L.)	Torres, 1990*
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	Degani et al., 1992
Olivera (<i>Olea europaea</i> L.)	Ouazzani et al., 1993
Palmera de dàtils (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	Torres i Tisserat, 1980
Pomera (<i>Malus</i> spp.)	Weeden i Lamb, 1987; Manganaris, 1989; Manganaris i Alston, 1987, 1988b, 1992a, 1992b i 1992c
Presseguer (<i>Prunus persica</i> (L) Batsch.)	Durham et al., 1987; Werner, 1992; Mowrey et al., 1990
<i>Prunus</i> spp.	Mowrey et al., 1990; Goffreda et al., 1991
Vinya (<i>Vitis</i> spp.)	Parfitt i Arulsekar, 1989
Xirimoia (<i>Annona cherimola</i> Mill.)	Lee i Ellstrand, 1987

* Revisió bibliogràfica

TAULA 25 VARIABILITAT DE L'ENZIM ACONITASA (ACO) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<u>Arbres de fruita seca</u>			
Ametller	2	Aco-1, 3 al·l els (1 al·l el nul) Aco-2, variable	Arús et al., 1993
<u>Altres fruiters</u>			
Xirimoia	3	Aco-1, 2 al·l els Aco-3, actiu en fulla, inactiu en endosperm	Lee i Ellstrand, 1987

(1) Gens polimòrfics

TAULA 26 VARIABILITAT DE L'ENZIM 6 FOSFOGLUCONAT DESHIDROGENASA (6PGD) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	
<u>Arbres de fruita seca</u>				
Ametller	2	2	els dos gens amb 2 al·lels cadascun	Hauagge et al., 1987a; Arús et al., 1993
Noguer	2	1	6Pgd-1, monomòrfic 6Pgd-2, 3 al·lels (formació de dímers intergènics)	Aletà et al., 1993
<u>Altres fruiters</u>				
Albercoquer	2	1	6PGD-1, zona monomòrfica 6Pgd-2, 2 al·lels	Byrne, 1990
Cítrics	2	2	6Pgd-1 i 6Pgd-2 (diferències entre espècies)	Durham et al., 1992
Pomera	3	3	6Pgd-1, 6 al·lels (plàstides) 6Pgd-2 i 6Pgd-3 (citòsol, polimòrfics, amb formació de dímers intergènics)	Weeden i Lamb, 1987; Manganaris, 1989
Xirimoia	2	1	6Pgd-1, 2 al·lels 6Pgd-2, monomòrfic	Lee i Eilstrand, 1987

(1) Gens polimòrfics

TAULA 27 VARIABILITAT DE L'ENZIM FOSFOGLUCOISOMERASA (PGI) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<i>Arbres de fruita seca</i>			
Ametller	2 1	PGI-1, zona monomòrfica <i>Pgi-2</i> , polimòrfic	Hauagge et al., 1987a; Arús et al., 1993
Pecaner	2 1	<i>Pgi-1</i> , monomòrfic <i>Pgi-2</i> , 3 al·lels	Marquard, 1987
<i>Altres fruiters</i>			
Alvocater	3 2	<i>Pgi-1</i> , monomòrfic (plàstides) <i>Pgi-2</i> i <i>Pgi-3</i> , molt polimòrfics (citosol, duplicació de gens)	Goldring et al., 1985
Cítrics	+	variabilitat segons les espècies	Soost i Torres, 1981
Olivera	2 1	PGI-1, zona poc clara <i>Pgi-2</i> , polimòrfic	Ouazzani et al., 1993
Palmera de dàtils	2 1	<i>Pgi-1</i> , 2 al·lels PGI-2, zona monomòrfica	Torres i Tisserat, 1980
Pomera	3 3	<i>Pgi-1</i> , (plàstides) <i>Pgi-2</i> i <i>Pgi-3</i> (citosol, duplicació de gens, lligats)	Weeden i Lamb, 1987; Manganaris, 1989

(1) Gens polimòrfics

+ Presència de polimorfisme

TAULA 27 (continuació)

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Vinya	2	PGI-1, zona monomòrfica Pgi-2, polimòrfic amb molts al·lels	Parfitt i Arulsekar, 1989
Xirimoia	1	Pgi-1, 2 al·lels	Lee i Ellstrand, 1987

(1) Gens polimòrfics

TAULA 28 VARIABILITAT DE L'ENZIM FOSFOGLUCOMUTASA (PGM) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<i>Arbres de fruita seca</i>			
Ametller	2	<i>Pgm-1</i> , 2 al·lells <i>Pgm-2</i> , 3 al·lells	Hauagge et al., 1987a; Arús et al., 1993
Noguer	2	<i>Pgm-1</i> , 2 al·lells <i>Pgm-2</i> , monomòrfic	Arulsekar et al., 1986b; Alejà et al., 1993
Pecaner	1	<i>Pgm-1</i> , 3 al·lells	Marquard, 1991
<i>Altres fruiters</i>			
Albercoquer	2	<i>Pgm-1</i> , 2 al·lells <i>Pgm-2</i> , 3 al·lells (2 actius i 1 nul)	Byrne, 1989
Alvocater	2	<i>Pgm-1</i> , 4 al·lells <i>Pgm-2</i> , 2 al·lells	Torres i Bergh, 1980
Cítrics	+	variabilitat segons les espècies	Soost i Torres, 1981
Olivera	2	PGM-1, zona monomòrfica <i>Pgm-2</i> , 2 al·lells	Ouazzani et al., 1993

(1) Gens polimòrfics
+ Presència de polimorfisme

TAULA 28 (continuació)

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Palmera de dàtils	1	<i>Pgm-1</i> , 2 al·lels	Torres i Tisserat, 1980
Pomera	4	<i>Pgm-1</i> , <i>Pgm-3</i> , <i>Pgm-4</i> , 4 al·lels <i>Pgm-2</i> , 2 al·lels <i>Pgm-1</i> i <i>Pgm-2</i> (plàstides) <i>Pgm-3</i> i <i>Pgm-4</i> (citosol)	Weeden i Lamb, 1987; Manganaris, 1989
Xirimoia	2	<i>Pgm-1</i> , 2 al·lels <i>Pgm-2</i> , monomòrfic	Lee i Ellstrand, 1987
Vinya	2	<i>Pgm-1</i> , monomòrfic <i>Pgm-2</i> , 3 al·lels	Parfitt i Arulsekhar, 1989

(1) Gens polimòrfics

TAULA 29 VARIABILITAT DE L'ENZIM GLUTAMAT OXALACETAT TRANSAMINASA (GOT) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Arbres de fruita seca			
Ametller	2	Got-1 i Got-2, 2 al·lels a cada locus	Hauagge et al., 1987a; Arús et al., 1993
Altres fruiters			
Alvocater	2	Got-1, 4 al·lels (diferents segons les espècies de <i>Persea</i>) Got-2, 2 al·lels	Torres i Bergh, 1980
Cítrics	+	variabilitat segons les espècies	Soost i Torres, 1981
Palmera de dàtils	2	Got-1 i Got-2, 2 al·lels a cada locus	Torres i Tisserat, 1980
Pomera	4	Got-1, 6 al·lels (1 nul) Got-2, 3 al·lels (1 nul) GOT-3, zona polimòrfica Got-4, 2 al·lels	Manganaris i Alston, 1987 i 1988b
Xirimoia	2	Got-1, 4 al·lels Got-2, 3 al·lels	Lee i Ellstrand, 1987

(1) Gens polimòrfics
+ Presència de polimorfisme

TAULA 30 VARIABILITAT DE L'ENZIM MALAT DESHIDROGENASA (MDH) EN FRUITERS

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<u>Arbres de fruita seca</u>			
Noguer	4	2 <i>Mdh-1</i> i <i>Mdh-3</i> , polimòrfics (<i>Mdh-3</i> , 3 al·lels) <i>Mdh-2</i> i <i>Mdh-4</i> , monomòrfics (formació de dos zones de dímers intergènics)	Aletà et al., 1993
Pecaner	2	1 <i>Mdh-1</i> , 4 al·lels MDH-2, zona monomòrfica de 5 bandes	Marquard, 1989
<u>Altres fruiters</u>			
Alvocater	2	1 <i>Mdh-1</i> , 3 al·lels <i>Mdh-2</i> , aparentment monomòrfic	Torres i Bergh, 1980
Albercoquer	2	2 <i>Mdh-1</i> i <i>Mdh-2</i> , 2 al·lels a cada locus	Byrne, 1989
Cítrics	2	2 <i>Mdh-1</i> i <i>Mdh-2</i> (diferències entre espècies)	Soost i Torres, 1981
Olivera	2	1 MDH-1, zona monomòrfica de tres bandes <i>Mdh-2</i> , 2 al·lels	Ouazzani et al., 1993

(1) Gens polimòrfics

TAULA 30 (continuació)

ESPÈCIE	NOMBRE (1) DE GENS	OBSERVACIONS	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Pomera	4	<i>Mdh-1</i> , 2 al·lels MDH-2, zona monomòrfica <i>Mdh-3</i> i <i>Mdh-4</i> (gens duplicats)	Manganaris, 1989
Presseguer	2	<i>Mdh-1</i> , polimòrfic <i>Mdh-2</i> , monomòrfic	Arulsekar et al., 1986a
Xirimoia	2	<i>Mdh-1</i> , 2 al·lels <i>Mdh-2</i> , monomòrfic	Lee i Ellstrand, 1987

(1) Gens polimòrfics

TAULA 31 LLIGAMENTS ENTRE GENS ISOENZIMÀTICS TROBATS EN FRUITERS

ESPÈCIES	GRUP DE LLIGAMENT	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<u>Arbres de fruita seca</u>		
Ametller	<i>Pgm-2-Gpi-2-Aat-2-Lap-1</i> <i>Idh-2-Aat-1</i>	Arús et al., 1993
<u>Altres fruiters</u>		
Alvocater	<i>Got-1-Got-2</i>	Torres et al., 1986
Cirerer	<i>Got-1-Lap-1</i> <i>Me-1-Lap-1</i>	Santi i Lemoine, 1990
Cítrics	<i>Mdh-2-MeO1-MeO2</i> <i>Got-1-Mdh-1</i> <i>6Pgd-1-6Pgd-2</i>	Torres et al., 1985 Durham et al., 1992
Figuera	<i>Est-D-Got-B</i>	Torres, 1983
Pomera	<i>Got-1-Idh-1</i> <i>Got-2-Lap-2</i> <i>Got-4-Lap-1</i> <i>Pgi-2-Pgi-3</i> <i>Prx-2-Prx-3</i> <i>Prx-4-Prx-5</i>	Manganaris i Alston, 1987 Manganaris i Alston, 1988b Manganaris, 1989 Manganaris i Alston, 1992b
Xirimoia	<i>Got-2-Mdh-1-Adh-Tpi-1-Aco-2</i> <i>Tpi-2-Pgi-2-Got-1-Aco-1</i>	Lee i Ellstrand, 1987

TAULA 32 L·LIGAMENTS ENTRE ISOENZIMS I CARÀCTERS MORFOLÒGICS EN FRUITERS

FRUITER	GEN	CARÀCTER MORFOLÒGIC	DISTÀNCIA	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Pomera	<i>Got-1</i>	al·lel d'incompatibilitat	$r=0.02\pm0.005$	Manganaris i Alston, 1987
	<i>Acp-1</i>	gen letal pàlid	$r=0.08\pm0.030$	Manganaris i Alston, 1988a
	<i>End-1</i>	gen letal pàlid	$r=0.07\pm0.028$	
	LAP-2	resistència al "mildew"	—	Manganaris i Alston, 1992a
Figuera	POX	gen que determina el sexe	$r=0.15$	Torres, 1983
Presseguer	<i>Mdh-1</i>	vigor de l'arbre	—	Werner i Moxley, 1991
	α -amilasa	tipus de flor	$r=0.04$	Monet i Gibault, 1991

— Fracció de recombinació no especificada

4.2.-VARIACIÓ ISOENZIMÀTICA DE LES VARIETATS CULTIVADES DE C.AVELLANA

4.2.1.- CARACTERITZACIÓ VARIETAL

La gran variabilitat isoenzimàtica que hem trobat en l'avellaner, concorda amb anteriors estudis realitzats en aquesta espècie (Loukas et al., 1984; Truco et al., 1989; Cheng et al., 1990). Els resultats d'aquests autors, coincideixen amb els nostres per a molts dels sistemes. Aquests treballs proporcionen dades d'interès, ja que s'ha observat polimorfisme en l'avellaner per a sistemes enzimàtics que nosaltres no hem utilitzat: esterasa (EST), leucil amino peptidasa (LAP), glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G-6-PD) i peptidasa (PEP) (Loukas et al., 1984); fosfatasa àcida (ACP) i alanina amino peptidasa (AAP) (Cheng et al., 1990). Les dades de Cheng et al., (1990), aporten informació addicional sobre la metodologia que permet aconseguir bona resolució i un polimorfisme considerable per al sistema SDH.

4.2.1.1.-GRUPS DE VARIETATS AMB EL MATEIX GENOTIP ISOENZIMÀTIC

En l'estudi de sis sistemes enzimàtics variables i ben resolts, hem trobat que la majoria de les varietats estudiades (62,18%), tenien un genotip únic. Han quedat però 45 varietats agrupades en 13 grups d'idèntic genotip (Taula 18, p. 95-99). Per a algunes varietats s'han confirmat sinònimes ja descrites anteriorment, altres grups inclouen algunes varietats de característiques morfològiques força semblants, que podrien tractar-se de sinònimes no detectades anteriorment i, finalment, un darrer conjunt de grups de varietats de característiques morfològiques ben diferents, per bé que el seu genotip isoenzimàtic fos el mateix.

4.2.1.1.1.-Confirmació d'algunes sinonímies

- **Grup b:** "Castanyera", "Grande", "Fertile de Coutard", "Grada", "Belle de Giubilino", "Feliuet" i "Garroff". Les quatre primeres varietats presenten les mateixes característiques morfològiques i es consideren sinonímies d'una mateixa varietat (Bergougnoux et al., 1978; Garcia i Clavé, 1985). La caracterització per isoenzims, ratifica aquest fet al presentar les quatre el mateix genotip isoenzimàtic per als 10 loci examinats. Les altres tres varietats d'aquest grup no s'assemblen morfològicament a les anteriors ni tenen característiques comunes entre elles. "Belle de Giubilino" és una varietat italiana, l'arbre té un bon creixement, l'avellana és grossa de forma globular. "Feliuet" i "Garroff", són dues varietats locals de la província de Tarragona, les dues de port no tan vigorós i d'avellana més petita que "Belle de Giubilino". L'avellana de "Feliuet" és de mida mitjana, ovalada i de color marró fosc; "Garroff" presenta una avellana també ovalada però de color marró clar i amb estries a la closca.

- **Grup j:** "Henneman-3" i "Macrocarpa". Els estudis isoenzimàtics estan d'acord amb la informació morfològica en el sentit que aquestes dues varietats, d'EUA la primera i de França la segona, corresponen a una mateixa varietat (Germain, 1983).

4.2.1.1.2.- Grups que inclouen varietats que podrien ser identificades com a sinonímies

- **Grup d:** "Curcia", "Colldejou" i "Segorbe". A nivell isoenzimàtic aquestes tres varietats tenen la particularitat que són les úniques que presenten l'al·lel *b* per al gen *Pgi-3*, formant un genotip únic *ab*. Les tres són molt semblants pel que fa referència tant a l'aspecte de l'arbre (vigor i port), com de fruit (avellana de mida mitjana i de forma globular). "Curcia" d'Astúries, "Colldejou" de Tarragona i "Segorbe" de Castelló, podrien ser la mateixa varietat que ha adoptat sinonímies diferents segons el lloc de conreu.

- **Grup f:** "Ferrota", "Laureà", "Llangueta", "Moll", "Negret", "Panser", "Simó", "Sugranyes" i "Víctor". Totes aquestes varietats es troben a la zona de Tarragona. "Negret", és la principal varietat conreada, amb un port de l'arbre mitjanament vigorós i de fruit oval, de color marró fosc i de mida mitjana. Les

altres són varietats que es troben a zones molt localitzades. L'aspecte general de l'arbre de moltes d'elles és força semblant, amb un port no massa vigorós, caracteritzant-se per les seves fulles petites i dentades. La closca de l'avellana de "Sugranyes" i "Víctor", és a diferència de les altres, de color marró clar, essent les dues petites i ovals, però "Sugranyes" té l'àpex més punxegut. L'arbre d'aquesta varietat té un port obert, mentre que és erecte a "Víctor". "Moll" (Vilanova de Prades) i "Llargueta" (La Selva), tenen l'avellana molt semblant (allargada, de color marró fosc, amb estries a la closca) i les característiques de l'arbre coincideixen (port, època de floració, sensibilitat al "Badoc" (*Phytoptus avellanae* L.)). Podria ser que es tractés de la mateixa varietat. Les diferències morfològiques de les avellanes de les altres quatre varietats ("Ferrotà", d'avellana petita i oval; "Laureà", d'avellana oval-allargada i mida mitjana; "Panser", de forma cònica i mitjana i "Simó", gran i de forma subcilíndrica curta), són prou evidents com perquè descartem la possibilitat de que es tracti d'una mateixa varietat.

- **Grup g:** "Apegalós", "Lluenta", "Marxant" i "Pinyolenc". Totes quatre varietats s'han recollit de prospeccions locals a la província de Tarragona. Les avellanes d'"Apegalós" i "Marxant", són molt semblants, quasi bé iguals (globulars, de mida mitjana) i l'aspecte de l'arbre també, suggerint que possiblement sigui la mateixa varietat. L'avellana de "Lluenta" és petita, de forma cònica i de color marró fosc, molt brillant. Contràriament la de "Pinyolenc", també petita, és de forma oval-allargada.

- **Grup h:** "Febró" i "Morell". La varietat "Morell" és una varietat base a algunes zones de Tarragona: àrea muntanyosa del Baix Camp, Priorat i Terra Alta (Tasias, 1975; Garcia i Clavé, 1985). Una de les localitats on es troba, encara que en poca quantitat, és a la zona de La Febró, d'on prové l'altra varietat. Les dues presenten característiques molt semblants, tant en l'arbre (són molt rebrotants, sensibles al "Badoc", coincideixen en l'època de floració), com en el fruit (avellana clara, de forma ovalada i mida mitjana). Podria ser que es tractés de sinònimes d'una mateixa varietat.

- **Grup i:** "Rosset" i "Selvatà". Són dues varietats de Tarragona recol·lectades per prospecció a Vilanova de Prades la primera, i a Cornudella la segona, localitats pròximes geogràficament. L'avellana de les dues varietats s'assembla força, així com també les característiques de l'arbre: port, època de floració i

baixa sensibilitat al "Badoc". Per totes aquestes coincidències, podria ser que es tractés de la mateixa varietat.

- **Grup I:** "Fructo Albo", "Fructo Rubro" i "Jardinera". Les dues primeres varietats s'han descrit dins l'espècie *C. maxima*, caracteritzant-se per ser arbres molt rebrotants i perquè els fruits queden retinguts dins dels flocs que són tubulars (Bergougnoux et al., 1978). La varietat "Jardinera" prové de les comarques de Girona, on s'utilitza com a ornamental per a jardins. La característica comuna d'aquesta varietat i "Fructo Rubro", és que presenten alguns dels seus òrgans de color vermell: aments, fulles i flocs. Per les observacions realitzades, podria molt bé ser que "Jardinera" fos una sinonímia de "Fructo Rubro". Un altre caràcter a tenir present és la poca sensibilitat que aquestes dues varietats tenen al "Badoc", a diferència de "Fructo Albo", on la sensibilitat per a aquest àcar de les gemes és molt més alta.

4.2.1.1.3.- Grups de varietats amb el mateix genotip isoenzimàtic però amb caràcters morfològics clarament diferents

- **Grup a:** "Artellet", "Pauetet", "Planeta", "Santa Maria del Gesu" i "Tonda Italiana". Les dues darreres varietats són d'origen italià. "Santa Maria del Gesu", es troba difosa per Sicília, i "Tonda Italiana" és una selecció mantinguda al Centre de Mas Bové de material arribat d'Itàlia. L'avellana d'aquestes dues varietats és molt semblant, quasi bé la mateixa (globular, de mida mitjana i que es caracteritza per tenir la cicatriu pistilar força visible). No obstant hi ha característiques de l'arbre que suggereixen que són varietats diferents. "Tonda Italiana" és resistent al "Badoc" i "Santa Maria del Gesu" s'ha definit com una varietat sensible (Manzo i Tamponi, 1982). Aquesta darrera varietat, és molt més rebrotant que "Tonda Italiana". Les altres tres varietats són originàries de Tarragona. "Pauetet" és una varietat base a determinades zones del Camp de Tarragona, i "Artellet" i "Planeta" provenen de prospeccions locals (Tasias, 1975). Els caràcters d'arbre i fruit són diferents per a aquestes tres varietats (Garcia i Clavé, 1985). A nivell isoenzimàtic, les varietats d'aquest grup tenen la particularitat que el genotip que presenten per a tots els loci són els més freqüents en el conjunt de les varietats estudiades. Es podria atribuir a l'atzar el fet que presentin el mateix genotip isoenzimàtic. És interessant fixar-se en els resultats de Cheng et al., (1990), que ha observat variabilitat de l'enzim AAP (alanina aminopeptidasa) en l'avellaner, les seves

dades mostren que "Santa Maria del Gesu" i "Pauetet" són diferents fenotípicament per al locus AAP3 d'aquest enzim.

- **Grup c:** "Casina" i "Clon La Masó" ("C.L.M."). La primera és una varietat asturiana i la segona és una varietat que es conrea al municipi de La Masó (Alt Camp). Es diferencien per alguns dels seus caràcters, tant d'arbre (el port de "Casina" és erecte, i el de "C.L.M." és obert), com de fruit (l'avellana de "Casina" és més petita, més rodona i més fosca que la de la varietat de Tarragona).

- **Grup e:** "Gironell" i "San Giovanni". Són varietats de caràcters morfològics i àrees de conreu molt diferents. "Gironell" és una varietat base de determinades zones de Tarragona, principalment a Constantí (Tasias, 1975; Garcia i Clavé, 1985) i "San Giovanni" es troba difosa a la zona de Campània (Itàlia) (Manzo i Tamponi, 1982). A nivell isoenzimàtic presenten els genotips més freqüents per a quasi tots els gens, amb excepció de *Pgm-1* i *Got-2*.

- **Grup k:** "Palaz" i "Extra Giaghli". Com en el cas anterior, són dues varietats de característiques morfològiques i d'àrees de conreu diferents, de Turquia i de Grècia, respectivament. Fent referència a les dades de Cheng et al., 1990, aquestes dues varietats presenten fenotips isoenzimàtics diferents per AAP. D'acord amb aquesta referència, les dues varietats podrien ser doncs, separades isoenzimàticament.

- **Grup m:** "Bergeri" i "Jemstegaard-5". Dues varietats d'origens i d'àrees de conreu força diferents (de Bèlgica la primera, i d'EUA la segona), així com també de característiques d'arbre i de fruit gens similars. Si bé l'avellana de les dues varietats és força grossa, la forma de "Bergeri" és cònica i la de "Jemstegaard-5" és globular. L'arbre d'aquesta darrera és més vigorós que el del cultivar belga.

És interessant remarcar que dues varietats de Turquia "Imperiale de Trebizonda" i "Karidaty", definides com la mateixa varietat (Manzo i Tamponi, 1982; Garcia i Clavé, 1985), han resultat ser diferents a nivell genètic, concretament per al gen *Got-2*. Encara que aquestes dues varietats presenten característiques morfològiques semblants, amb les dades isoenzimàtiques es pot assegurar que no es tracta de la mateixa. No és d'estranyar que s'hagi produït aquest resultat, en certa part contradictori, en aquestes varietats

turques. És prou coneguda la gran dificultat que sempre ha existit, i que actualment persisteix, per aconseguir material d'aquell país. La varietat "Imperiale de Trebizonda" de la col·lecció del Centre de Mas Bové, es va introduir l'any 1965 a través de la Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière de l'INRA de Bordeus (França) i "Karidaty" al 1974, de l'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, de Roma (Itàlia). El treball on es descriuen les varietats turques (Ayfer et al., 1986) no especifica la varietat "Imperiale de Trebizonda". Pel seu nom es pot pensar que prové de la zona de Trabzon, i segons les descripcions podria correspondre al cultivar "Kargalak". Manzo i Tamponi (1982) la descriuen com una de les varietats més antigues de Turquia. Davant de tots aquests fets, es constata una vegada més que encara hi ha una certa confusió entorn de les diferents varietats d'avellaner, sobretot de les que provenen de països orientals on és difícil obtenir d'una manera directa el material vegetal.

4.2.1.2.- ESTUDI DE CLONS DE DIFERENTS VARIETATS

Els genotips isoenzimàtics de clons d'una mateixa varietat, provinents de localitats diverses (dos clons de "Grifoll", quatre de "Negret", dos de "Trenet", tres de "Morell" i dos de "Garroff") han coincidit entre els clons d'una mateixa varietat. No obstant, és interessant constatar que el genotip isoenzimàtic es manté inalterable dins de cada clon malgrat les característiques morfològiques que els diferencien.

És interessant fixar-se en el cas de "Negret". Els quatre clons estudiats, i que per tant són idèntics morfològicament al prototipus de la varietat, tenen també el mateix genotip isoenzimàtic. No obstant, dins la denominació de "Negret", hi ha altres varietats molt semblants a aquesta especialment en les característiques de l'avellana, però que presenten diferències en altres aspectes de la morfologia. D'aquestes n'hem analitzat tres: "Negret Capellut", "Negret Primerenc" i "Negret Caputxí" (sinonímia de "Puntxec"). Diferents autors (Tasias, 1975; Vidal-Barraquer i Tasias, 1976; Gil et al., 1986), han utilitzat el terme de "varietat població" per descriure els grups de varietats inclosos dins la denominació "Negret" que tenint un aspecte del fruit molt semblant, presentaven diferències en altres característiques. Les diferències entre aquests individus no es deuen a mutacions somàtiques a partir de "Negret" sinó que tindrien un origen sexual. El fet que les tres darreres

varietats tinguin un genotip isoenzimàtic diferent entre elles i de "Negret", està d'acord amb aquesta hipòtesi.

Aquest mateix cas el trobem al grup format per les varietats "Apegalós", "Artellet", "Artell de Palma" i "Trenet", definides com una "varietat població" (Tasias, 1975). S'assemblen molt entre elles, però constitueixen cadascuna una varietat diferent. Les dades d'electroforesi, han confirmat aquestes observacions.

4.2.1.3.- APLICACIONS DELS RESULTATS OBTINGUTS

Davant d'aquests resultats no hi ha dubte del gran interès que té la caracterització de varietats per isoenzims. S'han identificat 74 varietats d'avellaner amb un genotip únic, s'han verificat sinonímies d'algunes varietats alhora que se n'han proposat de noves, s'ha demostrat que les diferències isoenzimàtiques a nivell de clons d'una mateixa varietat no existeixen i s'han trobat grups de varietats amb idèntica caracterització isoenzimàtica, però de característiques morfològiques ben diferents. Molt possiblement, les varietats d'aquest darrer grup, es podran arribar a diferenciar en un futur amb l'estudi d'altres sistemes enzimàtics polimòrfics.

Una de les aplicacions immediates d'aquest alt grau de polimorfisme isoenzimàtic mostrat per l'espècie, estaria dins el món viverístic. Dades de 1992, estimen una producció de 9.000 plançons d'avellaner als viviers de Catalunya (Canals i Folch, 1992). No existeix però, cap certificació d'aquest material. La certesa i verificació del material vegetal, independentment del fruïter que es tracti, és indispensable per a la realització de tota nova plantació.

Aquests resultats complementen els estudis ja realitzats d'identificació varietal en l'avellaner (Loukas et al., 1984; Truco et al., 1989; Cheng et al, 1990), i s'afegeixen a la llista dels diferents fruïters on s'han realitzat estudis per a la caracterització de varietats (Taula 33, p.137-138).

4.2.2.- ESTUDI DELS PARÀMETRES POBLACIONALS

Els valors obtinguts dels diferents paràmetres poblacionals estudiats en l'espècie *C. avellana*, complementen els coneixements que es tenen sobre els mateixos en altres espècies fruïteres (Taula 34).

TAULA 34 PARÀMETRES POBLACIONALS D'ALGUNS FRUITERS

ESPÈCIE	L(s)	A	Ho
Avellaner	0.66	2.80	0.25
Presseguer ¹	0.08-0.20	1.08-1.27	0.02-0.03
Ametller (Califòrnia) ¹	0.42	1.50	0.17
Ametller (Europa) ¹	0.78	2.00	0.28
Albercoquer ¹	0.58	1.75	0.13
Prunera ¹	0.67	2.17	0.25
Pomera ¹	0.64	2.21	0.24
Alvocater ¹	0.86	2.57	0.28

¹ Byrne (1990)

Els valors d'avellaner es troben pròxims als d'espècies de *Prunus* de pol·linització encreuada (ametller i prunera), que són les que presenten més polimorfisme. Segons Crawford (1983), el nivell de polimorfisme manifestat per una espècie, es troba altament relacionat amb la metodologia emprada per a la millora de plantes. Un punt a destacar, són les diferències trobades entre l'ametller europeu i el californià (dos grups de varietats d'una mateixa espècie). L'ametller californià, que prové d'un grup reduït de clons europeus, presenta un polimorfisme molt més baix.

A la Taula 35 (p. 134), es mostren els resultats d'avellaner, juntament amb els obtinguts en un estudi general realitzat per Gottlieb (1981), comparant espècies autògames i al·lògames.

TAULA 35 PARÀMETRES POBLACIONALS DE L'AVELLANER I D'ESPÈCIES AUTÒGAMES I AL·LÒGAMES

ESPÈCIES	L(s)	A	HET	I
Avellaner	0.66	2.80	0.222	0.949
Espècies autògames ¹	0.18	2.26	0.001	0.975
Espècies al·lògames ¹	0.51	2.90	0.086	0.956

¹ Dades de Gottlieb (1981), sobre 49 poblacions, de les quals 38 són espècies diploides i 28 són autògames.

Com es pot apreciar l'avellaner presenta uns valors pròxims per a tots els paràmetres als d'espècies al·lògames. *C. avellana* té un sistema d'autoincompatibilitat esporofític i es comporta com a planta al·lògama en condicions naturals. Els resultats de variació isoenzimàtica indiquen que ni el sistema de reproducció clonal ni els mètodes de millora genètica usats fins ara, semblen haver alterat substancialment el seu nivell inicial de variabilitat genètica.

Existeixen varies hipòtesis sobre l'origen de l'avellaner cultivat. Trotter (1951), Alvarez-Requejo (1965), proposaren que la majoria dels avellaners que es cultiven són probablement híbrids entre tres espècies: *C. avellana*, *C. maxima* i *C. pontica*. També, diferents autors (Woodroof, 1967; Lagerstedt, 1975; Jona, 1986; Duke, 1989), consideren que les varietats d'avellaner cultivades pertanyen a les espècies *C. avellana* i *C. maxima*, o són híbrids entre elles. En aquest sentit, cal mencionar que les descripcions de "International Union for the Protection of New Varieties of Plants" (UPOV, 1979), per a l'avellaner, es refereixen a aquestes dues darreres espècies.

Per Koval (1976) i Mehlenbacher (1991), la gran variabilitat genètica existent dins de *C. avellana* i la diversitat d'àrees on es cultivava varen portar a molts taxonomistes a subdividir l'avellaner europeu en tres espècies: *C. pontica*, *C. maxima* i *C. avellana*. No obstant, segons aquests autors, aquestes tres espècies podrien incloure's en una de sola, més àmplia i molt polimòrfica, que

seria *C. avellana*, el que en part es veuria corroborat per la manca de barreres a la hibridació existents entre *C. avellana*, *C. pontica* i *C. maxima*.

Els treballs realitzats en electroforesi d'isoenzims per altres autors en diferents espècies de *Corylus*, no aporten dades massa clares entorn a aquest tema. Todorovic (1989) descriu els patrons de bandes de la peroxidasa. per a quatre espècies: *C. avellana*, *C. maxima*, *C. pontica* i *C. colurna*, observant que els zimogrames de *C. pontica* i de *C. maxima*, tenen menys bandes que els de *C. avellana* (s'ha de tenir present que el nombre de varietats analitzades per espècie és mínim, 3 o 4). Ahmad et al. (1987), observen menys polimorfisme a 5 espècies de *Corylus* (*C. avellana*, *C. colurna*, *C. heterophylla*, *C. maxima* i *C. vilmorii*) per a àcid fosfatasa, que per a la fenol oxidasa i peroxidasa, però no constaten clares diferències entre les espècies analitzades.

El coneixement de l'herència de la variabilitat isoenzimàtica en l'avellaner permet examinar aquestes tres hipòtesis comparant els resultats obtinguts en aquest treball amb la informació existent en altres espècies. D'una manera general, les poblacions d'una espècie acostumen a ser molt semblants entre si, el que resulta en uns valors d'identitat genètica molt elevats ($I > 0.9$), Gottlieb (1981). Quan aquestes comparacions es fan entre poblacions d'espècies congenèriques, els valors del coeficient d'identitat són molt més baixos, degut a la presència d'al·lels diferents en molts dels gens estudiats (Crawford, 1983). Els valors de la identitat genètica entre els grups de les varietats d'Espanya, de Turquia i d'Itàlia varen ser molt alts, oscil·lant entre un mínim de $I = 0.93$ (Turquia-Itàlia) i un màxim de $I = 0.98$ (Itàlia-Espanya). D'altra part, les varietats turques "Palaz", "Sivri" i "Tombul", considerades dins l'espècie *C. pontica* (Bergougnoux et al., 1978), i les de l'àrea dels Balcans "Fructo Albo" i "Fructo Rubro", incloses dins *C. maxima* (Krüssmann et al., 1876; Bergougnoux et al., 1978), no presentaren diferències notables en quant a la seva composició al·lèlica entre si, ni amb la resta de varietats d'avellaner, amb l'única excepció de l'al·lel *d* de *Pgm-3* present en totes elles, i relativament menys freqüent en el conjunt de varietats estudiades ($p = 0.06$). Aquests resultats indiquen que independentment del seu origen geogràfic, existeix un elevat grau de semblança genètica entre les varietats d'avellaner cultivat, el que està més d'acord amb la hipòtesi de l'existència d'una sola espècie, que en la de la intervenció de diverses espècies de *Corylus* en la composició del "pool" genètic del l'avellaner cultivat.

Com a continuació d'aquest treball i amb l'objectiu d'obtenir evidència addicional sobre l'origen de l'avellaner, seria interessant realitzar estudis isoenzimàtics comparatius entre poblacions de les espècies silvestres d'aquest gènere, el que permetria determinar si les diferències morfològiques evidents entre les diverses espècies es reflexen també en la variabilitat isoenzimàtica de cadascuna, i seria possible determinar fins a quin punt l'espècie cultivada s'ha originat a partir d'una o vàries d'elles.

TAULA 33 ESPÈCIES DE FRUITERS ON S'HAN REALITZAT ESTUDIS ISOENZIMÀTICS PER A LA CARACTERITZACIÓ DE VARIETATS

ESPÈCIES	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
<u>Arbres de fruita seca</u>	
Ametller (<i>Prunus amygdalus</i> L.)	Hauagge et al., 1987b, Cerezo et al., 1989; Arús et al., 1993
Avellaner (<i>Corylus avellana</i> L.)	Loukas et al., 1984; Truco et al., 1989; Cheng et al., 1990
Castanyer (<i>Castanea sativa</i> Mill.)	Malvolti i Fineschi, 1987
Noguer (<i>Juglans regia</i> L.)	Atetà et al., 1989; Solar et al., 1993
Pecaner (<i>Carya illinoensis</i> C. Koch.)	Mielke i Wolfe, 1982
Pistatxer (<i>Pistacea vera</i> L.)	Richarte, 1989
<u>Altres fruiters</u>	
Alvocater (<i>Persea americana</i> Mill.)	Torres i Bergh, 1980
Albercoquer (<i>Prunus armeniaca</i> Mill.) (<i>P. mandschurica</i> (maxim)Koehne.)	Arulsekar i Parfitt, 1986 Byrne i Littleton, 1989b
Caqui (<i>Diospyrus kaki</i> L.)	Parfitt et al., 1991
Cítrics (<i>Citrus spp.</i>)	Torres et al., 1978; Soost i Torres, 1981; Ashari et al., 1989
Figuera (<i>Ficus carica</i> L.)	Valizadeh, 1977
Garrofer (<i>Ceratonia siliqua</i> L.)	Tous et al., 1992b
Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Messina et al., 1991
Mango (<i>Magnifera indica</i> L.)	Degani et al., 1992
Nesprer (<i>Eriobotrya japonica</i> (Thumb) Lindl.)	Degani i Blumenfeld, 1986
Olivera (<i>Olea europaea</i> L.)	Pontikis et al., 1980; Trujillo et al., 1990; Ouazzani et al., 1993
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	Torres 1990*
Palmera de dàtils (<i>Phoenix dactylifera</i> L.)	Torres i Tisserat, 1980; Al-Jibouri i Adham, 1990

*Revisió bibliogràfica

TAULA 33 (Continuació)

ESPÈCIES	REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES
Plataner (<i>Musa spp.</i>)	Jarret i Litz, 1986; Bhat et al., 1992a i 1992b
Pomera (<i>Malus spp.</i>)	Chevreau, 1984; Quarta i Arnone, 1987; Weeden i Lamb, 1985; Manganaris i Alston, 1989
Perera (<i>Pyrus spp.</i>)	Menéndez i Daley, 1986; Daley et al., 1987; Jang et al., 1991
Pinya (<i>Ananas spp.</i>)	De Wald et al., 1992
Presseguer (<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch.)	Messeguer et al., 1987; Werner, 1992
Prunera (<i>Prunus salicina</i> Lindl.)	Byrne i Littleton, 1988b
Vinya (<i>Vitis spp.</i>)	Schwennesen et al., 1982; Royo et al., 1989; Parfitt i Arulsekar, 1989
Xirimoia (<i>Annona cherimola</i> Mill.)	Torres, 1990*

*Revisió bibliogràfica

5.-CONCLUSIONS

El present treball realitzat en l'avellaner *Corylus avellana* L. aplicant la tècnica d'electroforesi d'isoenzims, ha permès arribar a les següents conclusions:

- L'avellaner és polimòrfic per a sis sistemes enzimàtics, aconitasa (ACO), 6-fosfogluconat deshidrogenasa (6PGD), fosfoglucoisomerasa (PGI), fosfoglucomutasa (PGM), glutamat oxalacetat transaminasa (GOT) i malat deshidrogenasa (MDH).
- Amb l'anàlisi genètica d'aquests sis sistemes s'ha determinat l'existència de 10 gens polimòrfics (*Aco-1*, *Aco-2*, *6Pgd-2*, *Pgi-2*, *Pgi-3*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Pgm-3*, *Got-2* i *Mdh-1*), i s'han identificat 5 regions addicionals, fixades en totes les plantes estudiades, que podrien estar codificades per 5 loci monomòrfics (*6Pgd-1*, *Pgi-1*, *Got-1*, *Mdh-2* i *Mdh-3*).
- S'ha observat un total de 28 al·lels als 10 gens isoenzimàtics polimòrfics. Dos a *Pgi-2*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Got-2* i *Mdh-1*; tres a *Aco-2*, *6Pgd-2* i *Pgi-3*; quatre a *Aco-1* i cinc a *Pgm-3*. En dos d'aquests gens (*Pgm-1* i *Pgm-3*), s'ha detectat la presència d'un al·lel nul.
- L'estructura quaternària dels enzims ACO i PGM ha estat monomèrica i la de 6PGD, PGI, GOT i MDH, dimèrica, d'acord amb els resultats obtinguts anteriorment per altres autors en diferents espècies de plantes.
- El nombre d'isoenzims d'ACO (2), 6PGD (2), GOT (2) i MDH (3), ha correspost amb el que és típic en aquests sistemes enzimàtics en les espècies diploides. Als enzims PGI i PGM, s'han trobat tres isoenzims en cadascun d'ells, quan el nombre normal diploide és de dos, el que indica que en ambdós sistemes enzimàtics hi ha una parella de gens duplicats.
- L'anàlisi de lligament ha permès detectar la segregació no independent de quatre parelles de gens *Aco-2-Pgm-2* ($r=0.16\pm 0.05$), *6Pgd-2-Pgm-2* ($r=0.32\pm 0.05$), *Pgm-1-Pgm-3* ($r=0.11\pm 0.30$) i *Mdh-1-Pgi-2* ($r=0.04\pm 0.03$). Amb aquestes dades s'ha confeccionat el primer mapa de lligament de l'avellaner amb tres grups: un amb tres gens (*Aco-2-Pgm-2-6Pgd-2*) i dos més amb dos gens cadascun (*Pgm-1-Pgm-3* i *Mdh-1-Pgi-2*). Els tres gens no inclosos (*Aco-1*, *Pgi-3* i *Got-2*), s'han considerat independents, i afegits als anteriors poden marcar com a màxim sis dels onze cromosomes de l'avellaner.

- El gran nivell de polimorfisme manifestat per l'espècie *C. avellana*, ha permès identificar amb un genotip únic 74 de les 119 varietats d'avellaner estudiades (62.18%). L'electroforesi d'isoenzims és doncs una eina ràpida i efectiva per a la identificació de les varietats d'avellaner.

- L'idèntic genotip isoenzimàtic manifestat per algunes varietats ha confirmat dues sinonímes ja descrites anteriorment. D'una part "Castanyera", "Grande", "Fertile de Coutard" i "Grada" i de l'altra, "Henneman-3" i "Macrocarpa".

- Tretze varietats han quedat agrupades en sis grups, cadascun amb el mateix genotip isoenzimàtic de la següent manera: "Curcia", "Colldejou" i "Segorbe"; "Moll" i "Llangueta"; "Lluenta i Marxant"; "Febró i "Morell"; "Rosset" i "Selvatà"; "Fructo Rubro" i "Jardinera". Aquestes varietats tenen, per grups, caràcters morfològics molt semblants, quasi bé idèntics. La coincidència amb el genotip isoenzimàtic, fa suposar que es pugui tractar també de sinonímes. En aquest cas, s'haurien detectat 6 noves sinonímes en l'avellaner.

- L'estudi de diferents clons ha constatat que tots els que pertanyen a una mateixa varietat, tenen el mateix genotip isoenzimàtic.

- Els paràmetres poblacionals analitzats, situen l'avellaner amb uns valors pròxims als descrits per a altres espècies al·lògames. Aquestes dades signifiquen que a l'avellaner cultivat hi ha un alt nivell de variabilitat genètica i un elevat grau d'heterozigosi a la major part de les varietats cultivades, el que té importància en el sentit que molta d'aquesta variabilitat pot ser útil per a la millora genètica d'aquesta espècie.

- Els valors d'identitat genètica calculats a partir de tres "subpoblacions" (turca, italiana i espanyola), és força alt, com és de suposar en les poblacions coespecífiques. Aquestes dades suggereixen que totes les varietats analitzades pertanyen a un mateix "pool" genètic comú. En aquest sentit, la hipòtesi que algunes de les varietats turques corresponguin a l'espècie *C. pontica* no té massa fonament en vista de l'absència d'al·lels específics en cap dels gens isoenzimàtics estudiats en les varietats d'aquest origen. Els resultats obtinguts, són favorables a admetre una única espècie *C. avellana*, àmpliament polimòrfica, representativa de l'avellaner cultivat.