

MARCADORES DE ADN APLICADOS A LA MEJORA DE FRUTALES

J.I. Hormaza

Unidad de Fruticultura

S.I.A.-D.G.A.

Apartado 727, 50080 Zaragoza.

RESUMEN

Las técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos han experimentado importantísimos avances en los últimos años. Especialmente importantes han sido los avances en la generación de nuevos marcadores moleculares como los RFLPs, RAPDs o VNTRs, útiles para una diversidad de objetivos en mejora vegetal. Los marcadores de ADN se han utilizado especialmente en especies herbáceas, aunque este tipo de marcadores pueden ser especialmente interesantes en especies frutales debido a su largo período de juvenilidad y tardía entrada en producción. Como consecuencia, su aplicación en especies frutales ha comenzado mucho más recientemente. En este trabajo se describen los principales marcadores de ADN disponibles actualmente y se revisan los resultados obtenidos en especies frutales.

Palabras clave: Frutales, Marcadores de ADN, RAPD, RFLP, VNTR.

SUMMARY

DNA MARKERS IN FRUIT TREE BREEDING

Dramatic advances in techniques for handling and analyzing nucleic acids have taken place in recent years. One such advance has been the development of different kinds of molecular markers such as RFLPs, RAPDs or VNTRs useful for a variety of purposes in plant breeding. Although there is potentially a great practical value in the use of DNA markers in perennial fruit-crop species, mainly because of their long generation time, such markers have been most extensively used in annual plant species. As a consequence, molecular studies in most fruit-crop species are in their early stages. In this review, the main DNA markers currently available are described and the results so far obtained in fruit-tree crops are discussed.

Key words: DNA markers, Fruit trees, RAPD, RFLP, VNTR.

Introducción

En los últimos años hemos asistido a importantes avances en las técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos y proteínas. Como consecuencia se han

desarrollado diferentes tipos de marcadores moleculares, que se han empleado en el análisis del genoma de numerosas especies vegetales con diversos objetivos. Aunque el potencial práctico del uso de marcadores moleculares en frutales es enorme, princi-

palmente debido a su largo período de juvenilidad y entrada en producción, la mayoría de los trabajos han sido realizados en especies herbáceas como tomate, maíz o Arabidopsis, que son más fáciles de estudiar y sobre las que existe una gran cantidad de información genética acumulada. Debido a que los métodos de mejora utilizados en frutales (generalmente reproducidos clonalmente) son diferentes de los utilizados en la obtención de líneas puras e híbridos F1 en especies herbáceas, gran parte de los trabajos moleculares no son directamente aplicables a especies frutales con lo que la utilización de marcadores moleculares en frutales, está en proceso de iniciación.

Los primeros marcadores moleculares utilizados en mejora vegetal fueron los marcadores isoenzimáticos (TANKSLEY y ORTON, 1983) basados en polimorfismos de proteínas y que han tenido una gran repercusión en especies frutales (TORRES, 1990). No obstante, la utilidad de las isoenzimas se ve limitada por el pequeño número de sistemas isoenzimáticos disponible. Esto hace que el número de polimorfismos obtenidos en muchas especies sea insuficiente, en especial cuando se trata de cultivares genéticamente próximos. Por otro lado, al ser productos de la expresión genética, los patrones isoenzimáticos se pueden ver influidos por factores de desarrollo, del tipo de tejido estudiado o ambientales. Por ello es interesante recurrir directamente al ADN, ya que su variabilidad entre individuos o cultivares es muy grande debido a que se pueden comparar regiones del genoma tanto codificantes como no codificantes. Sin embargo, hasta hace pocos años, no ha existido una manera directa de utilizar esa variabilidad en la secuencia del ADN en genética vegetal. La forma más directa de detectar esta variabilidad consiste en la secuenciación del

ADN y la comparación de las secuencias obtenidas. Sin embargo, este método todavía es impracticable a gran escala. Alternativamente, en los últimos años han surgido diversas técnicas para el desarrollo de marcadores moleculares que pueden complementar los resultados obtenidos previamente con isoenzimas. En esta revisión se describen los distintos tipos de marcadores de ADN que se utilizan en la actualidad, se examinan las aplicaciones y los resultados obtenidos en especies frutales y, finalmente, se analizan las ventajas y las desventajas que presentan este tipo de marcadores moleculares.

Tipos de marcadores moleculares

Los 'Restriction Fragment Length Polymorphisms' (RFLPs) han sido los marcadores de ADN más usados (TANKSLEY et al., 1989) hasta la llegada de nuevas estrategias surgidas a la luz de los recientes desarrollos en la tecnología basada en la reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction" o PCR). Entre estas nuevas técnicas, la más conocida es la del ADN polimórfico amplificado al azar ("Random Amplified Polymorphic DNA" o RAPD) (WILLIAMS et al., 1990).

"RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphisms".

Los RFLPs fueron introducidos a principios de los años 80 en estudios del genoma humano (BOLSTEIN et al., 1980). Se basan en el empleo de una clase especial de enzimas, las enzimas de restricción, que son nucleasas producidas por una gran variedad de bacterias donde actúan como un mecanismo de defensa frente a la presencia de

ADN extraño. Estas enzimas son capaces de reconocer secuencias en el ADN y cortar el ADN en ese lugar. En las bacterias que producen estas nucleasas el ADN está protegido mediante metilación y sólo el ADN no protegido es cortado. De esta forma, el ADN se ve reducido a una serie de fragmentos de un tamaño determinado, de forma que el número de fragmentos producidos y su tamaño es una consecuencia de la distribución de las secuencias reconocidas por la enzima de restricción a lo largo del genoma. Los fragmentos así producidos son específicos para cada combinación ADN/enzima de restricción y se pueden usar como una huella dactilar específica para cada ADN (o para el organismo que contiene ese ADN). Los polimorfismos en el tamaño de los fragmentos que surgen de la digestión con enzimas de restricción del ADN se llaman "restricción fragment length polymorphisms (RFLP)" y se pueden usar como una medida directa de la variabilidad genética. La separación de los fragmentos según su tamaño se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. Los RFLPs en especies vegetales se pueden estudiar sobre ADN de cloroplastos, de mitocondrias o ADN genómico. La ventaja del estudio de ADN cloroplástico (BACHMANN, 1994) es que, al ser de pequeño tamaño, al emplear enzimas de restricción se obtienen pocos fragmentos, con lo que los RFLPs obtenidos se pueden visualizar directamente tiñendo el gel de electroforesis con bromuro de etidio. Aunque diversos estudios han utilizado RFLPs de ADN de cloroplastos para estudiar relaciones filogenéticas y sistemáticas en distintos grupos vegetales, su utilidad en mejora vegetal se ve limitada por el hecho de que la mayoría de los genes de importancia agronómica se encuentran en el ADN nuclear. Sin embargo, los RFLPs obtenidos gracias a la digestión de ADN nuclear no se pueden visualizar directamente, ya que el

número de fragmentos producidos es tan grande que teñidos con bromuro de etidio aparecen como una banda continua sobre el gel. Por ello, es necesario identificar unos pocos fragmentos de restricción, lo que se hace mediante la hibridización de pequeñas sondas de ADN (generalmente de una longitud entre 2000 y 5000 bases). Para ello, se transfiere previamente el ADN del gel de electroforesis a una membrana especial, por un procedimiento llamado transferencia "Southern", y la sonda marcada se hibridiza con los fragmentos de ADN de la membrana homólogos a ella bajo condiciones determinadas de temperatura y salinidad. El marcaje de la sonda se realizaba hasta hace pocos años con isótopos radioactivos como el P32. Sin embargo, actualmente se pueden emplear medios no radioactivos, lo que facilita el manejo de la técnica. El resultado final del proceso es la obtención de un patrón específico ADN-enzima de restricción-sonda. Variando cualquiera de los tres elementos se obtiene un patrón diferente.

La técnica de RFLPs ha sido muy utilizada en las décadas de los 80 y 90 y es muy precisa. Sin embargo, su principal limitación radica en la complejidad que entraña su aplicación. Debido a ello, se han desarrollado otro tipo de marcadores que permiten completar la información obtenida con el uso de RFLPs.

"RAPDs: Randomly Amplified Polymorphic DNA."

La utilización de marcadores de RAPDs comenzó a principios de los años 90 en diferentes organismos (WILLIAMS et al., 1990) y su uso se ha extendido muy rápidamente especialmente por su facilidad de manejo, lo que ha permitido una extensión del uso de marcadores moleculares a muy diversos

campos de la biología vegetal. En este caso, el ADN no se digiere con enzimas de restricción, sino que se amplifican determinados fragmentos del genoma mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction" o "PCR") gracias a una ADN polimerasa. Para realizar su función, las ADN polimerasas requieren un fragmento de ADN preexistente que actúe como cebador y sobre el que se produce la síntesis de nuevo ADN. El proceso general de una reacción de PCR consiste en la preparación de una solución con el ADN que se quiere amplificar, el cebador, la ADN polimerasa, los nucleótidos para que la enzima sintetice nuevo ADN y una solución tampón necesaria para que pueda actuar la enzima. Posteriormente se somete la muestra a distintas temperaturas, lo que se ha automatizado con la ayuda de termocicladores que se pueden programar con las temperaturas y ciclos necesarios. En una primera fase (fase de desnaturalización) se calienta la solución por encima de los 90° para que se desnaturalice el ADN; en una segunda fase (fase de hibridización) se disminuye la temperatura hasta un punto en el que se pueda unir el cebador al ADN (esta temperatura depende de la longitud del cebador y de su secuencia de bases); por último (fase de extensión del cebador) se incrementa la temperatura hasta un punto óptimo para la actuación de la ADN polimerasa (alrededor de 70°). Una vez concluida esta tercera fase se vuelve a comenzar el ciclo, y así sucesivamente. En cada ciclo se produce una amplificación exponencial del ADN. Si el objetivo es la amplificación de una secuencia determinada del genoma, se utilizan cebadores complementarios a esa secuencia, de forma que la ADN polimerasa extiende una nueva cadena de ADN a partir de esos cebadores y se amplifica el fragmento de interés. En la técnica de RAPDs se utilizan cebadores de secuencia aleatoria,

generalmente de diez nucleótidos de longitud, que se unen al genoma en los lugares donde existen secuencias complementarias. Una vez terminada la amplificación, los fragmentos amplificados se separan en geles de agarosa y el gel de agarosa se tiñe con bromuro de etidio, que se une al ADN y permite la visualización de los fragmentos utilizando luz ultravioleta. Cada producto de amplificación deriva de regiones del genoma cuyos extremos son segmentos de ADN complementarios de la secuencia del cebador utilizado.

De esta forma, diferentes cebadores producen la amplificación de distintos fragmentos de ADN. Los polimorfismos entre individuos, utilizando el mismo cebador, pueden surgir de diferentes formas (WILLIAMS et al., 1990). Una manera es mediante cambios en la secuencia de nucleótidos en el lugar de unión del cebador al ADN impidiendo la amplificación de un fragmento determinado. También pueden surgir mediante inserciones que hacen que los lugares de unión del cebador queden demasiado alejados para que pueda tener lugar la amplificación. Por último, inserciones o deleciones pueden cambiar el tamaño del segmento amplificado. Como resultado, pequeñas divergencias entre dos individuos resultan en diferentes patrones de amplificación. Utilizando diferentes cebadores las oportunidades para estudiar el genoma son enormes.

Los RAPDs presentan una serie de ventajas comparados con los RFLPs (WILLIAMS et al., 1990, 1993). Por un lado, no se requiere el uso de radioactividad, clonaje y marcaje de sondas, transferencias a membranas o hibridaciones, ya que las secuencias amplificadas lo son hasta tal punto que se pueden visualizar directamente tras teñirlas con bromuro de etidio. Además, solamente se requiere una pequeña cantidad de

ADN, que no necesita ser de alta calidad, el ensayo es rápido y fácil de realizar, los RAPDs no requieren una información previa de la secuencia del DNA y el poliformismo que se obtiene es generalmente alto.

No obstante, los RAPDs también presentan limitaciones, que deben ser tenidas en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos (NEWBURY y FORD-LLOYD, 1993; BACHMANN, 1994). Una limitación consiste en la posible contaminación de las muestras con otro ADN antes de la reacción de PCR, con lo que se puede amplificar un ADN extraño. Además, el proceso de amplificación ocurre al azar, lo puede causar problemas en la repetición de los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios. Por otra parte, se asume que los fragmentos de amplificación que migran a la misma velocidad en el gel de electroforesis y parezcan ser de un tamaño similar representan productos de amplificación homólogos pero esto puede no ser cierto, especialmente cuando comparamos dos individuos distantes genéticamente. Por último, al estudiarse como presencia o ausencia del marcador, los RAPDs son marcadores dominantes, en contraposición a los RFLPs que son marcadores codominantes, lo que implica que no es posible la distinción entre individuos heterocigóticos y homocigóticos para la presencia de un marcador. Los marcadores dominantes son especialmente útiles en análisis de ligamiento ya que se obtiene más información por individuo que con marcadores codominantes

Algunas de las desventajas de los RAPDs, especialmente la presencia de secuencias repetitivas, su susceptibilidad a los cambios en las condiciones de la reacción o su carácter codominante pueden ser superadas mediante el empleo de marcadores "SCAR" ("Sequence Characterized Amplified Regions") (PARAN y MICHEL-

MORE, 1993), que se obtienen utilizando cebadores obtenidos a partir de marcadores RAPDs. Para ello, se secuencian los extremos de un fragmento de RAPD de interés y se sintetizan cebadores de más de 20 bases a partir de esos extremos; estos nuevos cebadores se utilizan para amplificar el ADN en unas condiciones de reacción que producen una mayor especificidad, ya que se unen únicamente al lugar del genoma complementario a esa secuencia y el resultado esperado es un único fragmento de amplificación. No obstante, esta técnica no es utilizable a gran escala puesto que invalida la ventaja principal de los RAPDs que es la facilidad y rapidez del ensayo.

"VNTRs: Variable Number of Tandem Repeats"

Es una técnica relacionada con los RFLPs, ya que en sus inicios también utilizaba técnicas de hibridización, y que comenzó a utilizarse a mediados de los años 80 en estudios del genoma humano (JEFREYS et al., 1985). En este caso, se identifican secuencias repetitivas que se encuentran dispersas en los genomas de todos los organismos eucariotas. Cuando se utilizan como sondas, estas secuencias producen "huellas dactilares" de ADN debido a la diferencia en el número de repeticiones entre distintos individuos. Los VNTRs se clasifican según el tamaño de la unidad monomérica en minisatélites (unidades de tándem de 9-65 pares de bases) y microsatélites (unidades de tándem de 1-10 pares de bases) también denominados "Simple Sequence Repeats (SSR)" (RAFALSKI y TINGEY, 1993). Una sonda frecuentemente utilizada es una secuencia del ADN del bacteriófago M13, que ha revelado minisatélites en la mayor parte de los organismos en los que se ha empleado.

Debido a que la generación de marcadores de microsátélites es laboriosa, se ha desarrollado una modificación, denominada "SAM (Selective Amplified Microsatellites)", que consiste en utilizar la técnica de PCR para amplificar secuencias que contienen microsátélites; últimamente la denominación de SSR se está reservando exclusivamente a este método.

Otros marcadores de ADN

Existen otros marcadores moleculares, como "Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP)", que consisten en una combinación de RFLPs y PCR ya que se basan en la amplificación por PCR de fragmentos específicos obtenidos tras la digestión del ADN genómico, cuya aplicación en mejora vegetal dependerá del desarrollo de tecnologías económicamente efectivas (RAFALSKI y TINGEY, 1993; AVISE, 1994; BACHMANN, 1994). Como sugiere CAETANO-ANOLLÉS (1993), el mejor ensayo sería aquel basado en la eficiente generación de marcadores de ADN y la determinación de su secuencia completa. Conforme las técnicas de secuenciación de ADN sean más económicas y automatizadas, los análisis genéticos se basarán directamente en el análisis de la secuencias, y la mayoría de las técnicas utilizadas actualmente para la generación de marcadores moleculares se convertirán en obsoletas.

Aplicaciones de los marcadores de ADN y resultados obtenidos en frutales

A pesar de que el uso de marcadores de ADN en frutales es más reciente que en especies herbáceas, en los últimos años se han producido importantes avances en la aplicación de este tipo de marcadores en

especies frutales. Estos son los campos en los que ha habido avances significativos:

Identificación de material vegetal: patrones y variedades

Los marcadores moleculares se pueden utilizar para realizar análisis de paternidad y caracterizar el material vegetal tanto de patrones como de variedades. Por tanto, los marcadores moleculares pueden ser útiles en la protección de los derechos del mejorador, en la conservación de germoplasma evitando posibles duplicaciones de material, o en la clarificación de errores en sinonimias (la misma variedad con distintos nombres) y homonimias (diferentes variedades con el mismo nombre) frecuentes en algunas especies frutales. Con este objetivo, los RFLPs se han utilizado en manzano (WATILLON et al., 1991; NYBOM et al., 1990) y *Prunus* (NYBOM et al., 1990, RAJAPAKSE et al., 1995). Los RAPDs se han empleado en pistachero (DOLLO et al., 1995), olivo (FABRI et al. 1995), manzano (MULCAHY et al., 1993; TANCRED et al., 1994; KOLLER et al., 1993; HARADA et al., 1993; DUNEMANN et al., 1994) y *Prunus* (SHIMADA et al., 1994).

Relaciones de similaridad y filogenéticas

En la mayoría de los casos estudiados, los marcadores moleculares corroboran las relaciones previamente establecidas entre especies o variedades basadas en el origen geográfico o en marcadores morfológicos, con la ventaja de que la información obtenida utilizando marcadores moleculares es muy superior a la obtenida utilizando técnicas tradicionales. La estimación de la distancia genética entre cultivares puede ser interesante a la hora de elegir entre los culti-

vares que actúan como parentales cuando interese maximizar el nivel de heterosis.

En estudios de similaridad los RFLPs se han utilizado en nogal (FJELLSTROM et al., 1994) y los RAPDs en pistachero (HORMAZA et al., 1994b), olivo (FABRI et al., 1995), manzano (DUNEMAN et al., 1994) y *Prunus* (SHIMADA et al., 1994).

En estudios filogenéticos, en *Prunus* se han utilizado RFLPs con ADN de cloroplastos (KANEKO et al., 1986; UEMATSU et al., 1991; BADENES y PARFITT, 1995) y en *Malus* (ISHIKAWA et al., 1992; KATO et al., 1993) se han utilizado RFLPs con ADN de cloroplastos y mitocondrias y en *Juglans* RFLPs con ADN genómico (FJELLSTROM y PARFITT, 1994b). Además en *Malus* también se han utilizado RAPDs (DUNEMAN et al., 1994) y secuenciación de ADN de cloroplastos (SAVOLAINEN et al., 1995).

Construcción de mapas genéticos

Los mapas genéticos o de ligamiento consisten en la ubicación de diferentes marcadores moleculares en los cromosomas de una especie conociendo la distancia genética entre ellos. La construcción de un mapa genético puede permitir la localización de marcadores moleculares asociados a genes de interés.

Actualmente están en proceso varios proyectos de construcción de mapas genéticos de especies frutales. En la mayoría de dichos programas se combinan marcadores isoenzimáticos, RFLPs y RAPDs. En concreto podemos resaltar resultados en nogal (FJELLSTROM y PARFITT, 1994a), manzano (HEMMAT et al., 1994; WEEDEN et al., 1994; GARDINER et al. 1994) y *Prunus* (EEL-DREDGE et al., 1992; DIRLEWANGER y BODO, 1994; CHAPARRO et al., 1994; RAJAPAKSE et

al., 1995; FOOLAD et al., 1995; VIRUEL et al., 1995). También hay que considerar los proyectos de colaboración entre varios países, como el proyecto europeo de mapeo del genoma de manzano, que incluye diferentes laboratorios en siete países europeos (KING, 1994) o el proyecto europeo de mapeo de *Prunus* en el que participan cuatro países europeos (ARÚS et al., 1994).

Selección asistida por marcadores o "MAS (Marker Aided Selection)"

Este tipo de selección está basada en el ligamiento entre marcadores moleculares y un carácter de interés agronómico, con lo que, en lugar de seleccionar directamente el carácter de interés, el mejorador puede seleccionar el marcador, lo que permite la selección en un estado temprano de desarrollo y, al mismo tiempo, la utilización de un alto número de plántulas. Las ventajas son especialmente importantes en su aplicación a especies frutales. En plantas herbáceas es muy común utilizar líneas casi isogénicas ("near isogenic lines") que generalmente se obtienen tras introgresión y sucesivos retrocruzamientos, de forma que al final se obtienen líneas que difieren únicamente en un carácter, con lo cual los marcadores divergentes entre ambas líneas estarían ligados al carácter que las diferencia. Al ser esta técnica impracticable en frutales, se han propuesto técnicas alternativas, como el "Bulked Segregant Analysis (BSA)" (PARAN y MICHELMORE, 1993) que consiste en agrupar individuos que segregan para un carácter determinado en dos grupos; uno con presencia del carácter de interés y otro con su ausencia; en principio, los marcadores moleculares que difieren entre los dos grupos estarían ligados al carácter de interés. Esta técnica se ha utilizado con éxito especialmente con RAPDs.

La técnica de RAPDs se ha utilizado en pistachero para localizar un marcador ligado al sexo (HORMAZA et al., 1994a), en manzano para localizar un marcador ligado a resistencia a la roña (YANG y KRÜGER, 1994) y en *Prunus* un marcador ligado a una mutación causada por irradiación (YANG y SCHMIDT, 1994).

Introgresión de genes

Tradicionalmente se requieren un alto número de retrocruzamientos para la introducción de un carácter determinado en un cultivar, con lo que, debido al gran período de juvenilidad de las especies frutales, es impracticable en la mayoría de los casos. Los marcadores moleculares pueden reducir enormemente el número de generaciones de retrocruzamientos necesarias, permitiendo la incorporación de genes interesantes presentes en especies salvajes en el genoma de variedades de frutales interesantes.

En manzano se han utilizado RAPDs para localizar un segmento cromosómico introducido a partir de una especie salvaje (DURHANY KORBAN, 1994).

Ventajas y desventajas de los marcadores de ADN

Varias son las ventajas que presentan los marcadores moleculares frente a los marcadores convencionales.

Una de ellas es el alto número de marcadores de ADN teóricamente posible ya que utilizan la abundante variación existente en la secuencia de ADN tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma; sin embargo, los marcadores convencionales deben corresponder a genes detectables fenotípicamente con lo que su número es

muy inferior. Además, los marcadores genéticos convencionales, y también los marcadores isoenzimáticos, son resultado de la expresión genética, lo que implica que esos genes se expresan solamente en algunos tejidos de la planta, en determinados estados de desarrollo o bajo determinadas condiciones ambientales; los marcadores moleculares de ADN no presentan este tipo de inconvenientes al no ser dependientes de la expresión genética. Por último, los marcadores de ADN son generalmente inocuos para el individuo analizado, ya que una pequeña cantidad de ADN es generalmente suficiente para su caracterización; por el contrario, algunos de los marcadores genéticos convencionales pueden ser destructivos para la planta.

No obstante, el uso de marcadores moleculares también presenta desventajas. Una de ellas, que es la complejidad técnica, está desapareciendo progresivamente y el uso de marcadores moleculares puede ser ya incorporado a la mayoría de los programas de mejora, incluso en laboratorios sin previa experiencia con técnicas de biología molecular. Otro problema, inherente a la propia naturaleza de los marcadores moleculares, es que el marcador no es directamente el carácter de interés y el ligamiento entre el marcador y el carácter a seleccionar se puede romper por recombinación o mutación.

En última instancia en mejora vegetal se intenta reunir en un individuo una serie de caracteres interesantes; aunque una alta proporción de ellos pueden llegar a ser localizados molecularmente, hay otros cuya observación sólo se puede realizar a nivel fenotípico. Como consecuencia, podemos considerar a los marcadores de ADN como una poderosa herramienta para seleccionar para un carácter determinado en una fase temprana del desarrollo del árbol frutal lo

que permite aumentar el tamaño de la población sobre la que seleccionar y, como consecuencia, la probabilidad de obtener éxito en el proceso de selección. Sin embargo, esto no excluye que la fase posterior de selección, una vez realizado el primer cribado, incluya técnicas tradicionales donde se valoren otro tipo de parámetros.

Bibliografía

- ARÚS P., MESSEGUER R., VIRUEL M., TOBUIT K.T., DIRLEWANGER E., SANTI F., QUARTA R., RIUTER E., 1994. The European *Prunus* mapping project. *Euphytica* 77: 97-100.
- AVISE J.C., 1994. Molecular markers. natural history and evolution. Chapman & Hall Inc., New York.
- BACHMANN K., 1994. Molecular markers in plant ecology. *The New Phytologist* 126: 403-418.
- BADENES M.L., PARFITT D.E., 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1035-1041.
- BOLSTEIN D., WHITE R.L., SKOLNICK M., DAVIS R.W., 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-330.
- CAETANO-ANOLLÉS G., 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods and Applications* 3: 85-94.
- CHAPARRO J.X., WERNER D.J., O'MALLEY D., SEDEROFF R.R., 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 805-815.
- DIRLEW E., BODO C., 1994. Molecular genetic mapping of peach. *Euphytica* 77: 101-103.
- DOLLO L., HORMAZA J.I., POLITO V.S., 1995. RAPD polymorphism among pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Fruit Varieties Journal* 49(3): 147-152.
- DUNEMAN F., 1994. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD "fingerprinting" of cultivars and wild species. En: H. Schmidt, M. Kellerhals (eds.). *Progress in temperate fruit breeding*, pp. 309-311. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- DURMAN R.E., KORBAN S.S., 1994. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 79(1-2): 109-114.
- ELDRIDGE L., BALLARD R., BAIRD W.V., ABBOTT A., MORGENS P., CALLAHAN A., SCORZA R., MONET R., 1992. Application of RFLP analysis to genetic linkage mapping in peaches. *HortScience* 27(2): 160-163.
- FABBRI A., HORMAZA J.I., POLITO V.S., 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120(3): 538-542.
- FIJELLSTROM R.G., PARFITT D., 1994 a. RFLP inheritance and linkage in walnut. *Theoretical And Applied Genetics* 89(6): 665-670.
- FIJELLSTROM R.G., PARFITT D., 1994 b. Walnut (*Juglans* spp.) genetic diversity determined by restriction fragment length polymorphisms. *Genome* 37(4):690-700.
- FIJELLSTROM R.G., PARFITT D.E., MCGRANAHAN G., 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119(4):833-839.
- FOOLAD M.R., ARUISEKAR S., BECERRA V., BLISS F.A., 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 262-269.
- GARDINER S.E., ZHU J.M., WHITEHEAD H.C.M., MADIE C., 1994. The New Zealand apple genome mapping project. *Euphytica* 77: 77-81.
- HARADA T., MATSUKAWA K., SATO T., ISHIKAWA R., NIIZEKI M., SAITO K., 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65: 87-91.
- HEMMAT M., WEEDEN N.F., MANGANARIS A.G., LAWSON D.M., 1994. Molecular marker linkage map for apple. *Journal of Heredity* 85: 4-11.
- HORMAZA J.I., DOLLO L., POLITO V.S., 1994 a. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 89(1): 9-13.

- HORMAZA J.I., DOLLO L., POLITO V.S., 1994 b. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* L. (Pistachio) germ-plasm by RAPD analysis. *Economic Botany* 48(4): 349-358.
- IISHIKAWA S., KATOS., IMAKAWA S., MIKAMI T., SHIMAMOTO Y., 1992. Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 963-967.
- JEFFREYS A.J., WILSON V., THEIN S.L., 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- KANEKO T., TERACHI T., TSUNEWAKI K., 1986. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. *Japanese Journal of Genetics* 61: 157-168.
- KATO S., IISHIKAWA S., IMAKAWA S., KOMORI S., MIKAMI T., SHIMAMOTO Y., 1993. Cytoplasmic relatedness of apple landraces and cultivars: A molecular analysis. *Euphytica* 66(1-2):99-102.
- KING G.J., 1994. Progress in mapping agronomic genes in apple (The European Apple Genome Mapping Project). *Euphytica* 77: 65-69.
- KOLLER B., LEHMANN A., MCDERMOTT J.M., GESSLER G., 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 85: 901-904.
- MULCAHY D.L., CRESTIM., SANSAVINI S., DOUGLAS G.C., LINSKENS H.F., MULCAHY G.B., VIGNANI R., PANCALDI M., 1993. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Scientia Horticulturae* 54: 89-96.
- NEWBURY H.J., FORD-LLOYD B.V., 1993. The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation* 12: 43-51.
- NYBOM H., ROGSTAD S.H., SCHALL B.A., 1990. Genetic variation detected by the use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (Rosaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 79:153-156.
- PARAN I., MICHELMORE R.W., 1993. Development of PCR-based markers linked to downy mildew resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 85(8): 985-993.
- RAFALSKI J.A., TINGEY S.V., 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics* 9(8): 275-280.
- RAJAPAKSE S., BELTHOFF L.E., HE G., ESTAGER A.E., SCORZA R., VERDE I., BALLARD R.E., BAIRD W.V., CALLAHAN A., MONET R., ABBOTT A.G., 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 503-510.
- SAVOLAINEN V., CORBAZ R., MONCOUSIN C., SPICHTER R., MANEN J.F., 1995. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1138-1141.
- SHIMADA T., HAJI T., YAMAGUCHI M., TAKEDA T., NOMURA K., YOSHIDA M., 1994. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 63(3): 543-551.
- TANCRED S.J., ZEPPA A.G., GRAHAM G., 1994. The use of the PCT-RAPD technique in improving the plant variety rights description of a new Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 34(5): 665-667.
- TANKSLEY S.D., ORTON T.J., 1983. *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier, New York.
- TANKSLEY S.D., Young N.D., PATERSON A.H., BONIERBALE M.W., 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for and old science. *Bio/Technology* 7: 257-264.
- TORRES A.M., 1990. Isozyme analysis of tree fruits. En: D.E. Soltis, P.S. Soltis (eds.), *Isozymes in plant biology*, pp. 192-205. Chapman and Hall, London.
- UEMATSU C., SASAKUMA T., OGIHARA Y., 1991. Phylogenetic relationships in the stone-fruit group of *Prunus* as revealed by restriction fragment analysis of chloroplast DNA. *Japanese Journal of Genetics* 66: 59-69.
- VIRUEL M.A., MESSEGUER R., DE VICENTE M.C., GARCÍA-MAS J., PUJOLÀ P., VARGAS F., ARUS P., 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theoretical and Applied Genetics* (en prensa).
- WATILLON B., DRUART P., DU JARDIN P., KETTMANN R., BOXUS P., BURNY A., 1991. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Scientia Horticulturae* 46: 235-243.

- WEEDEN N.F., HEMMAT M., LAWSON D.M., LODHI M., BELL R.L., MANGANARIS A.G., REISCH B.I., BROWN S.K., YE G.N., 1994. Development and application of molecular marker linkage maps in woody fruit crops. *Euphytica* 77: 71-75.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKY J.A., TINGEY S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
- WILLIAMS J.G.K., HANAFEY M.K., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V., 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.
- YANG H., KRÜGER J., 1994. Identification of a RAPD marker linked to the Vf gene for scab resistance in apples. *Plant Breeding* 112: 323-329.
- YANG H., SCHMIDT H., 1994. Selection of a mutant from adventitious shoots formed in X ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. *Euphytica* 77: 89-92.

(Aceptado para publicación el 26 de octubre de 1995)