

Aplicación de herramientas biotecnológicas en la mejora genética de frutales del género *Prunus*

P. Martínez-Gómez*, M. Rubio, R. Sánchez-Pérez

Departamento de Mejora Vegetal. CEBAS-CSIC. Apartado 164, 30100 Espinardo (Murcia), España

* Autor al que debe dirigirse la correspondencia. E-mail: pmartinez@cebas.csic.es

Resumen

En este trabajo se presentan diferentes herramientas biotecnológicas aplicables a la mejora genética de frutales del género *Prunus*, tales como el uso de fuentes alternativas de germoplasma, la puesta a punto de nuevas técnicas de evaluación del material vegetal o la aplicación de marcadores moleculares. En primer lugar se describe la utilización de especies silvestres de *Prunus* como fuente de germoplasma alternativa para la introducción de genes que no estén disponibles en las especies cultivadas. Por otro lado, se describe el uso de plántulas procedentes de semillas con embriones múltiples (poliembriónicas) con un gran interés para la realización de estudios genéticos. Las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen unas grandes posibilidades para la evaluación del material debido a la ausencia de interacción con el medioambiente y a la gran cantidad de material que se puede manejar. También el cultivo de frutales en condiciones controladas en invernadero sometiéndolas a periodos artificiales de letargo en cámara fría permitiría la evaluación más precisa de algunos caracteres. Por otro lado, los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente para la caracterización del material vegetal. Las principales metodologías ensayadas en el desarrollo de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés agronómico son el desarrollo de mapas de ligamiento en poblaciones y la aplicación del "Bulk Segregant Análisis". Hasta la fecha marcadores moleculares ligados a 19 caracteres cualitativos (monogénicos u oligogénicos) y 18 caracteres cuantitativos (poligénicos) han sido descritos en diferentes especies del género *Prunus*.

Palabras clave: Melocotonero, ciruelo, albaricoquero, almendro, cerezo, germoplasma, técnicas de propagación, marcadores moleculares

Summary

Application of biotechnology tools to *Prunus* tree crop breeding

Different biotechnological tools for *Prunus* breeding including alternative germplasm sources, new evaluation techniques, and molecular markers development, are described. In germplasm improvement, the introduction of genes from related *Prunus* species conferring several traits are being pursued. On the other hand, twin seeds (two embryos within the same seedcoat) have produced seedlings useful for genetic studies. Promising propagation methods include *in-vitro* techniques for the evaluation of plant material, allowing the early evaluation of a high number of genotypes. In addition, the growth of seedlings in controlled environments, including the induction of an artificial rest period in cold chambers, provides a useful strategy for obtaining vigorously growing plants year round. Molecular markers have also become an essential tool in *Prunus* breeding studies. Different types of molecular markers have been employed for the genetic characterization of germplasm, the establishment of genetic relationships between cultivars and species, and the construction of genetic maps. Methodologies for the analysis of marker-assisted selection include the use of mapping populations segregating for desired characters and bulk segregant analysis. To date, molecular markers associated to 19 qualitative traits (monogenic u oligogenic) and 18 quantitative traits (polygenic) have been described in different *Prunus* species.

Key words: Peach, plum, apricot, almond, cherry, germplasm, propagation techniques, molecular markers

Introducción

La subfamilia *Prunoideae*, parte de la gran familia *Rosaceae*, incluye varias especies que producen frutos en forma de drupa con gran valor económico. En el año 2004 la producción mundial de estas especies superó los 33 millones de toneladas, siendo las más relevantes el melocotonero y la nectarina [*Prunus persica* (L.) Batsch] con una producción mundial de 15,5 millones de toneladas (Mtm), el ciruelo (*Prunus domestica* L.) con 9,8 Mtm, el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) con 2,7 Mtm, el cerezo (*Prunus cerasus* L. y *Prunus avium* L.) con 1,9 Mtm y el almendro [*Prunus amygdalus* Batsch = *Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb] con 1,7 Mtm (FAO, 2005). España es uno de los principales países productores de frutales del género *Prunus* a nivel mundial, siendo en 2004 el cuarto país productor de melocotonero y nectarina (con una producción de 1,1 Mtm), octavo país productor de ciruelo (0,2 Mtm), quinto país productor de albaricoquero (0,12 Mtm) y cuarto país productor de almendras (95.600 tm) (FAO, 2005). En nuestro país, el cultivo de estas especies se extiende principalmente por las Regiones de Murcia, Valencia, Aragón y Cataluña.

Las especies del género *Prunus* se caracterizan por el desarrollo de un solo ovario en el cual se desarrollan dos óvulos, uno de los cuales aborta normalmente después la antesis. El fruto es una drupa con un endocarpo lignificado que dentro posee una semilla. La mejora genética de estas especies presenta como grandes retos aumentar el reducido fondo genético disponible, sobre todo en especies como el melocotonero (Scorza et al., 1985), acortar el largo periodo juvenil y disminuir el elevado porte de los árboles, problemas que dificultan su evaluación (Scorza, 2001). Para superar estos "handicaps", en las últimas décadas se

han desarrollado técnicas tales como el uso de germoplasma alternativo, o el uso de técnicas novedosas de selección como la evaluación en condiciones *in vitro* o en condiciones controladas en invernadero, además de la aplicación de marcadores moleculares en la selección.

En este trabajo se presenta una revisión de algunas de estas nuevas estrategias aplicables a la mejora genética de frutales del género *Prunus* conducentes a incrementar la base genética del germoplasma utilizable así como al desarrollo de estrategias novedosas de selección.

Utilización de fuentes alternativas de germoplasma

Especies silvestres de *Prunus*

La gran disponibilidad y diversidad de germoplasma dentro de las especies no cultivadas del género *Prunus* ha sido indicada por diferentes autores (Kester y Gradziel, 1996; Faust y Timon, 1995; Faust et al., 1998). Así, existe una gran variabilidad genética entre estas especies silvestres en zonas de Asia Central, desde la región de Tian Shan en China hasta la región del Kurdistán entre Irán, Irak y Turquía. Por otro lado, en el caso de las especies cultivadas de este género se ha descrito una cierta limitación genética debida al uso de un número limitado de variedades en los programas de mejora (Scorza et al., 1985). La introducción de genes provenientes de estas especies silvestres de *Prunus* a través de programas de mejora interespecíficos, podría suponer un complemento interesante a los programas de mejora existentes.

La utilización comercial más importante de cruzamientos interespecíficos (almendro x melocotonero sobre todo, aunque también *P. webbii* x melocotonero) ha sido el desa-

rrrollo de portainjertos en programas de mejora llevados a cabo en Francia (Bernhard, 1949), EEUU (Kester y Hansen, 1966), España (Felipe, 1975), o ex-Yugoslavia (Vlasic, 1977). Sin embargo, la ausencia de barreras interespecíficas permite la introgresión de genes procedentes de especies silvestres de *Prunus* en las especies cultivadas. Así, especies silvestres como *P. fenzliana* (Fritsch) Lipsky, *P. bucharica* Korschinsky, *P. kuramica* Korschinsky o *P. webbii* Spach han sido utilizadas en la mejora genética de almendro como fuentes de autocompatibilidad o calidad de la semilla (Kester y Gradziel, 1996; Gradziel et al., 2001). Otro ejemplo ha sido la utilización de la especie *P. davidiana* (Carr.) Frans como fuente de resistencia al virus de la sharka (Plum pox virus) en melocotonero (Pascal et al., 2001), o *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne como fuente de resistencia al frío en albaricoquero (Paunovic, 1988). Finalmente, otros caracteres como resistencia a plagas o hábito de crecimiento, también son susceptibles de mejora mediante cruzamientos con especies silvestres (Gradziel et al., 2001).

Embriones múltiples

La aparición de embriones múltiples dentro del mismo tegumento es un fenómeno espontáneo que ocurre en semillas de algunas variedades de almendro y melocotonero (Kester y Gradziel, 1996; Hesse, 1971). En algunos casos estos dos embriones son genéticamente iguales y dan lugar a dos plantas idénticas, mientras que en otros casos las plántulas procedentes de estos embriones múltiples muestran un crecimiento aberrante más débil y retrasado (figura 1). Estas plántulas enanas originalmente habían sido caracterizadas como haploides (Hesse, 1971; Gulcan, 1975), sin embargo después de la caracterización molecular mediante marcadores se puso de manifiesto la posibilidad de

que algunas de esas plántulas sean aneuploides, lo que implicarían un origen sexual de estos embriones múltiples. En estos casos, el embrión secundario perdería parte de la dotación cromosómica dando lugar a las plantas aneuploides, junto a las plantas diploides procedentes del embrión primario (Martínez-Gómez y Gradziel, 2003). Estos resultados ponen de manifiesto el interés de este material para estudios genéticos. Más recientemente Sánchez-Pérez et al. (2004a) indicaron la posibilidad de que en lugar de plántulas aneuploides se tratara de líneas casi isogénicas (Near Isogenic Lines, NIL) con un gran interés también en los estudios genéticos de identificación de genes ligados a caracteres de interés agronómico.

Aplicación de técnicas de evaluación en condiciones controladas

Evaluación de caracteres en condiciones *in vitro*

El cultivo de plantas o incluso células en condiciones controladas *in vitro*, ofrece interesantes oportunidades para mejorar la eficiencia en los procesos de selección dentro de los programas de mejora genética, sobre todo de especies frutales, como es el caso del género *Prunus*. Las principales ventajas de trabajar en condiciones *in vitro* son la minimización de la influencia del medioambiente, la posibilidad de trabajar con un gran número de plantas en un espacio reducido, así como de acelerar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1993). Estos autores describieron la aplicación del cultivo de callos de diferentes plantas herbáceas en la selección de resistencia a enfermedades como *Phytophthora* o *Fusarium*, además de la selección en la resistencia a estreses abióticos como salinidad y frío.

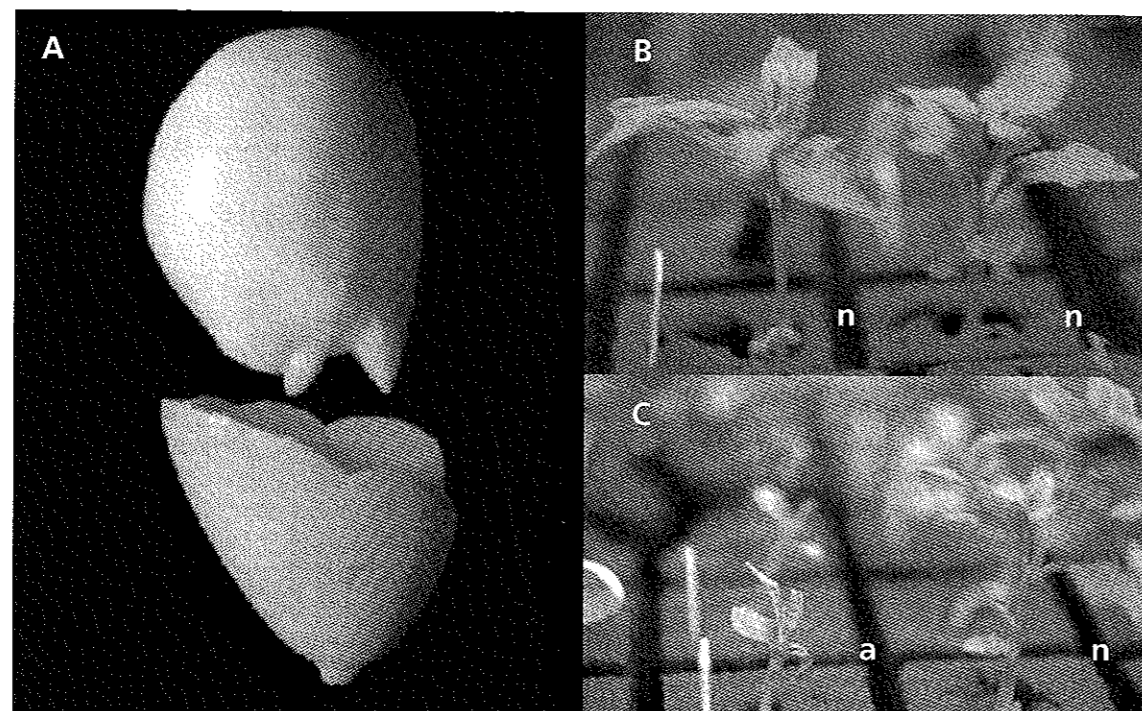


Figura 1. Plántulas procedentes de semillas poliembriónicas de almendro (A), con un crecimiento normal (n) (diploide) en los dos casos (B), y con un crecimiento normal (n) (diploide) y aberrante (a) (aneuploide) (C).

Figure 1. Seedlings from almond polyembryonic seeds (A), with normal development (n) (diploid) in both cases (B), and with a normal development (n) (diploid) and an aberrant development (a) (aneuploid) (C).

En el caso de frutales de zona templada como los *Prunus*, las técnicas de micropropagación comenzaron a desarrollarse como una alternativa a la multiplicación vegetativa tradicional en los años 60. Estas técnicas han sido extensamente utilizadas en *Prunus* para la multiplicación de patrones y variedades autoenraizadas, además de para la obtención de plantas libres de virus (Hammerschlag, 1986; Hutchinson, 1987). También se está trabajando con los procesos de embriogénesis somática como método de regeneración de plantas leñosas transformadas genéticamente (Singh y Sansavini, 1998).

La utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de mejora ha sido descrita por Jonard (1986) para la evaluación de la compatibilidad portainjertos/variedades de las nuevas selecciones de frutales obtenidas. Por otro lado, Datée y Branchard (1986) describieron protocolos de evaluación en condiciones controladas *in vitro* de la resistencia a algunos estreses bióticos como salinidad y sequía en programas de mejora de frutales. Más recientemente, Martínez-Gómez y Dicenta (2000) describieron un método de evaluación en condiciones *in vitro* de la resistencia al virus de la sharka (Plum pox virus) en albaricoquero (figura 2).

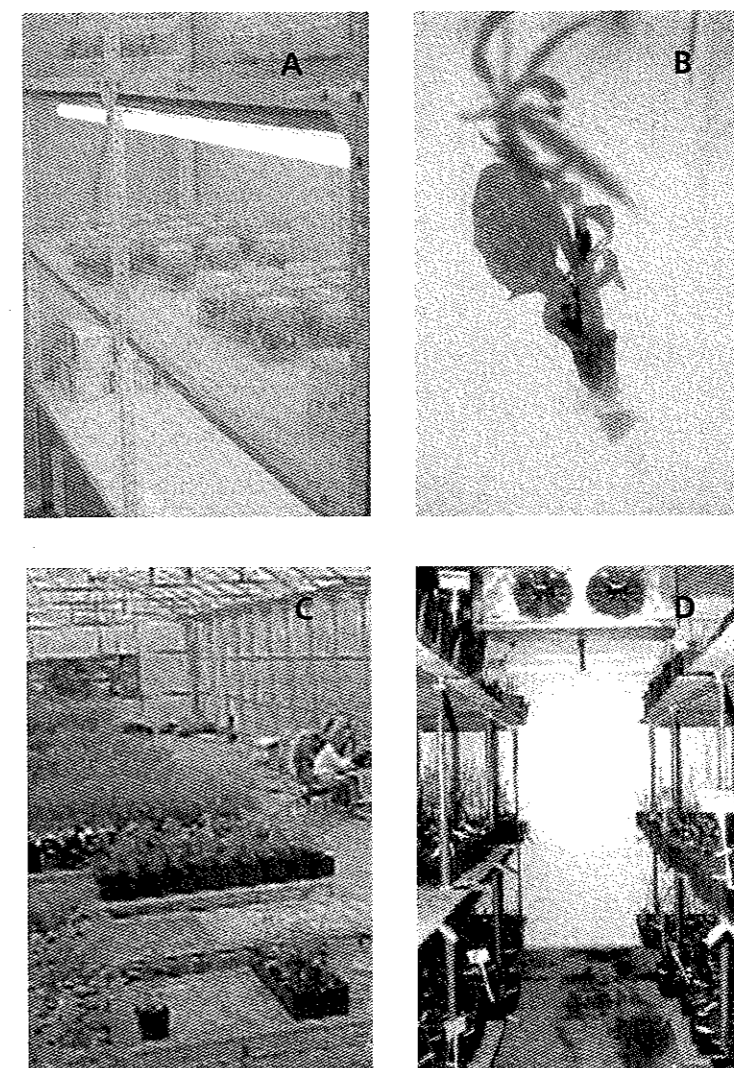


Figura 2. Evaluación de la resistencia a la sharka (Plum pox virus) *in vitro* (A). Detalle del microinjerto de la variedad de albaricoquero "Goldrich" sobre el patrón melocotonero "GF305" multiplicado e inoculado *in vitro* (B). Evaluación de la resistencia a la sharka en condiciones controladas en invernadero sellado y climatizado (C). Detalle de las plantas sometidas a un invierno artificial en cámara fría (D).

Figure 2. In vitro evaluation of apricot resistance to sharka (Plum pox virus) (A). Detail of the micrografting of apricot cultivar "Goldrich" onto a "GF305" peach rootstock in vitro propagated and inoculated (B). Evaluation of apricot resistance to sharka controlled conditions in sealed greenhouse (C). Detail of plants under an artificial winter in cold chamber (D).

Evaluación de caracteres en condiciones controladas en invernadero

Los frutales de zona templada como los *Prunus* poseen un mecanismo de letargo o dormancia que ocurre tanto en semilla como en yemas vegetativas y florales. Este mecanismo de dormancia o letargo puede ser artificialmente superado mediante periodos de reposo en cámara fría y oscuridad (Martínez-Gómez et al., 2000; Martínez-Gómez y Dicenta, 2001). En el caso del cultivo de *Prunus* en maceta condiciones de invernadero son necesarios tratamientos en cámara fría para la ruptura de este mecanismo de dormancia. Este cultivo en invernadero permitiría disponer de dos ciclos de cultivo anuales, 4 meses en invernadero y dos meses en cámara fría. El tamaño de las macetas, la renovación temporal de los sustratos, y el control de hongos del suelo se consideran los elementos claves para el cultivo de frutales en estas condiciones (Martínez-Gómez y Gradziel, 2002). Los tratamientos en cámara fría pueden ser también utilizados para el control de hongos e insectos que atacan las plantas en invernadero. También es necesario destacar que el cultivo de plántulas en condiciones de invernadero permite disponer de material vegetal en pleno crecimiento durante todas las estaciones del año para llevar a cabo diferentes ensayos como detección y localización de virus, extracción del ADN, estudio de cariotipos, o incluso estudios de biología floral.

En el caso de los *Prunus* la evaluación de caracteres en condiciones controladas en invernadero ha sido aplicada al estudio de la resistencia a la sharka en albaricoquero (Martínez-Gómez y Dicenta, 1998) (figura 2). Mediante esta técnica alternativa es posible realizar los estudios de inoculación y detección del virus sin los problemas de dispersión de la enfermedad que presentan los

estudios en campo. También se han utilizado este tipo de estudios para la evaluación de la tolerancia al frío en especies como ciruelo o cerezo (Pedryc et al., 1999). Por otro lado, el cultivo de plántulas de almendro en estas condiciones ha sido utilizado para el estudio fenológico, citológico y molecular de los embriones múltiples en esta especie (Martínez-Gómez y Gradziel, 2003).

Aplicación de marcadores moleculares

Caracterización del material y establecimiento de relaciones genéticas

Tradicionalmente la identificación y caracterización de variedades de *Prunus* se ha realizado en base a caracteres morfológicos y fisiológicos. Sin embargo, estos caracteres no siempre se pueden describir y en muchas ocasiones están afectados por el medioambiente. La aplicación de marcadores moleculares ofrece unas importantes posibilidades para la caracterización del material y la realización de estudios sobre relaciones genéticas así como de evolución y estructura del genoma (Wünsch y Hormaza, 2002). Los principales marcadores moleculares ensayados en *Prunus* han sido:

Isoenzimas: Fueron los primeros marcadores ensayados en *Prunus*. Basados en la electroforesis de isoenzimas, se caracterizan por su carácter codominante y su gran reproducibilidad. Sin embargo, su aplicación presenta la limitación del reducido número de alelos presentes y su poca variabilidad. Las isoenzimas se han utilizado ampliamente tanto en los estudios de caracterización del material vegetal como en la elaboración de mapas de ligamiento genético (Arulsekar et al., 1986; Weeden, 1994).

RFLPs: Los marcadores tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se basan

en la hibridación de fragmentos de ADN, que proceden de una restricción previa. Son unos marcadores de tipo codominante con una alta repetibilidad y un polimorfismo prácticamente ilimitado combinando sondas de hibridación con enzimas de restricción. Sin embargo, presentan el inconveniente de su gran laboriosidad lo que ha hecho que sean sustituidos por otros marcadores moleculares más fáciles de aplicar como son derivados de la PCR. Estos marcadores se han utilizado en *Prunus* fundamentalmente en la elaboración de mapas de ligamiento (Viruel et al., 1995).

RAPDs: Los marcadores tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se basan en la amplificación al azar de fragmentos de ADN mediante la técnica de la PCR. Estos marcadores se caracterizan por su facilidad de aplicación, aunque muestran una alta variabilidad de los resultados obtenidos de un laboratorio a otro. Por esta razón, su utilización en *Prunus* ha sido más reducida que los isoenzimas y RFLPs, y se ha centrado fundamentalmente en estudios de caracterización de variedades (Martins et al., 2003). La falta de reproducibilidad de los RAPDs puede reducirse convirtiendo este tipo de marcadores en los llamados SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions) mediante la secuenciación de los fragmentos amplificados. Los SCARs son unos marcadores codominantes y tienen mayor aplicabilidad que los RAPDs (Lecouls et al., 1999).

AFLPs: Los marcadores tipo AFLP (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism) se basan en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN previamente seccionados mediante enzimas de restricción. Este tipo de marcadores con herencia dominante presentan la ventaja frente a los marcadores tipo RAPD de su mayor especificidad y reproducibilidad. Se han utilizado en *Prunus* para la caracterización molecular y ela-

boración de mapas genéticos (Hurtado et al., 2002).

SSRs: Actualmente los marcadores tipo SSR (Simple Sequence Repeat) también llamados microsatélites, basados en la amplificación de secuencias conocidas de ADN mediante PCR, son los más utilizados en la caracterización molecular de *Prunus*. Estos marcadores son muy polimórficos, abundantes, con una gran reproducibilidad y una herencia codominante. Desde finales de los años 90 se han descrito un total de 800 marcadores de este tipo en diferentes especies como melocotonero, albaricoquero, cerezo y almendro (Cipriani et al., 1999; Decroocq et al., 2003; Testolin et al., 2004). Han sido ampliamente utilizados en la caracterización de variedades en todas las especies de *Prunus* y en la realización de estudios de relaciones genéticas, tanto entre variedades cultivadas como entre especies silvestres no cultivadas (Martínez-Gómez et al., 2003a; Martínez-Gómez et al., 2003b; Sánchez-Pérez et al., 2005) (figura 3) y también en la elaboración de mapas de ligamiento genético (Aranzana et al., 2003).

Selección asistida por marcadores moleculares

La selección asistida por marcadores (Marker assisted selection, MAS) es una estrategia que permite aumentar la eficiencia de los procesos de selección y reducir el número de generaciones necesarias para la obtención de una variedad mejorada. Esta selección es de particular interés en el caso de frutales que presentan un largo periodo juvenil además de otros inconvenientes añadidos, derivados de la interacción de la variedad con el medio ambiente o con los portainjertos utilizados (Arús y Moreno-González, 1993). Las principales metodologías ensayadas en el desarrollo de marca-

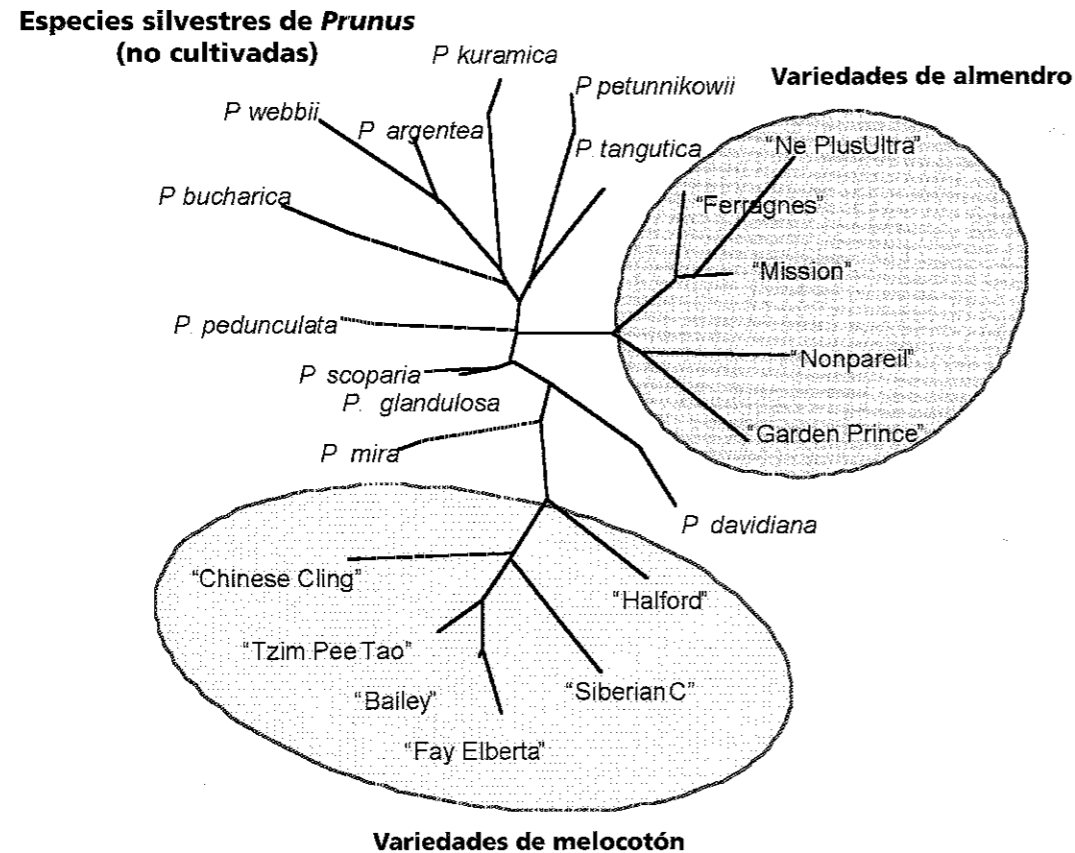


Figura 3. Relaciones genéticas entre variedades de almendro y melocotón y especies silvestres (no cultivadas) de *Prunus* obtenidas mediante un estudio con marcadores moleculares tipo SSR (Simple sequence Repeat). Dendograma obtenido mediante análisis de agrupamiento tipo Neighbour Joining (NJ).

Figure 3 Genetic relationship among peach and almond cultivars and related *Prunus* species obtained by a study with SSRs (Simple Sequence Repeat) molecular markers. Unrooted dendrogram obtained by Neighbour Joining (NJ) cluster analysis.

dores moleculares ligados a caracteres de interés agronómico son el desarrollo de mapas de ligamiento en poblaciones y la aplicación del análisis de grupos segregantes (Bulk segregant analysis, BSA) (Michelmore et al., 1991; Baird et al., 1996).

Como resultado de sucesivos proyectos internacionales de colaboración se ha desarrollado un mapa de ligamiento genético saturado

de *Prunus* obtenido mediante el cruzamiento entre la variedad de almendro 'Texas' (también llamada 'Mission') y la variedad de melocotonero 'Earlygold'. Todos los marcadores estudiados se encuentran distribuidos en 8 grupos de ligamiento. Este mapa (TxE) es considerado el mapa de referencia en *Prunus* (Arús et al., 1999) En la actualidad este mapa incluye 562 marcadores (361 RFLPs, 185

SSRs, 11 isoenzimas y 5 STSs) que cubren una distancia total de 519 centimorgans (cM) con una densidad media de 0.92 cM por marcador (Dirlewanger et al., 2004). El orden similar en todos los marcadores descritos, en los diferentes mapas de *Prunus* sugiere una elevada homología entre los genomas de estas especies (Aranzana et al., 2003) que explicaría la falta de barreras interespecíficas y la facilidad descrita en la transmisión de caracteres entre especies (Gradziel et al., 2001).

En los estudios de BSA, se analizan dos grupos de ADN con un fondo genético similar, aunque con diferencias de carácter particular. Esta estrategia ha sido utilizada para el desarrollo de marcadores ligados a la floración tardía en almendro (Ballester et al., 2001), androesterilidad en albaricoquero (Badenes et al., 2000), o resistencia a nemátodos en ciruelo (Lecouls et al., 1999). Hasta la fecha y tras el desarrollo de diferentes mapas de ligamiento, además de estudios de BSA, han sido descritos marcadores moleculares ligados a 19 caracteres cualitativos (monogénicos u oligogénicos) y 18 caracteres cuantitativos (poligénicos) en diferentes especies del género *Prunus* (Dirlewanger et al., 2004; Testolin, 2003) (tabla 1).

Por otro lado, la secuenciación a gran escala de ESTs (Expressed sequence tags) está dando una idea global de los genes de interés para las especies de *Prunus*. Una colección importante de ESTs secuenciados en la Universidad de Clemson (Estados Unidos)

en melocotonero y basada en el estudio de librerías de ADNc ha puesto de manifiesto un total de 3.800 hipotéticos genes que están referenciados en la página web <http://www.genome.clemson.edu/gdr>. Este trabajo es complementario al que se está llevando a cabo en Italia dentro del "Italian National Consortium for Peach Genomics" donde se han conseguido identificar un total de 6.817 ESTs (<http://www.itb.cnr.it/ESTree>). Todos estos trabajos abren esperanzas importantes para el desarrollo de estrategias de selección asistida por marcadores moleculares en las diferentes especies del género *Prunus*.

Otra importante aplicación de los marcadores moleculares dentro de los programas de mejora de *Prunus* ha sido la selección de nuevas variedades autocompatibles. Este carácter es prioritario en las especies predominantemente autoincompatibles como almendro y albaricoquero. Los sistemas de autoincompatibilidad en *Prunus* son de tipo gametofítico y están controlados por un solo gen con una serie multialélica (Bošković et al., 1997). En estos momentos se dispone de marcadores moleculares basados en la amplificación mediante PCR de parte de las secuencias de estos alelos de autocompatibilidad y autoincompatibilidad (Tamura et al., 2000) que permite seleccionar en el vivero las plantas auto-compatibles (Ortega y Dicenta, 2003; Sánchez-Pérez et al., 2004b) (figura 4).

Tabla 1. Marcadores moleculares asociados a los principales caracteres cualitativos (monogénicos u oligogénicos) y cualitativos (poligénicos) en *Prunus*

Table 1. Molecular markers associated to main qualitative (monogenic u oligogenic) or quantitative (polygenic) traits in *Prunus*

Especie	Carácter cualitativo	Símbolo	Marcador	Carácter cuantitativo	Marcador
<i>Melocotonero</i>	Color de la hoja	<i>Gr</i>	RAPD	Resistencia a "Leaf curl"	RAPD
	Color de la hoja	<i>Gr</i>	SSR	Longitud de entrenudos	RFLP
	Forma de la hoja	<i>E</i>	RFLP	Resistencia a mildiu	RFLP
	Flores dobles	<i>DI</i>	AFLP	Época de floración	RFLP
	Androesterilidad	<i>Ps</i>	AFLP	Época de maduración	RFLP
	Textura del fruto	<i>G</i>	AFLP	Época de maduración	SSR
	Textura del fruto	<i>G</i>	RFLP	Desarrollo del fruto	RFLP
	Color del fruto	<i>Sc</i>	SSR	Desarrollo del fruto	SSR
	Forma del fruto	<i>S</i>	RFLP	Productividad	RFLP
	Color de la pulpa	<i>Y</i>	RAPD	Diámetro del fruto	AFLP
	Color de la pulpa	<i>Y</i>	AFLP	Peso del fruto	RFLP
	Color de la pulpa	<i>Y</i>	RFLP	Peso del fruto	RFLP
	Adhesión del hueso	<i>F</i>	RFLP	Color del fruto	RFLP
	Adhesión del hueso	<i>F</i>	AFLP	Color del fruto	SSR
	Acidez del fruto	<i>D</i>	RAPD	PH del fruto	RFLP
	Acidez del fruto	<i>D</i>	RFLP	Acidez	RFLP
	Resistencia a nemátodos	<i>Mij</i>	AFLP	Ácido málico	RFLP
	Resistencia a nemátodos	<i>Mij</i>	AFLP	Ácido cítricos	RFLP
	Resistencia a nemátodos	<i>Mij</i>	STS	Sólidos solubles	RFLP
	Resistencia a nemátodos	<i>Mia</i>	AFLP	Sólidos solubles	SSR
Resistencia a nemátodos	<i>Mja</i>	STS	Contenido en fructosa	AFLP	
Resistencia a nemátodos	<i>Mja</i>	AFLP	Contenido en fructosa	RFLP	
Resistencia a nemátodos			Contenido en glucosa	RFLP	
Resistencia a nemátodos			Dureza de la cáscara	RFLP	
<i>Almendro</i>	Autoincompatibilidad floral	<i>SI</i>	RFLP		
	Autocompatibilidad floral	<i>SC</i>	RFLP		
	Sabor de la semilla	<i>Sw</i>	RFLP		
	Dureza de la cáscara	<i>D</i>	RFLP		
<i>Albaricoquero</i>	Floración tardía	<i>Lb</i>	RAPD		
	Resistencia a PPV	<i>Ppv</i>	SSR		
	Resistencia a PPV	<i>Ppv</i>	AFLP		
	Resistencia a PPV	<i>Ppv</i>	SSR		
<i>Cerezo</i>	Autoincompatibilidad floral	<i>SI</i>	RAPD		
	Androesterilidad	<i>Ps</i>	RAPD		
	Autoincompatibilidad floral	<i>SI</i>	EST	Época de maduración	RFLP
<i>Ciruelo</i>	Autocompatibilidad floral	<i>SC</i>	EST	Peso del fruto	RFLP
	Hábito de crecimiento	<i>Dw</i>	RFLP	Sólidos solubles	RFLP
	Resistencia a nematodos	<i>Ma1</i>	RAPD		
	Resistencia a nemátodos	<i>Ma1</i>	SCAR		

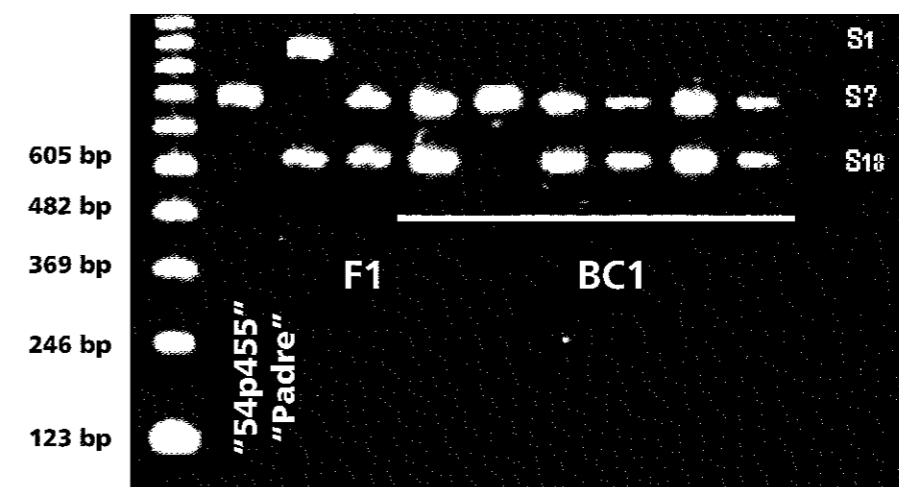


Figura 4. Aplicación de marcadores moleculares en la selección asistida de frutales del género *Prunus* dentro de los programas de mejora. Determinación de alelos de autoincompatibilidad mediante PCR en un retrocruzamiento (BC1) interespecífico entre almendro (variedad "Padre") y melocotonero (variedad "54P455").

Figure 4. Application of molecular markers in assisted selection in *Prunus* breeding programs. Self-incompatibility alleles determination by PCR in an interspecific almond (cultivar "Padre") X peach (cultivar "54P455") backcross (BC1) population.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado parcialmente por los proyectos AGF98-0991-C02-01 y AGL2001-1054-C03-01 del Ministerio de Educación y Ciencia y el proyecto PB/47/FS/02 de la Fundación Séneca de la Región de Murcia.

Bibliografía

- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P, Dirlewanger E, Ascasibar J, Cipriani G, Ryder CD, Testolin R, Abbott A, King GJ, Iezzoni AF, Arús P, 2003. A set of simple-sequence (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 819-825.
- Arulsekar S, Parfitt DE, Kester DE, 1986. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *J. Hered.* 77: 272-274.

Arús P, Moreno-González J, 1993. Marker-assisted selection. En: Hayward, MD, Bosemark, NO, and Romagosa, I. (eds). *Plant Breeding: Principles and Prospects*. London, United Kingdom: Chapman & Hall. p. 314-331.

Arús P, Messeguer R, Viruel MA, Tobutt K, Dirlewanger E, Santi F, Quarta R, Ritter E, 1994. The European *Prunus* mapping project. *Euphytica* 77: 97-100.

Badenes ML, Hurtado MA, Sanz F, Archelos DM, Burgos L, Egea J, Llácer G, 2000. Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breed.* 119: 157-160.

Baird WV, Ballard RE, Rajapakse S, Abbott AG, 1996. Progress in *Prunus* mapping and application of molecular markers to germplasm improvement. *HortScience* 31: 1099-1106.

Ballester J, Socias i Company R, Arús P, de Vicente MC, 2001. Genetic mapping of a major gene

- delaying blooming time in almond. *Plant Breed.* 120: 268-270.
- Bernhard R, 1949. The peach-almond and its utilization. *Rev. Horticole* 121: 97-101.
- Bošković R, Tobutt KR, Batlle I, Duval H, 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R, 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72.
- Daté Y, Branchard M, 1986. *In vitro* culture and cellular biotechnologies applied to plant breeding. Present state and perspectives. *Acta Hort.* 193: 17-28.
- Decroocq V, Favé MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S, 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor. Appl. Genet.* 106: 912-922.
- Dirlwanger E, Graziano E, Joobeur T, Garriga-Caldre F, Cosson P, Howad W, Arús P, 2004. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 101: 9891-9896.
- FAO, 2005. FAO Statistical Databases: Agriculture. <http://apps.fao.org>.
- Faust M, Timon D, 1995. Origin and dissemination of peach. *Hort. Rev.* 17: 331-379.
- Faust M, Surányi D, Nyujtó F, 1998. Origin and dissemination of apricot. *Hort. Rev.* 22: 225-266.
- Felipe AJ, 1975. F1 hybrids of peach and almond trees as a model for both species. *Agricultura* 44: 661-663.
- Gradziel TM, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Kester DE, 2001. The utilization of related almond species for almond variety improvement. *J. Am. Pomolog. Soc.* 55: 100-109.
- Gulcan R, 1975. Cytological studies on young seedlings of double almond seeds. In: II Colloque du Groupe de Recherche Méditerranéen, Montpellier, France. p: 15-17.
- Hammerschlag FA, 1986. Temperate fruits and nuts. En: Zimmerman RH, RJ Griesbach, FA Hammerschlag and RH Lawson (eds.), *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. p. 121-236.
- Hesse CO, 1971. Monoploid peaches, *Prunus persica* Batsch: Description and meiotic analysis. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 96: 326-330.
- Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llácer G, Badenes ML, 2002. Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica* 127: 297-301.
- Hutchinson JF, 1987. Tissue culture of temperate fruit and nut trees. *Hort. Rev.* 9: 273-350.
- Jonard R, 1986. Micrografting and its application to tree improvement. *Biotechnol. Agr. Forestry* 2: 31-48.
- Kester DE, Hansen CJ, 1966. Rootstock potentialities of F1 hybrids between peach and almond. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 89: 100-109.
- Kester DE, Gradziel TM, 1996. Almonds (*Prunus*). In: Moore, J.N. and Janick, J. (eds.) *Fruit Breeding*. New York: Wiley. p. 1-97.
- Lecoals AC, Rubio MJ, Cabetas JC, Minot R, Voisin A, Bonnet G, Salesses C, Dirlwanger E, Esmenjaud D, 1999. RAPD and SCAR markers linked to the Ma1 root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). *Theor. Appl. Genet.* 99: 328-335.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, 1998. Evaluación de la resistencia al virus de la sharka (Plum pox potyvirus) en albaricoquero. *ITEA* 94: 76-88.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, 2000. *In vitro* evaluation of apricot resistance to plum pox potyvirus. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 75: 259-261.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, 2001. Mechanisms of dormancy in sedes of peach (*Prunus persica* Batsch) cv GF305. *Sci. Hort.* 91: 51-58.
- Martínez-Gómez P, Gradziel TM, 2002. New approaches to almond breeding at the Univer-

- sity of California-Davis program. *Acta Hort.* 591: 229-232.
- Martínez-Gómez P, Gradziel TM, 2003. Sexual polyembryony in almond. *Sex. Plant Repr.* 16: 135-139.
- Martínez-Gómez P, Dicenta F, Egea J, 2000. Breaking dormancy of GF305 peach and Real Fino apricot trees during the evaluation of resistance to sharka (Plum pox potyvirus). *Agronomie* 20: 885-892.
- Martínez-Gómez P, Arulsekar S, Potter D, Gradziel TM, 2003a. An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica* 131: 313-322.
- Martínez-Gómez P, Arulsekar S, Potter D, Gradziel TM, 2003b. Relationships among peach and almond and related species as detected by SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 667-671.
- Martins M, Tenreiro R, Oliveira MM, 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 22: 71-78.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV, 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulk segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9828-9832.
- Ortega E, Dicenta F, 2003. Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. *Theor. Appl. Genet.* 106: 904-911.
- Pascal T, Pfeiffer F, Kervella J, 2001. Preliminary observations on resistance to sharka in peach and related species. V International Peach Symposium. Davis, USA. p. 15.
- Paunovic M, 1988. Apricot germplasm breeding selection cultivar rootstock and environmental. *Acta Hort.* 209: 13-28.
- Pedryc A, Korbuly J, Szabo Z, 1999. Artificial frost treatment methods of stone fruits. *Acta Hort.* 488: 377-380.
- Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Gradziel TM, Martínez-Gómez P, 2004a. Origin of almond multiple embryos and potential utilization as Near Isogenic Lines. *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. Angers, France. *Acta Hort* 663: 819-822.
- Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Martínez-Gómez P, 2004b. Identification of S-alleles in almond using multiplex-PCR. *Euphytica* 138: 263-269.
- Sánchez-Pérez R, Ruiz D, Dicenta F, Egea J, Martínez-Gómez P, 2005. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding. *Scientia Hort.* 103: 305-315.
- Scorza R, 2001. Progress in tree fruit improvement through molecular genetics. *HortScience* 36: 855-857.
- Scorza R, Mehlenbacher SA, Lightner GW, 1985. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 110: 547-552.
- Singh Z, Sansavini S, 1998. Genetic transformation and fruit crop improvement. *Plant Breed. Rev.* 16: 87-134.
- Tamura M, Ushijima K, Sassa H, Hirano H, Tao R, Gradziel TM, Dandekar AM, 2000. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theor Appl Genetics* 101: 344-349.
- Testolin R, 2003. Marker assisted selection (MAS) in stone fruits. XXVI International Horticultural Congress. Toronto, Canada. *Acta Hort.* 633: 163-176.
- Testolin R, Messina R, Lain O, Marrazzo T, Huang G, Cipriani G, 2004. Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Mol. Ecol. Notes* 4: 459-461.
- Viruel MA, Messeguer R, de Vicente MC, García-Mas J, Puigdomènech P, Vargas F, Arús P, 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theor. Appl. Genet.* 91: 964-971.
- Vlasic A, 1977. *L'Amygdalus webbi* Spach ed I suoi ibridi col pesco com portaninnestro del mandorlo. 3d Colloque GREMPA. Bari, Italy. p 80-81.

- Weeden NF, 1994. Approaches to mapping in horticultural crops. In: Gresshoff, P.M. (ed.) Plant Genome Analysis. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. p. 57-68.
- Wenzel G, Foroughi-Wehr B, 1993. *In vitro* selection. En: Hayward, M.D., Bosemark, N.O., and Romagosa, I. (eds.). Plant Breeding: Principles and Prospects. London, United Kingdom: Chapman & Hall. p. 353-371.
- Wünsch A, Hormaza JI, 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 56-67.
- (Aceptado para publicación el 30 de septiembre de 2005)