



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

Obtención de marcadores moleculares para su aplicación a la mejora genética del albaricoquero

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Mónica Hurtado Ruiz

Dirigida por:

M^a Luisa Badenes Catalá

Gerardo Llácer Ill

Valencia 1999

Realizada en el Instituto Valenciano
de Investigaciones Agrarias (IVIA)

AGRADECIMIENTOS

Durante los años que he estado en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias he conocido mucha gente que me ha ayudado, apoyado y de las que he aprendido mucho. Quiero darles las gracias a todos ellos y en especial:

A Silvia y a M^aAngeles, cuya compañía fue muy grata durante mis primeros años de laboratorio, y con las que todavía me une una buena amistad.

A Lidón por los consejos que me dió y trucos de laboratorio que me enseñó para facilitarme el trabajo.

A los becarios del Departamento de Citricultura que han coincidido conmigo en estos últimos años: Ana Vidal, Ana Quiñones, Waddi, Jalel, Aurelio, Juan, Nacho, Domingo y José Luís, con los que he compartido pasillo y conversaciones.

A los becarios del Laboratorio de Biotecnología, Magda, Riat y Antonio, que amablemente me hacían un hueco para utilizar su máquina PCR de 40 tubos.

A los chicos del Departamento de Mecanización, Pedro López, Pedro, Paco, Talo, Bernardo, Jose, Juan, Nuria y Enrique, de los que he aprendido mucho sobre presentaciones orales y que me han ayudado a resolver muchos de mis problemas con el ordenador.

A Rafa, Pepe, Tarek y Jose por ayudarme con el material vegetal y especialmente por su simpatía.

A Lola y Paco por nuestras interesantes y divertidas conversaciones entre PCR y PCR.

A Aurelio y Marina que endulzaban nuestro trabajo con sus maravillosos zumos de naranja.

A los compañeros del Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia), Lorenzo Burgos y José Egea, que pusieron a nuestra disposición las familias segregantes para la realización de esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética de la Universidad de Clemson (Carolina del Sur), Vivi, Xavier, Paco, Elizabeth, Sookie, Kathy, Irene, Laura y Bryon que me ayudaron a adaptarme al estilo de vida americano. Especialmente quiero prestar mi más sincero agradecimiento a Linda, que pese a formar parte de otro laboratorio, puso mucho interés en intentar resolver mi problema con la sonrisa invertida de mis geles de AFLPs.

A mis amigos de Clemson, Thomas, Marta, Núria, Iván y Stephany, con los que compartí muy buenos momentos.

A mi familia por prestarme siempre su apoyo incondicional, y especialmente a Bosco, que me ha ayudado mucho mejorando la presentación de fotos y figuras, y a Ana, que me ha desvelado los secretos del Microsoft Word.

Finalmente a Marisa, Bert y Gerardo, que me han posibilitado conocer el mundo de la investigación y de los que he aprendido mucho.

A mi familia

RESUMEN

La especie albaricoquero (*P. armeniaca* L.) es un frutal de zonas templadas que, originario de China y Asia Central, se ha adaptado a una gran variedad de zonas geográficas por medio de una gran diversificación varietal. En los países de la cuenca mediterránea, su cultivo es de gran importancia en países como Turquía, España, Italia, Grecia, y Francia. En España, se cultiva principalmente en Murcia y Valencia. En ambas áreas el cultivo se apoya en variedades autóctonas muy bien adaptadas. Estas variedades reúnen unas características agronómicas y comerciales aceptables, sin embargo recientemente se ha puesto de manifiesto la necesidad del establecimiento de programas de mejora genética encaminados a la mejora de las variedades en tres aspectos fundamentales: calidad, autocompatibilidad y resistencia al virus de la Sharka. La especie albaricoquero se ha considerado tradicionalmente como una especie autocompatible, sin embargo la progresiva desaparición de polinizadores ha puesto de manifiesto que la incompatibilidad es un carácter más extendido de lo que en principio se creía. Pero el problema que ha determinado realmente la necesidad de mejorar las variedades de albaricoquero en España ha sido la aparición y extensión del virus de la Sharka. Todas las variedades europeas tradicionales de albaricoquero son susceptibles al virus, siendo las variedades precoces las que presentan los síntomas más fuertes. Este virus desde su primera detección en España (Llácer y col., 1985 a, b) ha pasado a ser el primer factor limitante del cultivo en la Comunidad Valenciana. La Sharka es actualmente la virosis frutal de mayor importancia económica en Europa, debido a los graves daños que produce sobre algunos frutales de hueso, especialmente albaricoqueros y ciruelos. En estos momentos nuestro país es el primer exportador mundial de albaricoque fresco y el segundo productor europeo. Con la aparición a mediados de los años 80 del virus de la Sharka procedente de Centro Europa, las principales zonas de cultivo españolas están siendo gravemente afectadas por esta enfermedad. Incluso se teme por la continuidad del cultivo en zonas como Murcia o Valencia donde se produce más del 80% del total del país. Debido a las características de transmisión de este virus y la presencia de vectores muy eficientes en la transmisión, la erradicación de la enfermedad en España no es posible. La solución al problema pasa por el cultivo de variedades resistentes a este virus. Se han descrito algunas variedades

norteamericanas que presentan resistencia a la enfermedad, pero son variedades que presentan problemas de productividad y características agronómicas desfavorables en las condiciones españolas de cultivo.

Con el fin de introducir resistencia a Sharka en variedades autóctonas se iniciaron una serie de programas de mejora en España (Egea y col., 1997), Francia (Audergon, 1995), Italia (Bassi y col., 1995) y Grecia (Karayiannis y col., 1998). Un trabajo previo a la mejora es la caracterización de las variedades a utilizar en dichos programas. En el programa de mejora que se desarrolla en el IVIA se han caracterizado las variedades utilizadas en el mismo mediante métodos pomológicos (Badenes y col., 1997), isoenzimáticos (Badenes y col., 1996) o marcadores moleculares tipo RAPDs (Hurtado y col., 1997).

El objetivo principal de la tesis es la obtención de marcadores moleculares de ayuda a la mejora genética del albaricoquero. Para ello se han utilizado los marcadores moleculares que se han definido útiles en los procesos de selección en programas de mejora: RAPDs, RFLPs y AFLPs. Con ellos se ha realizado un estudio de diversidad genética utilizando 16 variedades de albaricoquero procedentes de Francia, España y Norteamérica, que incluyen variedades resistentes y susceptibles a Sharka, de las cuales algunas de ellas se están utilizando como genitores en los programas de mejora actuales. También se ha elaborado un mapa genómico de la especie estudiada, basado en los marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism). Para cumplir este objetivo se ha utilizado una población segregante F1, formada por un total de 81 individuos y resultante del cruce Goldrich x Valenciano 1. Goldrich es una variedad norteamericana autoincompatible, poco adaptada a las condiciones de la Comunidad Valenciana, pero que presenta resistencia a Sharka. Por el contrario, la variedad autóctona Valenciano 1 se caracteriza por su susceptibilidad a Sharka, pero posee caracteres de interés agronómico, es autocompatible y produce frutos de gran calidad.

Con el fin de obtener un marcador molecular ligado al carácter autoincompatibilidad y androesterilidad en albaricoquero, se ha realizado un estudio

sobre un familia segregante formada por el cruce de dos variedades murcianas Gitano x Pepito del Rubio. Gitano es una variedad autoincompatible mientras que Pepito del Rubio es autocompatible. Ambas variedades son heterocigotas para el carácter androesterilidad. Para ello se ha utilizado la técnica del Bulk Segregation Analysis (BSA) con marcadores moleculares tipo RAPD.

El objetivo final de la tesis es la puesta apunto de las técnicas moleculares para la especie albaricoquero y la obtención de marcadores moleculares que permitan simplificar y ayudar en la selección de individuos procedentes del programa de mejora del albaricoquero del IVIA.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1.- El albaricoquero: <i>Prunus armeniaca</i>	3
1.2.- Descripción taxonómica y botánica de la especie.....	3
1.3.- Origen y distribución del cultivo.....	4
1.4.- Importancia económica del cultivo.....	5
1.5.- Diversificación varietal.....	9
1.6.- El virus de la Sharka.....	12
1.6.1.- Referencia histórica y distribución geográfica.....	12
1.6.2.- Importancia económica.....	13
1.6.3.-Agente causal.....	15
1.6.4.- Huéspedes.....	15
1.6.5.- Síntomas.....	16
1.6.6.- Epidemiología y control de la enfermedad.....	17
1.6.7.- Sensibilidad varietal.....	19
1.6.8.- Fuentes de resistencia.....	20
1.7.- Mejora genética y caracterización varietal.....	21
1.8.- Marcadores genéticos.....	26
1.8.1.- Marcadores morfológicos.....	26
1.8.2.- Isoenzimas.....	26
1.8.3.- RFLPs (Restriction fragment length polymorphism).....	27
1.8.4.- RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).....	29
1.8.5.- AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism).....	30
1.8.6.- Otros marcadores moleculares.....	31
1.9.- Aplicación de los marcadores moleculares en la mejora genética.....	32
2.- OBJETIVOS GENERALES.....	37

3.-MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....	41
3.1.- Extracción del ADN genómico.....	43
3.2.- RFLPs.....	43
3.2.1.- Digestión del ADN y transferencia a membrana.	44
3.2.2.- Clonación y marcaje de sondas.	46
3.2.3.- Hibridación y detección.	47
3.3.- RAPDs.....	48
3.4.- AFLPs.....	52
4.- COMPARACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES PARA SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS GENÉTICOS EN ALBARICOQUERO.....	57
4.1.-INTRODUCCIÓN.....	59
4.2.- OBJETIVOS.....	60
4.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
4.4.- RESULTADOS.....	63
4.4.1.- Índices estimadores de las distancias genéticas.	63
4.4.2.- RFLPs	65
4.4.2.1.- Polimorfismo.	65
4.4.2.2.- Agrupación de variedades.	66
4.4.3.- RAPDs	67
4.4.3.1.- Polimorfismo.	67
4.4.3.2.- Agrupación de variedades.	68
4.4.4.- AFLPs.	69
4.4.4.1.- Polimorfismo.	69
4.4.4.2.- Agrupación de variedades.	70
4.4.5.- Isoenzimas	72

4.5.- DISCUSIÓN.....	79
4.5.1.- Identificación de variedades	79
4.5.2.- Diversidad genética entre variedades de albaricoquero.	80
4.5.3.- Elaboración de mapas genómicos.	82
4.6.- CONCLUSIONES.	84
5.- MAPAS GENÓMICOS DE DOS VARIEDADES DE ALBARICOQUERO BASADOS EN MARCADORES MOLECULARES TIPO RAPD Y AFLP.	87
5.1.- INTRODUCCIÓN.....	89
5.2.- OBJETIVOS.....	91
5.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
5.3.1.- Población segregante.	91
5.3.2.- Obtención de los marcadores	92
5.3.2.1- RAPDs.	92
5.3.2.2- AFLPs	93
5.3.3.- Análisis de los datos.	93
5.3.4.- Obtención del carácter resistencia a Sharka.	94
5.3.5.- Elaboración del mapa.	95
5.4.- RESULTADOS.	96
5.4.1.- Polimorfismo.	96
5.4.1.1.- RAPDs	96
5.4.1.2.- AFLPs	98
5.4.2.- Elaboración del mapa.	102
5.4.3.- Comparación entre mapas.	102
5.4.4.- Longitud y densidad del mapa.	103
5.4.5.- Herencia del carácter resistencia a Sharka.	104
5.5.- DISCUSIÓN.....	110

5.5.1.- Polimorfismo.	110
5.5.1.1.- RAPDs	110
5.5.1.2.- AFLPs	110
5.5.2.- Heterocigosidad.	111
5.5.3.- Marcadores con segregación distorsionada.	112
5.5.4.- Grupos de ligamiento.	113
5.5.5.- Comparación entre mapas.	114
5.5.6.- Herencia del carácter resistencia a Sharka y su posición en el mapa	114
5.6.- CONCLUSIONES	117
6.- BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A LA ANDROESTERILIDAD Y LA AUTOINCOMPATIBILIDAD EN ALBARICOQUERO.	119
6.1.- INTRODUCCIÓN.	121
6.2.- OBJETIVOS	124
6.3.- MATERIALES Y MÉTODOS	124
6.3.1.- Material vegetal.	124
6.3.2.- Determinación de la Androesterilidad.	124
6.3.3.- Determinación de la Autocompatibilidad.	125
6.3.4.- BSA (Bulk Segregant Analysis)	125
6.3.5.- Análisis por selección directa de cebadores.	126
6.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	127
6.4.1.- BSA (Bulk Segregant Analysis).	127
6.4.2.- Análisis por selección directa de cebadores	131
6.4.2.1.- Androesterilidad.	131
6.4.2.2.- Autocompatibilidad.	132
6.5.- CONCLUSIONES.	136
7.- CONCLUSIONES GENERALES	137

ANEJOS	141
ANEJO I: Tampones y Medios	143
ANEJO II: Variedades de albaricoquero.....	149
ANEJO III: Poblaciones segregantes.....	157
ANEJO IV: Conceptos básicos mapas genómicos.....	161
ANEJO V: Marcadores obtenidos para la elaboración de los mapas	165
ANEJO VI: Síntomas y determinación de la resistencia a Sharka.....	173
BIBLIOGRAFÍA	181

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.1.- Principales países productores de albaricoque.	8
Tabla 1.2.- Superficie cultivada y producción de albaricoque en España.	8
Tabla 3.1.- Marcaje de las sondas utilizadas en RFLP	47
Tabla 3.2.- Reacción de amplificación de los marcadores tipo RAPD.....	49
Tabla 3.3.- Componentes de la digestión del ADN en la técnica de los AFLPs.	52
Tabla 3.4.- Componentes de la ligación en AFLPs.	53
Tabla 3.5.- Componentes de la reacción de preamplificación en AFLP.	54
Tabla 3.6.- Marcaje radiactivo del cebador EcoRI	54
Tabla 3.7.- Reacción de amplificación selectiva en AFLP.....	55
Tabla 4.1.- Variedades presentes en el estudio, su origen y resistencia o susceptibilidad al virus de la Sharka-	61
Tabla 4.2.- Combinaciones de sondas y enzimas de RFLPs utilizadas en las 16 variedades de albaricoquero.	66
Tabla 4.3.- Matriz de similaridad entre cultivares usando marcadores RFLPs.	67
Tabla 4.4.- Matriz de similaridad entre cultivares usando marcadores RAPDs.....	69
Tabla 4.5.- Marcadores AFLPs obtenidos en el estudio de diversidad de albaricoquero, que distinguen las variedades Goldrich y Valenciano.....	70
Tabla 4.6.- Matriz de similaridad entre cultivares usando marcadores AFLPs.....	71
Tabla 4.7.- Matriz de similaridad entre cultivares usando isoenzimas	72
Tabla 4.8.- Correlaciones obtenidas a partir de las distancias genéticas entre variedades utilizando diferentes sistemas de marcadores.....	73
Tabla 4.9.- Variabilidad genética obtenida con los sistemas de marcadores RFLP, RAPD y AFLP en albaricoquero.....	73
Tabla 4.10.- Comparación entre matrices de similaridad obtenidas a partir de subgrupos de marcadores procedentes de las diferentes combinaciones cebador/enzima	74
Tabla 4.11.- Marcadores que definen variedades resistentes a Sharka.	74
Tabla 5.1.- Marcadores que definen las variedades resistentes a Sharka.	95
Tabla 5.2.- Tipos de segregación obtenidos con los marcadores RAPD y AFLP	99

Tabla 5.3.- Variabilidad genética del albaricoquero obtenida con marcadores RAPD y AFLP	99
Tabla 5.4.- Número de fragmentos polimórficos obtenidos con los marcadores AFLPs de acuerdo a la combinación cebador/enzima usada.....	100
Tabla 5.5.- Valores de segregación de los marcadores más probablemente asociados al carácter resistencia a Sharka en la primera aproximación a la herencia del carácter	104
Tabla 5.6.- Hipótesis de herencia de la resistencia a Sharka	116
Tabla 6.1.- Marcadores obtenidos con BSA (Bulk Segregant Analysis).....	130
Tabla 6.2.- Marcadores ligados al carácter androesterilidad	131
Tabla 6.3.- Individuos de la población cuyos genotipos para autocompatibilidad se encuentran determinados.	133
Tabla III.1.- Poblacion segregante procedente del cruce Goldrich x Valenciano...	159
Tabla III.2.- Población segregante procedente del cruce Gitano x Pepito del Rubio	159
Tabla V.1.- Marcadores que forman parte del mapa Goldrich y sus tipos de segregación	169
Tabla V.2.- Marcadores que forman parte del mapa Valenciano y sus tipos e segregación.....	170
Tabla V.3.- Total de marcadores RAPDs y AFLPs obtenidos para la elaboración de los mapas	171

FIGURAS

FIGURA 1.1.- Principales países productores de albaricoque.	7
FIGURA 1.2.- Comparación de frutos de la variedad Rojo de Carlet afectados por Sharka y libres de virus.	17
FIGURA 1.3.- Síntomas de Sharka en frutos de la variedad Ginesta.....	17
FIGURA 3.1.- Digestión del ADN de las 16 variedades empleadas en el estudio con el enzima EcoRI.	45
FIGURA 3.2.- Esquema de la reacción en cadena de la Taq polimerasa.	51
FIGURA 4.1.- Comparación entre los coeficientes de Nei y Jaccard.	64

FIGURA 4.2.- Dendrograma obtenido con marcadores RFLPs	75
FIGURA 4.3.- Dendrograma obtenido con maracadores RAPDs	75
FIGURA 4.4.- Dendrograma obtenido con marcadores AFLPs.....	76
FIGURA 4.5.- Dendrograma obtenido con isoenzimas.....	76
FIGURA 4.6.- Análisis RFLP de 4 de las 16 variedades de albaricoquero presentes en el estudio.....	77
FIGURA 4.7.- Análisis RAPD de las 16 variedades de albaricoquero incluidas en el estudio.....	77
FIGURA 4.8.- Análisis AFLP de las 16 variedades de albaricoquero incluidas en el estudio.....	78
FIGURA 4.9.- Representación de las distancias genéticas obtenidas comparando los resultados de RAPD y AFLP.....	78
FIGURA 5.1.- Parental femenino: Goldrich	92
FIGURA 5.2.- Parental masculino: Valenciano	92
FIGURA 5.3.- Amplificación RAPD del cebador B-8.....	97
FIGURA 5.4.- Amplificación RAPD del cebador C-16.....	98
FIGURA 5.5.- Amplificación AFLP combinación cebador/enzima AA/CTT	101
FIGURA 5.6.- Amplificación AFLP combinación cebador/enzima AA/CCA	101
FIGURA 5.7.- Mapa genómico del parental femenino Goldrich	106
FIGURA 5.8.- Mapa genómico del parental masculino Valenciano	107
FIGURA 5.9.- Comparación de ambos mapas con el establecimiento de homologías por medio de los marcadores de segregación 3:1	108
FIGURA 5.10.- Posición del carácter Sharka en el mapa de Goldrich.....	109
FIGURA 6.1.- Amplificación RAPD correspondiente al cebador M-4, que da lugar a un marcador de androfertilidad.....	132
FIGURA 6.2.- Amplificación RAPD correspondiente al cebador P-10, que da lugar a un marcador de autocompatibilidad.....	134

FOTOS

Anejo II :Variedades	149
SEO	151
HENDERSON	151
HARCOT	151
HARGRAND	151
GOLDRICH	152
GINESTA	152
VALENCIANO	152
TADEO	153
CANINO	153
NAVARROS	153
CORBATÓ	153
VELAZQUEZ T.	154
BÚLIDA	154
MONIQUÍ	154
ROUGE DE SERNHAC	155
ROYAL	155
Anejo VI: Síntomas de Sharka y determinación de la resistencia	173
Síntomas sobre ciruelo japonés: Hojas y fruto	175
Síntomas sobre ciruelo europeo: Hojas y fruto.....	176
Síntomas sobre melocotonero: Fruto y Hojas.....	177
Síntomas sobre albaricoquero: Hojas y fruto.....	178
Foto VI.1.- Vista general invernadero. Plantas GF-305.....	179
Foto VI.2.- Injerto en chapa del híbrido Goldrich x Valenciano sobre melocotonero GF-305.....	179
Foto VI.3.- Híbrido Goldrich x Valenciano mostrando síntomas de Sharka en el patrón y en la variedad.....	180
Foto VI.4.- Híbrido Goldrich x Valenciano mostrando síntomas de Sharka	180

1.- INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

1.1.-El albaricoquero: *Prunus armeniaca*

El albaricoquero, *Prunus armeniaca* L., pertenece al género *Prunus*. Este género incluye alrededor de 150 especies de árboles y arbustos de hoja caduca o perenne, de acuerdo con sus adaptaciones climáticas. La mayoría se encuentran en las zonas templadas de Norte América, Este de Asia y Europa. Unas pocas de ellas se localizan en zonas montañosas tropicales situadas al Norte del Ecuador. Las especies de *Prunus* colonizan generalmente lugares abiertos y alterados, de modo que se puede decir que están preadaptadas al cultivo. Proliferan en hábitats dispersos. Los frutos de las especies silvestres, de menor tamaño que los de las especies cultivadas, son igualmente atractivos para el hombre (Sauer 1993).

1.2.-Descripción taxonómica y botánica de la especie.

El albaricoquero pertenece a la familia de las Rosáceas, subfamilia Prunoidea, género *Prunus* L., y subgénero *Prunophora*. La mayoría de los albaricoques cultivados pertenecen a la especie *Prunus armeniaca* L. (*Armeniaca vulgaris* Lam.). Otras especies relacionadas son *P. brigantiaca* Vill., el albaricoquero de Briançon, de los Alpes franceses; *P. ansu* Komar; *P. mume* Sieb. y Zucc., el albaricoquero japonés; *P. sibirica* L.; *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne; y *P. dasycarpa* Ehrh., el albaricoquero negro. Estas últimas especies se han producido a partir de híbridos naturales entre *P. armeniaca* y *P. cerasifera* Ehrh. (Kostina y Riabov, 1959).

El albaricoquero es una planta diploide ($2n = 16$), de flores solitarias, blancas o rosadas. El árbol de porte globoso, raíz pivotante, tronco erguido, corteza parda y hojas brillantes alternas, puede alcanzar entre 3 y 7 metros de altura. El fruto es redondo, de 3 cm o más de diámetro, de color amarillento, casi glabro. El hueso es liso, presentando una costilla gruesa asurcada.

1.3.-Origen y distribución del cultivo

Vavilov (1951) incluye los albaricoqueros cultivados en tres de sus centros de origen. En estos centros, las regiones importantes para el albaricoquero son:

- 1) El centro Chino, que comprende las regiones montañosas del noreste, centro y oeste de China llegando hasta la provincia de Kansu y el noreste del Tíbet.

- 2) El centro de Asia Central, que comprende el área montañosa que se extiende desde el sur de Tien-Shan, incluyendo Hindu Kush, hasta Kashmir.

- 3) El centro del Próximo Oriente, que comprende la zona montañosa que se extiende desde el noreste de Irán hasta el Cáucaso y el centro de Turquía. Vavilov indica que el centro del Próximo Oriente es un centro secundario para el albaricoque.

Los albaricoqueros se extendieron desde Asia Central a la región Transcaucásica a través de Irán. Desde aquí se extendieron al Oeste (Blaha y col., 1966; Goor y Nurock, 1968). Esta difusión debió ocurrir como parte de los intercambios militares, económicos y culturales que siguieron a las penetraciones de Alejandro de Macedonia dentro del Turquistán, llegando hasta el Valle de Fergara durante el IV siglo a.C. La posterior difusión del albaricoque hacia el oeste parece que tuvo lugar en dos etapas. Los albaricoqueros fueron conocidos en Grecia e Italia como consecuencia de la guerra entre los romanos y los persas durante el primer siglo a.C. El nombre específico o genérico de Armeniaca sugiere que el albaricoquero fue por primera vez distribuido en Italia y Grecia por comerciantes armenios. Los romanos llevaron a cabo la expansión del cultivo por los países mediterráneos.

Todo parece indicar que el albaricoquero llegó a España por dos caminos distintos: por el norte del Mediterráneo, a través de los romanos, en los primeros siglos después de Cristo, y por el sur del Mediterráneo, a través de los árabes, hacia el siglo

VII. Sólo así se explica, según Crossa Raynaud (1961), la diversidad de caracteres morfológicos (porte, ramificación, tamaño del fruto) y fisiológicos (necesidades de frío, época de maduración, grado de autocompatibilidad) que se encuentra en las poblaciones autóctonas, especialmente las de Murcia. Los archivos históricos demuestran que el albaricoquero era el árbol frutal más extendido durante el siglo XIV en las huertas establecidas por los árabes en las riberas del Segura y que, en esa época, todavía se distinguían dos tipos de frutos en los mercados: “los albercoques de Damasco” y “los otros albercoques” (Torres Fontes, 1970-71, citado por Egea y col., 1987). La multiplicación por semilla dio origen a multitud de tipos diferentes. Martínez-Cutillas y Gómez (1983) citan 76 denominaciones varietales recogidas en una prospección realizada en Murcia, a pesar de que la generalización, a principios del siglo XX, de la multiplicación por injerto puso un límite a la aparición de nuevas variedades.

1.4.-Importancia económica del cultivo

La producción mundial de albaricoques osciló en los últimos años en torno a los 2 millones de Tm, de las cuales el 55% corresponde a los países mediterráneos. Turquía, España, Italia y Francia ocupan los primeros lugares en este área (Egea y col., 1994). Turquía es el primer país productor, con el 10.5 % del total de la producción mundial, seguido de Irán y Paquistán. Actualmente España ocupa el quinto lugar en cuanto a producción mundial y el segundo a nivel europeo (FAO, 1997) (**Tabla 1.1**).

La superficie cultivada en plantación regular en España se encuentra estabilizada en unas 25.000 Ha, de las cuales un 75 % se encuentran en regadío. Por Comunidades Autónomas, Murcia ocupa el primer lugar con 12.089 Ha, casi el 50% del total, con una producción de 79.532 Tm en 1995, seguida de la Comunidad Valenciana con 7.771 Ha. y una producción de 40.146 Tm. Castilla - La Mancha es la tercera en importancia, con una superficie dedicada al cultivo de 2.342 Ha., casi todas ellas en la provincia de Albacete y una producción de 5.759 Tm. Entre las 3 Comunidades citadas representan más del 90% de la superficie cultivada de albaricoquero en España (**Tabla 1.2**) (MAPA, 1995). La producción total se sitúa entorno a las 138.733 Tm.

De un 10 a un 20% de la producción se destina a la exportación como fruto fresco, lo que convierte a España en el primer país exportador europeo. La mayor parte de la producción española coincide con la de Italia, Francia y Grecia y se concentra en la primera quincena de junio, por lo que tiene lugar una saturación del mercado. La industria de transformación emplea un 30% de la producción, lo que permite diversificar los usos e introduce flexibilidad en el mercado. El resto (50-60%) se destina a consumo interno (Egea y col., 1994).

El albaricoquero, salvo concentraciones temporales de la oferta entre el 1 y el 20 de Junio, es todavía una especie no excedentaria en Europa, por lo que admitiría producciones bastante superiores a las actuales si se extendiera el calendario de producción antes y después del período citado. Existen, sin embargo, algunos factores limitantes del cultivo, de los cuales el más importante en muchas de las zonas productoras de Murcia y Valencia es el virus de la sharka.

Al contrario que en Murcia, donde prácticamente toda la superficie cultivada de albaricoquero está en regadío, en la Comunidad Valenciana el 45 % de la producción está en secano. De las 3 principales comarcas productoras, La Ribera Alta, La Vall d'Albaida y El Camp del Túria-Serranos, todas en la provincia de Valencia, el secano predominaba hasta hace poco en las dos últimas, aunque la tendencia actual es a ir sustituyéndolo por el riego por goteo, debido a la alta incidencia del gusano cabezudo en las plantaciones de secano. En todas las zonas en donde el cultivo del albaricoquero coincide con ciruelos japoneses, especialmente en La Ribera Alta y parte de La Vall d'Albaida, la superficie cultivada se halla en regresión, debido a la gran difusión del virus de la sharka que causa pérdidas de cosecha muy importantes (Llácer, 1995).

La producción en cada comarca está basada en unas pocas variedades. En La Ribera Alta, el 70 % de la producción se basa en variedades precoces del tipo Ginesta, Palau, Palabras, etc; el 30 % restante corresponde a Corbató y Canino principalmente. La Vall d'Albaida es la comarca que cuenta con una mayor diversificación varietal: las

variedades precoces representan el 25 %, las variedades de media estación, como Mitger, Rojo de Carlet y Canino, representan el 60 % y el 15 % restante se debe a la variedad tardía Tadeo. Por el contrario, en Camp del Túria-Serranos el 90 % de la producción se basa en la variedad Canino.

La producción valenciana de albaricoquero se destina aproximadamente mitad y mitad al mercado en fresco y a la industria. De la producción para consumo en fresco se exporta entre un 10 y un 20 %, principalmente a los países de la Unión Europea. El cultivo de las variedades precoces que maduran en Mayo tiene mucho interés, ya que en ese momento todavía hay poca fruta en los mercados europeos. Las variedades precoces valencianas están muy bien adaptadas a nuestras condiciones de cultivo, tienen buen sabor y son autofértiles. Podrían servir de base, por tanto, para cambiar la gama varietal y evitar la concentración de la oferta. Sin embargo, para ello necesitan ser mejoradas mediante un programa de cruzamientos bien dirigido, con el fin de eliminar sus defectos: mediana productividad, calibres pequeños y elevada sensibilidad al virus de la sharka (Badenes y col., 1997).



FIGURA 1.1.- Principales países productores de albaricoque. En la cuenca mediterránea se concentra la mayor parte de la producción mundial de este frutal.

Tabla 1.1.- Principales países productores de albaricoque (miles de toneladas).

PAÍSES	1989-1991	1995	1996	1997
Europa	772	636	939	771
Francia	113	101	176	151
España	165	139	195	128
Ucrania	-	97	124	124
Italia	174	105	137	106
Fed. Rusa	-	40	65	65
Grecia	94	44	48	30
Asia	-	1019	1047	992
Turquía	364	281	241	241
Irán	88	193	215	198
Pakistán	89	191	188	190
China	81	43	43	43
América	105	60	77	131
USA	102	55	72	125
Mundo	2229	2094	2462	2295

(Fuente: Anuario FAO, 1997).

Tabla 1.2.- Superficie cultivada y producción de albaricoque en España (MAPA, 1995)

COMUNIDAD AUTÓNOMA	SUPERFICIE	PRODUCCIÓN
Murcia	12.089	79.532
Valencia	7.771	40.146
Castilla - La Mancha	2.342	5.756
Baleares	769	3.820
Aragón	704	2.425
Cataluña	333	2.422
Resto	484	4.632
Total España	24.492	138.733

1.5.- Diversificación varietal.

Kostina (1969), tras extensos estudios de las colecciones reunidas en la URSS entre 1928 y 1938, incluyendo 7 especies y más de 600 formas y cultivares, estableció 4 grandes grupos ecogeográficos y 13 subgrupos regionales dentro de la especie *P. armeniaca*:

1) Asia Central: El grupo de Asia Central es el más antiguo y el más rico en diversidad de formas. Incluye los albaricoqueros de Asia Central, Sinkiang (China), Afganistán, Baluchistán, Pakistán y del norte de la India. Sus árboles son vigorosos y de gran longevidad, formando coronas densas y de ramas cortas. Tienen un largo período de latencia y resisten las fluctuaciones de temperaturas a finales del invierno. Son de floración tardía y necesitan una alta acumulación de calor durante la primavera para la brotación.

Los árboles son comparativamente muy resistentes a la sequedad ambiental pero son sensibles a la falta de humedad del suelo. La mayoría son autoincompatibles. Los frutos tienen un alto contenido en azúcar, son de tamaño mediano o pequeño y tienen almendra dulce. Se consumen en fresco o secos. Normalmente, para su consumo como frutos secos, se dejan secar en el árbol. Los cultivares maduran desde mayo a septiembre. La susceptibilidad de los árboles a hongos, especialmente a *Sclerotinia* sp. y *Coryneum beijerinckii* Oud., limita su plantación en regiones más húmedas.

2) Irano-Caucásica: Incluye las selecciones locales de Armenia, Georgia, Azerbaijan, Dagestán, Irán, Siria, Turquía, Norte de África y en parte, España e Italia. Los árboles no son tan vigorosos ni longevos como los del grupo de Asia Central. Tienen ramas y brotes gruesos, y hojas grandes y brillantes. Son menos resistentes a inviernos severos y tienen una brotación más temprana cuando llega la primavera. Necesitan un menor número de horas frío. La mayoría de los cultivares son autoincompatibles. Los frutos son grandes y no tan variables como los del grupo anterior. Tienen almendra dulce. Los tipos de fruto más grande se usan para su consumo en fresco o en conserva, mientras

que los tipos de fruto pequeño con alto contenido en azúcar se usan para su secado. La pulpa es generalmente blanca o de color claro.

3) Dzhungar-Zailij: Es el más primitivo. Incluye las selecciones de Pafilov (Dzharskent), Taldy-Kurgan, y las regiones de Alma Alta en Kazakhstan, así como también la región Ining (Kuldja) de Sinkiang. Estos albaricoqueros son capaces de resistir inviernos muy extremos (las temperaturas pueden alcanzar los -30°C). En su mayoría tienen frutos pequeños. Los tipos pertenecientes a este grupos son intermedios entre los cultivares del grupo de Asia Central y los del subgrupo Ucraniano del Grupo Europeo.

4) Europa: Es el más joven en cuanto a origen y también el que presenta una menor variabilidad. Se ha originado a partir de unas pocas formas que fueron traídas a Europa desde Armenia, Irán y los países árabes durante los últimos 2000 años. Los cultivares comerciales de Norte América, Sudáfrica, y Australia también pertenecen al Grupo Europeo. Los árboles de este grupo son más precoces que los pertenecientes a los dos grupos anteriores. No son tan vigorosos, tienen un corto período de latencia e inician pronto la brotación. Aunque necesitan un menor número de horas frío, algunos cultivares, especialmente los del subgrupo del Norte de Europa, pueden resistir fríos mucho más intensos durante el período de latencia que los árboles de los grupos anteriores. Los tipos pertenecientes a este grupo son en su mayoría autocompatibles. Todos los frutos maduran en un mes, y la pulpa es amarilla o naranja, con un menor contenido en azúcar y acidez mayor que los cultivares de los grupos de Asia Central e Irano-Caucásico. Tienen un aroma característico. La pulpa es más firme y seca que la de los dos grupos anteriores. La mayoría tienen almendra amarga. Por lo general, los árboles del Grupo Europeo presentan una mayor resistencia a hongos.

Las especies domesticadas se vieron influenciadas por los métodos de cultivo utilizados por las diferentes civilizaciones y debieron adaptarse a muy distintos medios ecológicos. Las barreras geográficas naturales aislaron variantes genéticas que evolucionaron libre e independientemente originando poblaciones aún más diferentes, capaces de tolerar condiciones extremas de frío, sequía, plagas y enfermedades (Esquinas,

1983). Posteriormente, la diversidad genética se transformó a nivel específico e intraespecífico, de forma que si bien la variabilidad de las especies utilizadas por las poblaciones preagrícolas se vio reducida como consecuencia del proceso de domesticación, la variabilidad o diversidad intraespecífica se vio aumentada como consecuencia de la expansión de los cultivos por todo el mundo (Veyrat, 1983).

Este proceso también afectó a la especie *Prunus armenica* L., que partiendo de su origen asiático, por medio de una enorme diversificación varietal, consiguió colonizar todos los continentes y adaptarse a numerosas condiciones ecológicas. Las poblaciones de semilla de albaricoquero, introducidas históricamente, se localizaron en zonas geográficas concretas. Por medio de la autofecundación, bastante generalizada en la especie, y la selección de los agricultores, sufrieron procesos de adaptación local y fueron definitivamente fijadas al introducirse la técnica del injerto, que fue una práctica generalizada durante todo el siglo XX. Estas circunstancias llevaron a la concentración del cultivo en determinadas áreas, donde se desarrollaron cultivares muy adaptados, dando un gran número de variedades de carácter local, que limitaron el cultivo a condiciones ecológicas muy restringidas, sobre todo en lo referente a cambios en el medio debidos al clima, el suelo y las enfermedades (Egea y col. 1988). A pesar del elevado número de variedades existente, el 80% de la producción mundial se basa en menos de 30 (Audergon, 1995).

Pese a que el albaricoquero cuenta con una amplia gama de variedades muy adaptadas a su zona de origen, en España la producción en cada zona está basada en pocas variedades. Las más extendidas son Búlida, Canino, Moniquí, Real Fino, Paviot y Ginesta (Egea y col. 1994). La más cultivadas por Comunidades son Búlida, Pepito del Rubio, Mauricio, Moniquí, Currot y Real Fino en Murcia; Canino, Palau, Currot, Ginesta y Galta Roja en Valencia, y Paviot y Moniquí en Aragón. (Escudero y Rodriguez 1990).

Recientemente han sido introducidas variedades extranjeras resistentes al virus de la Sharka. Entre las más importantes se encuentran Goldrich y Harcot. (Egea y col. 1994, 1997).

En la adaptación al medio también juega un papel fundamental la elección del patrón. Los patrones más empleados en España son los francos procedentes de semillas de las variedades Real Fino y Canino. El ciruelo "pollizo" (*P. insititia*) es utilizado frecuentemente en Murcia. También son utilizados el ciruelo Mirobolano (*P. cerasifera*) y Mariana (híbrido *P. cerasifera* x *P. salicina*) (Felipe, 1989).

1.6.- El virus de la Sharka (“Plum Pox virus” o PPV).

1.6.1.-Referencia histórica y distribución geográfica.

La Sharka se describió por primera vez hacia 1915 en Bulgaria ("sharka" significa "viruela" en búlgaro), en ciruelos europeos, y no fue hasta 1933 que se describió en albaricoqueros. Desde entonces, la enfermedad se extendió progresivamente desde los Balcanes hacia Centroeuropa y desde allí en todas direcciones, hasta alcanzar a la mayor parte del continente europeo y varios países mediterráneos no europeos, como Turquía, Egipto y Siria. En 1992, tuvo lugar la primera detección de la Sharka en el continente americano, concretamente en Chile (Roy y Smith, 1994; Németh,1994).

La primera detección del virus de la Sharka en España tuvo lugar en Junio de 1984 en ciruelos japoneses (*Prunus salicina* Lindl.), cv. Red Beaut, cultivados en Sevilla y que mostraban síntomas típicos de la enfermedad. A continuación, PPV fue detectado en otros ciruelos japoneses cv. Red Beaut de Sevilla, Murcia, Valencia y Castellón, en albaricoqueros cv. Canino de Castellón y en melocotoneros cv. Rojo del Rito de Lérida. Era también la primera vez que el ciruelo japonés era citado como huésped natural del virus de la sharka (Llácer y col., 1985 a y b; Llácer y Cambra, 1986). Al investigar el origen de los árboles infectados, se descubrió que los árboles madre de Red Beaut y de Canino procedían del mismo vivero y estaban infectados. Probablemente, PPV llegó a este vivero a través de materiales introducidos desde Francia. El albaricoquero Canino procedente del mismo vivero español fue el primer origen conocido de la sharka en Portugal (Louro y Corvo, 1986).

Desde 1987, se empezó a observar en Valencia y en Murcia una rápida difusión del PPV desde ciruelos japoneses a albaricoqueros y entre albaricoqueros. La difusión a melocotoneros fue mucho más lenta (Llácer, 1987). En consecuencia, se iniciaron estudios sobre detección y caracterización del virus, su distribución e importancia en las plantaciones comerciales de las distintas regiones, la sensibilidad varietal y las medidas de control.

1.6.2.-Importancia económica.

La sharka es la enfermedad más grave de los frutales de hueso en Europa y ello es debido a las causas siguientes:

- Produce síntomas muy graves sobre los frutos que a menudo impiden su comercialización.
- Afecta a un gran número de variedades, especialmente en las especies ciruelo europeo y albaricoquero.
- Plantea importantes problemas de detección precoz, antes de la aparición de síntomas, debido a la baja concentración del patógeno y a su errática distribución en los árboles.
- Se transmite activamente por pulgones de unos árboles a otros de forma no persistente.

Ninguna otra enfermedad de frutales reúne tantas características negativas. A grandes rasgos, Europa puede ser dividida en tres zonas en lo que se refiere a su difusión y niveles de infección (Roy y Smith, 1994):

- Los países de la zona central y oriental, en los cuales la sharka se difundió en los primeros años y los niveles de infección son generalmente altos.
- Los países de la zona norte y occidental, en los cuales los niveles de infección son muy heterogéneos, desde muy altos, como en Alemania, hasta nulos, como en Holanda, donde han logrado erradicar la enfermedad.

- Los países mediterráneos, donde la difusión de la enfermedad es relativamente reciente y todavía están expuestos a una extensión mayor que la actual.

El virus de la sharka ha sido detectado en todas las regiones españolas donde hay un cultivo de cierta importancia de frutales de hueso, aunque la incidencia de la enfermedad es muy variable de unas regiones a otras. Las regiones donde la sharka tiene una mayor importancia económica son aquellas donde coexiste el cultivo del albaricoquero con el del ciruelo japonés, como son Murcia y sobre todo la Comunidad Valenciana (CV). Ya se ha dicho que entre estas dos Comunidades Autónomas cultivan más del 80 % de la superficie dedicada en España al albaricoquero y producen casi el 90 % del total. Además, entre Murcia y la CV producen el 55 % de las ciruelas españolas. En estas regiones, se ha comprobado una difusión a gran escala del PPV desde las plantaciones de ciruelo japonés a las de albaricoquero (Avinent y col., 1993 a), con la siguiente particularidad: mientras que en ciruelo japonés, el número de frutos deformados, que no se pueden comercializar, es muy pequeño, la mayoría de los frutos de albaricoquero están muy afectados. La consecuencia lógica es que los propietarios de ciruelos japoneses no tienen interés en arrancar sus árboles, aunque estén infectados, y estos árboles son los que constituyen un foco permanente de infección para los albaricoqueros. Tanto es así que, dentro de estas dos regiones, las áreas donde se cultivan albaricoqueros pero no ciruelos japoneses (las zonas del interior, donde la climatología ya no es apropiada para estos últimos), la incidencia de la enfermedad es mucho más baja. En las regiones donde el cultivo de albaricoqueros tiene poca importancia relativa (Aragón, Baleares, Cataluña, Andalucía, Extremadura, etc), la incidencia económica de la Sharka es baja, ya que, si hay ciruelos japoneses, éstos pueden mostrar síntomas en hojas pero pocos o ningún daño en frutos. La difusión a melocotonero es muy lenta, o nula, y la expresión de síntomas en esta especie es muy ligera. El cultivo de ciruelo europeo tiene poca importancia en España y, en todo caso, no coexiste con ciruelos japoneses. PPV nunca ha sido detectado en plantaciones comerciales españolas de almendro o cerezo.

1.6.3.-Agente causal

El agente patógeno de la sharka es un potyvirus, conocido en inglés como "plum pox virus" o PPV. Se trata de un virus de partículas filamentosas, de 680 a 900 nm de longitud y 15 nm de anchura, y cuyo genoma consiste en una única molécula de ARN de cadena simple, compuesta por unos 9.800 nucleótidos, con un peso molecular de $3,5 \times 10^6$ daltons, simetría helicoidal y polaridad positiva, con una proteína VPg en su extremo 5' y una cadena de poli(A) de longitud variable en el extremo 3'. Varios autores han determinado la secuencia completa de nucleótidos de diferentes aislados del PPV, que es uno de los virus vegetales más conocidos desde el punto de vista molecular (Lain y col., 1989; Maiss y col., 1989; Teycheney y col., 1989; Riechman y col., 1992; García y col., 1994; Rosales y col., 1998; Candresse y col., 1998).

1.6.4.-Huéspedes

Los principales huéspedes leñosos del PPV son los frutales del género *Prunus*, incluyendo los ciruelos europeo (*P. domestica*) y japonés (*P. salicina*), el albaricoquero (*P. armeniaca*) y el melocotonero (*P. persica*). Los almendros (*P. dulcis*) pueden ser portadores asintomáticos. Los cerezos (*P. avium* y *P. cerasus*) se tenían por inmunes hasta que recientemente se han descrito nuevos aislados de PPV (PPV-C) capaces de infectar al cerezo ácido (Kalashyan y col., 1994) y al cerezo dulce (Crescenzi y col., 1997). PPV puede infectar a la mayor parte de especies silvestres de *Prunus*, algunas utilizadas como patrones u ornamentales: *P. cerasifera*, *P. insititia*, *P. besseyi*, *P. tomentosa*, *P. spinosa*. Numerosas plantas anuales cultivadas o espontáneas pueden ser infectadas artificialmente por transmisión mecánica y podrían actuar como fuente de inóculo en el campo, pero nunca se ha demostrado una transmisión natural entre huéspedes herbáceos y especies de *Prunus* (OEPP/EPPO, 1974; CABI/EPPO, 1992).

1.6.5.-Síntomas

Los síntomas que produce PPV sobre los frutales de hueso aparecen especialmente sobre hojas y frutos y su importancia varía según la especie frutal, la variedad, el aislado o cepa del virus y las condiciones climatológicas. Todos los aislados estudiados en Europa hasta la aparición de PPV-C podían agruparse en dos tipos: el tipo D, de Dideron, un aislado procedente de albaricoquero en el sudeste de Francia, y el tipo M, de Marcus, un aislado procedente de melocotonero en el norte de Grecia. Los aislados del tipo D producen fuertes síntomas en la mayor parte de variedades de albaricoquero y en muchos cultivares de ciruelo europeo (*P. domestica*). Las hojas en primavera muestran manchas, bandas y anillos cloróticos, a veces necróticos. Los frutos cerca de la maduración presentan también manchas y anillos cloróticos y aparecen deformados. La pulpa muestra pardeamiento y los huesos manchas y anillos de color claro, especialmente en albaricoquero. Muchos frutos de ciruelo europeo caen prematuramente. Muchos ciruelos japoneses (*P. salicina*) muestran síntomas en hojas pero pocos o ningún síntoma en los frutos. Los aislados del tipo D afectan muy poco al melocotonero: manchas poco aparentes en los frutos, que no sufren deformación, y ausencia casi total de síntomas en hojas de árboles adultos. Además, la difusión natural en esta especie es escasa o nula. Los aislados del tipo M están menos extendidos por el momento, pero presentes en Grecia, Hungría, la ex-Yugoslavia y recientemente detectados en Francia e Italia. Estos aislados, además de afectar al albaricoquero y al ciruelo europeo, producen también fuertes síntomas en melocotonero, del tipo de los descritos anteriormente, y la difusión natural es más rápida que la de los aislados tipo D. Se ignora por ahora el tipo de síntomas que los aislados tipo M pueden producir en ciruelos japoneses (Cambra y Llácer, 1994).



FIGURA 1.2.- Comparación de frutos de la variedad Rojo de Carlet afectados por la enfermedad (abajo) y libre del virus (arriba).



FIGURA 1.3.- Síntomas de Sharka en frutos de la variedad Ginesta. Como puede observarse el virus causa deformidades en el fruto que lo hacen inviable comercialmente.

1.6.6.-Epidemiología y control de la enfermedad

PPV se trasmite de unos árboles a otros por injerto o por pulgones (áfidos). La no utilización de material vegetal certificado (libre de virus) es la razón principal de la difusión de la enfermedad entre regiones y países. Una vez establecida la sharka en una zona, los pulgones contribuyen de modo muy importante a su difusión en distancias cortas. El modo de transmisión no persistente, poco específico, hace que el número de especies de áfidos capaces de actuar como vectores de PPV sea elevado. Németh (1994) cita a las siguientes especies: *Aphis craccivora*, *Aphis fabae*, *Aphis spiraeicola*, *Brachycaudus cardui*, *Brachycaudus helichrysi*, *Hyalopterus pruni*, *Myzus persicae*, *Myzus varians*, y *Phorodon humuli*. Labonne y col.(1994) añaden los siguientes: *Aphis gossypii*, *Aphis hederarum* y *Rhopalosiphum padi*. El número de especies vectoras crecerá, sin duda, conforme se ensayen más especies, aunque la eficacia de transmisión puede variar y varía, de hecho, entre especies y según la cepa del virus. Ya se ha dicho que los aislados del tipo M se difunden más rápidamente que los del tipo D.

Los pulgones transmisores del PPV son las formas aladas que hacen picaduras

de prueba en hojas o brotes infectados y luego vuelan a otro árbol donde repiten sus picaduras de prueba o se establecen. Después de la inoculación, el período de incubación hasta la aparición de los primeros síntomas puede durar varios meses y la generalización de síntomas en toda la copa del árbol puede tardar años.

La transmisión por semilla del PPV en *Prunus* ha sido descrita en Hungría (Németh, 1994), pero no ha sido confirmada por otros investigadores. Esta transmisión, en caso de existir, podría darse en cepas virulentas del virus.

Como sucede con todos los virus, no hay ningún tratamiento disponible para curar en el campo a los árboles infectados por PPV. La protección cruzada, que se ha logrado con otros virus mediante la inoculación de razas débiles, tampoco se ha mostrado factible en el caso de la sharka. En cuanto a los tratamientos aficidas, para luchar contra la difusión natural del virus, son muy poco eficaces, dado el modo de transmisión no persistente. A corto plazo, el único medio de lucha disponible es el arranque sistemático de todos los árboles enfermos y la utilización de materiales sanos en todas las nuevas plantaciones. Tras la primera detección de la sharka en España, en Junio de 1984, un decreto del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, en enero de 1985, estableció medidas internas de cuarentena para tratar de evitar la difusión de la enfermedad de unas regiones a otras y erradicar los focos infecciosos que pudieran ser detectados en las prospecciones que se realizaran en todas las Comunidades Autónomas implicadas. A tales efectos, los Servicios de Sanidad Vegetal de dichas CC. AA. fueron dotados con los medios necesarios para el diagnóstico del PPV por ELISA. En las regiones más afectadas se establecieron, además, medidas para el arranque subvencionado de los árboles infectados (decretos de las Administraciones Autonómicas de Murcia y Valencia en Julio de 1988 y Marzo de 1991, respectivamente). Como consecuencia de estos decretos, desde 1988 en Murcia y desde 1991 en Valencia se arrancaron cada año los albaricoqueros y ciruelos enfermos, detectados por los propios agricultores o por las campañas llevadas a cabo por los Servicios de Sanidad Vegetal correspondientes. Hasta 1997 inclusive, 97.500 ciruelos y 12.500 albaricoqueros han sido arrancados en 10 años en la Comunidad Autónoma de

Murcia, con un coste en indemnizaciones de 130 millones de pesetas. En la Comunidad Valenciana, los arranques han sido mucho más numerosos, 322.000 ciruelos y 351.000 albaricoqueros en sólo 7 años, con un coste superior a los mil millones de pesetas (Dicenta y col., 1998). Estos costes sólo cubrieron los gastos de arranque, pero no el valor de los árboles ni, por supuesto, las pérdidas de cosecha causadas por la enfermedad.

A largo plazo, la mejor solución es la obtención de variedades resistentes, bien sea mediante programas de mejora genética clásica, por cruzamientos (Audergon y col., 1994; Karayiannis y Mainou, 1994; Polák, 1994), o mediante la producción de plantas transgénicas protegidas contra la infección por ser portadoras y expresar, por ejemplo, el gen que codifica para la proteína de cubierta del virus (Câmara Machado y col., 1994; Escalettes y col., 1994; Ravelonandro y col., 1994 y 1998; Scorza y col., 1994 y 1998).

1.6.7.- Sensibilidad varietal

Todas las variedades autóctonas de albaricoquero que han sido estudiadas en España son sensibles al PPV. Las variedades precoces de Murcia y Valencia, que son las que tienen mayor valor comercial, son las que muestran los síntomas más agudos, seguramente porque maduran en Mayo, antes de que el calor atenúe la expresión de síntomas.

En melocotonero, sólo se han observado síntomas ligeros en las variedades Rojo del Rito, Catherine, Babygold 6 y Flavour Giant (en Cataluña) y Starcrest, Sprincrest, Armking y Sungold (en Valencia). En todos estos casos, la infección se originó probablemente en el vivero.

El ciruelo japonés se reveló en España por primera vez como un huésped natural del PPV (Llácer y Cambra, 1986). La variedad Red Beaut, la primera que se encontró infectada, muestra hojas con anillos y bandas cloróticas, que luego se convierten en

áreas necróticas. Sólo algunos frutos (máximo un 10 %, normalmente menos) presentan anillos, manchas, depresiones o malformaciones cerca de la maduración. Asensio (1996) estudió la sensibilidad de las distintas variedades de una importante colección en la CV. Algunas variedades muestran síntomas similares a los señalados para Red Beaut, pero la mayoría de cultivares presentan síntomas más ligeros, a veces casi inapreciables. En contraste con lo que sucede en el albaricoquero, los síntomas en hojas de ciruelo japonés persisten durante todo el período vegetativo, sin enmascarse por el calor.

1.6.8.- Fuentes de resistencia.

La Sharka ha pasado a ser el primer factor limitante del cultivo del albaricoquero en la Comunidad Valenciana. Como ya se ha dicho anteriormente la mejor solución a largo plazo es la obtención de variedades resistentes mediante programas de mejora genética clásica realizando cruzamientos con variedades que presenten resistencia (Audergon y col., 1994; Karayiannis y Mainou, 1994; Polák, 1994).

Las variedades descritas hasta ahora como resistentes por diferentes autores las podemos clasificar en tres grandes grupos según su origen:

- Variedades procedentes de Norte América (Syrgiannidis, 1980; Dosba y col., 1988; Mehlenbacher y col., 1990; Dosba y col., 1991; Karayiannis y col. 1991): Stark Early Orange, Stella, Goldrich, Henderson, Harcot, Harlayne, Veecot, Sunglo y NJA2.
- Nuevas obtenciones griegas (Sygiannidis y Mainou, 1991): Lito y Pandora.
- Nuevas obtenciones francesas (Audergon y col., 1995c): A2408, A2564 y Avilara.

Las obtenciones griegas no aportan una calidad de fruto suficiente, aunque son autocompatibles. Las selecciones francesas se encuentran en fase de observación.

Las variedades norteamericanas resistentes a PPV presentan la mayoría de las características del grupo de Asia Central. Son generalmente autoincompatibles y tienen grandes necesidades de frío. Presentan por lo general características complementarias a

las variedades autóctonas españolas, lo que las hacen especialmente interesantes para su utilización en programas de mejora genética. Su utilización directa en nuestras condiciones mediterráneas debe ser descartada, ya que presentan un mal comportamiento productivo. Los estudios hechos sobre diversidad en albaricoquero indican que los genes de resistencia a este virus en albaricoquero provienen de una fuente común localizada en materiales procedentes de Asia, que posteriormente fue introducida en Norte América. Posiblemente el origen de la resistencia esté relacionado con la especie afín al albaricoquero *Prunus manschurica*. Dentro de los cultivares pertenecientes al grupo Norteamericano se pueden considerar como donantes de resistencia a Sharka Henderson, Goldrich y Stark Early Orange. El principal problema de estas variedades son sus elevadas necesidades de frío, que hacen difícil su utilización en los cruzamientos (Badenes y col. 1996).

La variedad norteamericana Harcot, que se había considerado durante mucho tiempo como resistente, mostró síntomas en hoja y fruto después de 6 años en condiciones naturales de infección y al primer año de injertarse sobre un árbol muy afectado por sharka (Audergon y col., 1995b).

1.7.- Mejora genética y caracterización varietal.

Recientemente se ha puesto de manifiesto la necesidad del establecimiento de programas de mejora genética encaminados a la mejora de las variedades de albaricoquero en tres aspectos fundamentales: calidad, autocompatibilidad y resistencia al virus de la Sharka. La mayor parte de las variedades cultivadas pertenecen al grupo europeo. Estas variedades reúnen una serie de características muy interesantes desde el punto de vista de la mejora de la especie. Tienen un periodo corto de latencia, los frutos tienen un buen calibre, la semilla es pequeña y tienen un color y aroma característicos. Además la mayoría de estos cultivares son autocompatibles. La alta adaptación al medio y la reducción del cultivo a unas pocas variedades, ha llevado a la reducción de la variabilidad genética de los cultivares españoles. Esto obliga la introducción de nuevos

genes procedentes de otras fuentes para aumentar la variabilidad (De Vicente y col. 1998).

La especie albaricoquero se ha considerado tradicionalmente como una especie autocompatible, sin embargo la progresiva desaparición de polinizadores ha puesto de manifiesto que la incompatibilidad es un carácter más extendido de lo que en principio se creía (Egea y col. 1994). La autoincompatibilidad floral complica las prácticas de cultivo, ya que obliga a la introducción de polinizadores en campo y la producción depende de la cantidad de polen que se ha podido transferir de unos árboles a otros (Frankel y Galun, 1977). Este carácter es especialmente importante para la realización de cruzamientos controlados entre genotipos seleccionados para programas de mejora genética, para lo que es necesario el conocimiento de la biología floral de la especie.

Pero el problema que ha determinado realmente la necesidad de mejorar las variedades de albaricoquero en España ha sido la aparición y extensión del virus de la Sharka. Todas las variedades europeas tradicionales de albaricoquero son susceptibles al virus, siendo las variedades precoces las que presentan los síntomas más fuertes. Este virus desde su primera detección en España (Llácer y col., 1985 a y b) ha pasado a ser el primer factor limitante del cultivo en la Comunidad Valenciana. La Sharka es actualmente la virosis frutal de mayor importancia económica en Europa, debido a los graves daños que produce sobre algunos frutales de hueso, especialmente albaricoqueros y ciruelos.

Con la aparición a mediados de los años 80 del virus de la sharka procedente de Centro Europa, las principales zonas de cultivo españolas están siendo gravemente afectadas por esta enfermedad. Incluso se teme por la continuidad del cultivo en zonas como Murcia o Valencia donde se produce más del 80% del total del país. Debido a las características de transmisión de este virus y la presencia de vectores muy eficientes en la transmisión, la erradicación de la enfermedad en España no es posible. Teniendo en cuenta las gravísimas pérdidas de cosecha que este virus origina en albaricoquero, la inexistencia de métodos de lucha eficaces, la ausencia de variedades europeas

resistentes y la falta de adaptación a las condiciones españolas de cultivo de las pocas variedades norteamericanas resistentes, la única forma efectiva a largo plazo de lucha contra la Sharka en albaricoquero es la creación de nuevas variedades que reúnan los caracteres de resistencia al virus y de una buena adaptación agronómica y comercial.

Con el fin de introducir resistencia a sharka en variedades autóctonas se iniciaron una serie de programas de mejora en España (Egea y col., 1997), Francia (Audergon, 1995), Italia (Bassi y col., 1995) y Grecia (Karayiannis y col., 1997). Todo proceso de mejora genética clásica en una especie frutal requiere una primera fase de recopilación y evaluación del germoplasma del que se dispone. La diversidad varietal es un recurso fitogenético muy importante para la mejora genética de la especie. Existe un elevado número de variedades de albaricoquero registradas en las distintas partes del mundo. En los países mediterráneos los intereses locales se han dirigido a la selección de variedades capaces de cultivarse en climas áridos, con temperaturas altas en verano y bajo riesgo de heladas.

En 1991 y 1993, respectivamente, se iniciaron programas coordinados de mejora genética del albaricoquero en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), en Murcia, y en el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), en Moncada (Valencia) (Egea y col., 1994; Badenes y col., 1996). En el programa de mejora que se desarrolla en el IVIA se han caracterizado las variedades utilizadas en el mismo mediante métodos pomológicos (Badenes y col., 1997) e isoenzimáticos (Badenes y col., 1996).

Como punto de partida para los programas de mejora, se plantaron sendas colecciones de más de un centenar de variedades cada una, incluyendo cultivares de origen extranjero (Estados Unidos, Canadá, Francia, Italia, Grecia, Túnez y Sudáfrica) y variedades autóctonas españolas de Murcia y Valencia. Los objetivos de las colecciones eran:

1) Estudiar el comportamiento en las condiciones de Murcia y Valencia de las variedades foráneas, con vistas a la posible introducción de alguna de ellas como solución transitoria hasta la obtención de nuevas variedades.

2) Como consecuencia del punto anterior, elegir las variedades más adecuadas como genitores para los programas de cruzamientos.

Las variedades precoces valencianas están muy bien adaptadas a nuestras condiciones de cultivo, tienen buen sabor y son autofértiles. Podrían servir de base para cambiar la gama varietal y evitar la concentración de la oferta (Badenes y col. 1997). Tienen unas exigencias en horas frío que oscilan entre 400 y 750 horas. La plena floración tiene lugar en la primera quincena de Febrero para la variedad ultraprecoz Currot, mientras que en la segunda quincena de Febrero florecen las variedades precoces Ginesta, Palau, Palabras, Gandiá, y Manrí. A lo largo de Marzo florecen, de forma escalonada, Canino, Gabachet, Rojo de Carlet, Cristalí, Martinet, Corbató, Chirivello y Tadeo. Los frutos de maduración más precoz son también los de Currot (antes del 15 de Mayo), seguidos por los de Gandiá, Manrí, Ginesta, Palau, y Palabras (todos dentro de Mayo). Este grupo de variedades es muy interesante por su precocidad, pero presenta algunas deficiencias, como son la mediana productividad y el pequeño calibre de los frutos. Las características organolépticas son aceptables, aunque el grado de acidez aumenta con la precocidad. El resto de variedades autóctonas valencianas se pueden calificar como de media estación (maduración en la 1ª quincena de Junio), excepto Martinet y Tadeo, que pueden considerarse tardías (2ª quincena de Junio). Estas variedades presentan frutos de calibre algo mayor y un menor contenido en acidez que las precoces. Todas las variedades valencianas estudiadas son autofértiles, excepto una mutación más temprana de Canino que se ha revelado como androestéril.

Las variedades murcianas se comportan en su conjunto como más tardías que las valencianas, excepto las denominadas genéricamente "Valencianos" que, como su nombre indica, son variedades originadas a partir de las precoces valencianas y tienen

un comportamiento y unas características pomológicas muy similares. Las variedades autóctonas murcianas más interesantes son las que maduran después del 20 de Junio, ya que sus frutos suelen ser de mayor calibre y menor acidez que los de las variedades valencianas de la misma época y llegan al mercado cuando la presencia de albaricoques empieza a descender notablemente. Pueden destacarse: Morenos, Pepito del Rubio, Velázquez Tardío, Perla y Real Fino. Algunas variedades murcianas son autoincompatibles (como Moniquí y Velázquez Tardío), lo que indica probablemente un origen norteafricano (del grupo Irano-Caucásico).

En España apenas se cultivan variedades extranjeras de esta especie frutal. Es conocida la falta de plasticidad de la mayoría de las variedades de albaricoquero que, como especie, se ha adaptado a condiciones climáticas muy diferentes, pero lo ha hecho gracias a una gran diversificación varietal, de modo que, como ya se ha indicado anteriormente, cada variedad o grupo pequeño de variedades está adaptado a unas condiciones particulares y se comporta mal fuera de ellas. En consecuencia, cada país, y dentro de cada país, cada región, cultiva sus propias variedades. A pesar de ello en las colecciones de Murcia y Valencia algunas variedades extranjeras han destacado por su comportamiento entre aceptable y bueno: las tunecinas Priana y Beliana, las griegas Precoz de Tyrinthos y Bebecco, las norteamericanas Katy, Cot 1, Castelbrite, Goldrich y Harcot, la sudafricana Palstein, la italiana Baracca y la francesa Tardif de Bordaneil. En general, el calibre de los frutos de las variedades extranjeras ha sido superior al de las españolas, así como la productividad en las variedades sin excesivas exigencias en frío (Egea y col., 1994; Badenes y col., 1997).

En base a las informaciones bibliográficas existentes (Dosba y col., 1991) se eligieron para el programa de mejora genética a desarrollar en el IVIA dos variedades norteamericanas como genitores resistentes a sharka (Stark Early Orange y Goldrich) y otros dos cultivares precoces valencianos como genitores autóctonos (Ginesta y Palau). Ocasionalmente se ha utilizado algún otro genitor norteamericano (Harcot y Sunglo) de entre los considerados resistentes o tolerantes al virus de la Sharka. Las nuevas variedades que se pretende obtener deben combinar las características favorables de los

genitores, por lo tanto deben ser al mismo tiempo resistentes al virus de la sharka y presentar buenas calidades agronómicas y comerciales.

1.8.- Marcadores genéticos.

En la actualidad se vienen desarrollando gran cantidad de métodos para la obtención de marcadores genéticos, que sirvan de apoyo a los programas de mejora genética. Existen por tanto distintos tipos de marcadores:

1.8.1.- Marcadores morfológicos.

Los marcadores morfológicos controlados por un simple locus pueden ser utilizados como marcadores genéticos si su expresión es reproducible para una amplia gama de ambientes. El hecho de que hayan factores en el medio que modifiquen la respuesta fenotípica de este carácter limita su utilización como marcador genético.

1.8.2- Isoenzimas

Las isoenzimas se pueden definir como variantes de una misma enzima que, desempeñando idéntica o similar función, tienen diferente carga eléctrica y peso molecular. Al conjunto de formas diferentes de una misma enzima se le denomina sistema isoenzimático y el interés de éstos para la taxonomía se basa en dos razones fundamentales: su especificidad y la independencia del medio.

Se han realizado estudios isoenzimáticos para la identificación de variedades en especies frutales como el manzano (Chevreau y col., 1985; Weeden y Lamb, 1985, 1987), el almendro (Hauagge y col., 1987; Cerezo y col., 1989), el melocotonero (Messeguer y col., 1987) y el albaricoquero (Badenes y col., 1996).

Estos marcadores tienen sin embargo algunas limitaciones. El polimorfismo

depende de la diversidad genética de la especie y aunque son productos primarios de la transcripción génica, se ha demostrado que algunos sistemas no son rigurosamente independientes del estado fisiológico en el que se encuentra la planta analizada (Royo y col., 1994).

1.8.3.- RFLPs (Restriction fragment length polymorphism).

Las desventajas de los anteriores marcadores llevaron a algunos investigadores a estudiar la posibilidad de obtener marcadores analizando directamente el ADN.

Los primeros marcadores moleculares que se desarrollaron fueron los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)(Boststein y col., 1980; Kan y Dozy, 1978; Wyman y White, 1980). Se trata de fragmentos de ADN que difieren unos de otros por su longitud. El ADN genómico se trata con endonucleasas de restricción, que lo rompen en un número de fragmentos cuyo tamaño y número son característicos del organismo y del tipo de endonucleasa utilizada. La especificidad se basa en que cada endonucleasa corta el ADN en sitios definidos, ya que sólo reconoce una secuencia de bases concreta. El número de fragmentos obtenidos corresponde a la frecuencia con que aparece esta secuencia repetida en el ADN del individuo. La longitud de cada uno de los fragmentos corresponde a las distancias entre cada uno de los sitios reconocidos. Los fragmentos de ADN se transfieren mediante Southern a una membrana de nylon y son hibridados con una sonda de ADN, que puede estar marcada radioactivamente o por luminiscencia. Las secuencias homólogas a la sonda utilizada se visualizan por impresión y revelado de una película.

Aunque la utilización de los marcadores moleculares en las especies leñosas ha empezado con retraso, el desarrollo de este tipo de estudios en frutales de hueso y pepita ha experimentado en los últimos años un progreso considerable.

Los RFLPs han sido utilizados para la identificación de variedades, como es el caso del albaricoquero (De Vicente y col., 1998), así como para la elaboración de mapas

genómicos. A partir de 1993 se empezaron a utilizar marcadores tipo RFLPs en melocotonero (Eldredge y col., 1992). En 1994 se publicó el primer mapa de manzano (Hemmat y col., 1994) construido con RFLPs e isoenzimas. En cerezo se ha elaborado recientemente un mapa genómico basado en este tipo de marcadores (Wang y col., 1998). El primer mapa genómico construido en almendro se realizó también con estos dos tipos de marcadores (Viruel y col., 1995). El número de loci estudiados se ha aumentando posteriormente (Arús y col. 1996; De Vicente y col. 1996; Ballester y col., 1998). También se han elaborado mapas genómicos con RFLPs en cruces interespecíficos almendro x melocotonero (Foolad y col., 1995; Joobeur y col., 1998; Jáuregui, 1998).

Los RFLPs se caracterizan por ser marcadores codominantes, con lo que son más informativos desde el punto de vista genético. Pese a ello presentan una serie de desventajas:

- Es necesaria la elaboración previa de una genoteca, partiendo de la misma especie o de especies relacionadas.
- Requieren la utilización de mucho ADN.
- Se trata de una técnica laboriosa.
- El polimorfismo detectado depende de la heterocigosidad de la especie estudiada. Líneas altamente isogenéticas o cultivos que han experimentado autopolinización durante generaciones dan lugar a pocos marcadores polimórficos con la utilización de esta técnica.

El principal inconveniente de esta técnica reside en el hecho de que, dadas las exigencias de la metodología, la realización rutinaria de este tipo de análisis en laboratorios no especializados en biología molecular es difícil.

Todo ello ha llevado al desarrollo de otros tipos de marcadores basados en el ADN, cuya utilización resulta mucho más sencilla.

1.8.4.- RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).

La técnica de los RAPDs fue desarrollada simultáneamente en dos laboratorios (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990).

Los RAPDs son marcadores moleculares que, al igual que los RFLPs, tienen como fundamento encontrar en el ADN secuencias de nucleótidos cortas y repetidas a lo largo de la cadena. Para ello se utiliza una secuencia corta de ADN llamada cebador, generalmente de 10 nucleótidos de secuencia arbitraria, que puede tener complementariedad con el ADN en varios sitios. Según la secuencia del cebador utilizado, la unión se dará en unos lugares o en otros. Esta unión servirá de punto de partida para sintetizar un fragmento continuo de ADN. Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se obtienen, a partir de una pequeña muestra de ADN infinidad de copias en pocas horas, de modo que estos fragmentos pueden ser visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Este tipo de marcadores ha sido ampliamente utilizado para la identificación varietal, obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés y la elaboración de mapas genómicos. El primer mapa genómico del melocotonero (*Prunus persica* L.) se basa en este tipo de marcadores (Chaparro y col., 1994). Otros mapas elaborados en melocotonero combinan esta técnica con los RFLPs (Rajapakse y col., 1995; Viruel y col., 1998; Quarta y col., 1998).

Como principales desventajas de esta técnica nos encontramos con la naturaleza dominante de los marcadores que se obtienen, la baja reproducibilidad de resultados y la presencia de amplificaciones de bandas del mismo peso molecular, imposibles de distinguir, y que pueden corresponder a loci distintos (Weeden y col. 1992). La falta de reproducibilidad se puede superar ajustando y fijando las condiciones de trabajo. Pese a estas desventajas los RAPDs tienen una serie de claras ventajas frente a los RFLPs:

- No requieren la elaboración de una genoteca.

- El polimorfismo detectado es superior al de los RFLPs, con lo que resulta una técnica adecuada para la elaboración de mapas utilizando cruces intraespecíficos.
- Requiere la utilización de menores cantidades de ADN.

1.8.5.- AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Se trata de una técnica bastante reciente (Vos y col., 1995) basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN. Combina por tanto las dos técnicas anteriores. Por cada amplificación se generan múltiples bandas que contienen marcadores de ADN de origen aleatorio. La digestión del ADN genómico tiene lugar por medio de dos enzimas: EcoRI y MseI. Uno de ellos, EcoRI, tiene muchos puntos de reconocimiento en el genoma, por tanto dará lugar a fragmentos de pequeño tamaño. Para obtener fragmentos de tamaño adecuado se utiliza la enzima de restricción MseI, que al tener menos puntos de reconocimiento, da lugar a fragmentos mayores. Una vez realizada la digestión tiene lugar una ligación con adaptadores específicos de EcoRI y MseI. Seguidamente se realiza una preamplificación que pretende generar muchas copias de los fragmentos obtenidos. El cebador específico correspondiente a la enzima EcoRI se marca radioactivamente para la realización de una amplificación selectiva, cuya misión es seleccionar sólo los fragmentos en cuyos extremos encontramos los cortes de ambas enzimas, EcoRI y MseI. Los resultados se visualizan en geles de poliacrilamida, que se caracterizan por dar una gran resolución.

De todas las especies del género *Prunus*, el melocotonero es una de las más estudiadas desde el punto de vista genético. Presenta un grado de heterocigosidad bajo dentro de este género, por lo que requiere la utilización de marcadores que den un alto grado de polimorfismo. Los AFLPs pueden detectar un gran número de loci, siendo muy adecuados para la elaboración de mapas genómicos de elevada densidad. Recientemente estos marcadores han sido utilizados, junto con los descritos anteriormente, para la elaboración de mapas genómicos en la especie melocotonero:

- Abbott y col., 1998: Utilizando marcadores tipo RFLPs, RAPDs, AFLPs y SSTs.

- Sosinski y col., 1998: RFLPs, RAPDs y AFLPs.
- Lu y col., 1998: AFLPs.
- Dielenwanger y col., 1999: RAPDs, RFLPs y AFLPs.

Los AFLPs dan lugar a marcadores dominantes. Se trata además de una técnica costosa y requiere un equipamiento caro, ya sea la utilización de radioactividad o secuenciadores. Pese a estas desventajas, esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas anteriores:

- No requiere elaborar previamente una genoteca.
- Detecta un gran número de loci, con lo que resulta una técnica adecuada para la identificación de genotipos muy próximos genéticamente y permite la elaboración de mapas de alta densidad.
- Los marcadores que se obtienen presentan una gran resolución y son altamente repetitivos.
- Se pueden transformar en marcadores SSR (codominantes).

1.8.6.- Otros marcadores moleculares.

Una de las principales desventajas de los marcadores basados en las técnicas de PCR es que dan lugar a marcadores dominantes, menos informativos genéticamente. Uno de los medios de superar estas limitaciones consiste en la conversión de este tipo de marcadores en sondas codominantes de RFLP o en SCARs (Sequence-characterized amplified region). Los SCARs son productos polimórficos obtenidos por PCR utilizando cebadores de secuencia corta (10 nucleótidos), que posteriormente son secuenciados y utilizados como cebadores específicos. La especificidad de estos cebadores los hace adecuados para su utilización en la amplificación específica de marcadores (Paran y Michelmore, 1993). Se comportan como marcadores dominantes pero se pueden también convertir en marcadores codominantes (Rafalsky y Tingey, 1993).

Otra técnica también utilizada son los SSRs (Simple Sequence Repeats) o microsatélites. Se trata también de una importante modificación de las técnicas basadas en la PCR. Consiste en la amplificación de secuencias repetitivas del genoma de un tamaño ≤ 6 pb, llamadas microsatélites (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). El número de copias de estos fragmentos repetidos del genoma varía de un individuo a otro, siendo ésta la base del polimorfismo. Esta técnica está ganando cada vez más importancia en los estudios genómicos de plantas (Condit y Hubbell, 1991; Rangwen y col., 1995), ya que proporcionan marcadores codominantes.

1.9.- Aplicación de los marcadores moleculares en la mejora genética.

La mejora genética de las especies a través de su selección por el hombre depende de la habilidad de controlar los efectos genéticos y distinguirlos de los efectos en el fenotipo producidos por el medio ambiente.

El proceso completo de mejora genética en una especie frutal puede dividirse en tres fases:

- La primera fase, o fase de preparación, consiste en la recopilación y evaluación del germoplasma, la detección de los problemas más importantes a resolver, la definición de objetivos en función de los problemas detectados y la elección de genitores. Para ello es necesario identificar el material del que se dispone.
- La segunda fase consiste en la realización de cruzamientos entre los genitores elegidos y el estudio de las descendencias para seleccionar las obtenciones que mejor se ajusten a los objetivos definidos.
- La tercera fase consiste en la evaluación de las variedades seleccionadas en la fase anterior, el registro de las mismas para la protección de los derechos del obtentor y el inicio de la multiplicación comercial.

Todas las técnicas que permitan una rápida entrada en producción o una selección precoz de las descendencias son fundamentales para acortar la duración del proceso completo. En este contexto se sitúan las técnicas de marcadores moleculares. El

uso de los marcadores moleculares se ha convertido en una importante herramienta para el mejorador. Debido a que el polimorfismo observado con las técnicas del ADN es mucho mayor que el obtenido por los marcadores morfológicos o bioquímicos, se trata de marcadores particularmente útiles. La mejora asistida por marcadores moleculares (MAS) permite aumentar la eficiencia en la selección, permitiendo una selección precoz de los materiales. Esto resulta especialmente interesante para las especies frutales, ya que la mejora genética de estas especies se enfrenta a problemas mayores a los observados en las especies herbáceas anuales. En especies leñosas la duración intergeneracional unida a las mayores dificultades de manejo, como por ejemplo la necesidad de disponer de mayor superficie para su evaluación, exigencia de frío para la floración y la disponibilidad de flores y frutos limitada a un corto período de tiempo, hace que los programas de mejora genética se prolonguen durante años.

La realización de mapas genómicos basados en marcadores moleculares puede permitir la selección indirecta de caracteres tanto cualitativos como cuantitativos. Estos marcadores también resultan útiles para la identificación de cultivares, el establecimiento de relaciones filogenéticas y la realización de estudios de diversidad genética por medio de los cuales se pueden establecer nuevas estrategias de mejora.

En la actualidad existe una intensa actividad en este sentido dentro de la mejora de frutales y concretamente dentro del género *Prunus*. Esta intensa actividad es reflejo de la utilidad que representa la localización de marcadores ligados a caracteres agronómicos valiosos en especies leñosas. Existen muchos mapas en construcción, dos de ellos dentro del proyecto de la Unión Europea , cuyo objetivo es construir el mapa consenso del género *Prunus* (Arús, 1994). A través de la construcción de estos mapas se han obtenido marcadores moleculares ligados a caracteres como la autoincompatibilidad, la dureza de la cáscara (Viruel y col., 1995) y la época de floración (Ballester, 1998) en almendro; el color de las anteras, la almendra amarga (Joober y col., 1998), la resistencia a nemátodos y el color de la hoja (Jauregui, 1998) en el cruce de almendro x melocotonero; porte, color de la flor, presencia de flores dobles (Chaparro y col., 1994), color de la carne, porte, enanismo (Rajapakse y col.,

1995), resistencia a *Taphrina deformans* (Viruel y col., 1998), resistencia a oidio, adherencia al hueso (Quarta y col., 1998), QTLs, fruto (Abbott y col., 1998; Dielenwager y col., 1999), acidez y forma del fruto, melocotón o nectarina, androesterilidad (Dielenwager y col., 1998), tamaño del fruto, glucosa, fructosa, fecha de maduración (Sosinski y col., 1998) y resistencia a nemátodos (Lu y col., 1998) en melocotonero.

En el actual programa de mejora genética del albaricoquero, que se está desarrollando en el IVIA, sería deseable contar con marcadores moleculares que ayudaran a la selección de caracteres como la resistencia a Sharka, autocompatibilidad y androesterilidad. La determinación de la resistencia a Sharka es actualmente el primer y más importante criterio en la selección de las descendencias en cruces intraespecíficos de la especie albaricoquero. A pesar de que se ha conseguido optimizar el método (Moustafa, 1999), esta determinación implica una serie de ciclos de injerto e inoculación con una duración mínima de 6 meses. Este período corresponde a las variedades sensibles que manifiestan síntomas rápidamente. Para su análisis las plantas deben tener además un tamaño adecuado, que no se alcanza hasta los 12-18 meses desde la germinación. La obtención de marcadores moleculares ligados al gen o genes de resistencia a Sharka aumentaría enormemente la eficiencia de la selección y del programa de mejora genética en su conjunto.

Otro carácter a seleccionar es la autocompatibilidad. La autoincompatibilidad en albaricoquero es un carácter no deseable. La mayoría de los genitores resistentes a sharka son autoincompatibles, por lo que se está introduciendo este carácter en las descendencias obtenidas en el programa. La determinación biológica de este carácter entraña muchas dificultades, por la laboriosidad de la metodología actual y el corto período de tiempo anual en el que se dispone de flores. La obtención de un marcador molecular para este carácter sería de gran utilidad. Lo mismo ocurre con el carácter androesterilidad, aunque a diferencia del anterior, la metodología para su determinación es mucho más sencilla. Sin embargo requiere la observación de las flores, y , por tanto, hay que esperar a que las plantas alcancen su período productivo.

La mejora asistida por marcadores moleculares tiene algunas limitaciones:

- Para determinados tipos de marcadores no se mantiene la asociación marcador-carácter entre diferentes poblaciones, con lo que los resultados de una población no son extrapolables a otras poblaciones de la misma especie. Esto es en parte debido a las diferencias genéticas entre poblaciones, a las interacciones genotipo-ambiente y a la falta de estabilidad de dichas asociaciones a través de las distintas generaciones (Baird, 1996).
- Muchos de los genes de interés agronómico son de herencia cuantitativa. En estos casos es más difícil encontrar marcadores que expliquen la variación genética. Por lo tanto, la selección de marcadores moleculares de ayuda a la selección es menos eficiente para estos caracteres (Strauss y col., 1992).

Sin embargo, según O'Malley y col. (1996), las nuevas técnicas de obtención de marcadores y los progresos en los algoritmos desarrollados para el procesado de los datos suministrados por los mismos, pueden solucionar gran parte de estos problemas y hacer que la mejora asistida por marcadores sea realmente eficiente en la selección de caracteres cuya herencia sea tanto oligogénica como poligénica.

Para lograr marcadores es necesario estudiar la co-segregación entre los candidatos a marcadores y los caracteres de interés. Ello implica disponer de poblaciones adecuadas en las que poder estudiar dicha co-segregación. Esto ha sido un gran obstáculo para el progreso de estos estudios en muchas especies leñosas.

La existencia de familias de cruzamientos intraespecíficos de albaricoquero procedentes del programa de mejora del Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia), que segregan para caracteres de interés en nuestro programa de mejora, era una clara oportunidad para buscar y desarrollar marcadores moleculares de ayuda a la selección en esta especie.

2.- OBJETIVOS GENERALES

2.- OBJETIVOS GENERALES

- Realización de un estudio comparativo de los marcadores moleculares tipo RFLP, RAPD y AFLP para su aplicación en identificación de variedades, en estudios de diversidad genética y en construcción de mapas genómicos de albaricoquero.
- Construcción de un mapa genómico de la especie albaricoquero basado en los marcadores moleculares del tipo RAPD y AFLP, a partir de una población segregante para el carácter Resistencia a Sharka, obtenida de un cruce intraespecífico entre dos variedades: Goldrich y Valenciano.
- Obtención de marcadores moleculares ligados a los caracteres: Resistencia al virus de la Sharka, Autocompatibilidad y Androfertilidad, que son criterios de selección en los programas de mejora genética del albaricoquero desarrollados en Europa.

Estos tres objetivos pueden resumirse en un objetivo general:

- Estudio de marcadores moleculares en albaricoquero como ayuda para la selección precoz de las descendencias obtenidas en los programas de mejora de albaricoquero.

***4.- COMPARACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE MARCADORES MOLECULARES
PARA SU APLICACIÓN EN ESTUDIOS GENÉTICOS EN ALBARICOQUERO.***

4.1.-INTRODUCCIÓN

La especie albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es originaria de Asia Central, desde donde se introdujo posteriormente en Irán. Más tarde su cultivo se extendió a Italia, Grecia y otros países de la cuenca mediterránea. El albaricoquero presenta una gran diversificación varietal, lo que ha permitido su cultivo en áreas geográficas extensas. En cada zona el cultivo se basa en unas pocas variedades muy adaptadas ecológicamente (Layne y col. 1996). La producción de albaricoque es importante en varios países asiáticos, la zona mediterránea y USA. En todos estos países se están desarrollando programas de mejora genética, cuyo principal objetivo es la adaptación ecológica y la resistencia a enfermedades.

La diversidad genética del albaricoquero fue estudiada por Kostina (1969) y revisada posteriormente por Bailey y Hough (1975). Estos autores clasificaron el germoplasma de albaricoque en 4 grupos ecogeográficos, basándose en caracteres morfológicos y pomológicos. El grupo europeo es el de menor diversidad, pero incluye la mayoría de los albaricoques cultivados en Europa y USA. Este grupo ha sido estudiado utilizando isoenzimas (Badenes y col., 1996) y caracteres morfológicos (Badenes y col., 1998). Los isoenzimas en la especie albaricoquero mostraron bajos niveles de polimorfismo, pero superiores a los encontrados en melocotonero (Aruselkar y col., 1986). Los isoenzimas son productos de la expresión génica y los efectos ambientales pueden provocar diferencias en la expresión. Por otra parte los caracteres morfológicos utilizados para la caracterización de variedades son afectados por el ambiente y su estudio es laborioso, especialmente en especies frutales. La disponibilidad de estudios de diversidad genética en la especie albaricoquero puede permitir un mejor manejo del material del que se dispone, la conservación de los recursos genéticos y la planificación de estrategias de mejora. Sin embargo estos estudios requieren el suficiente número de marcadores polimórficos, que está limitado por la diversidad de la especie. Desde el desarrollo de las técnicas de biología molecular se dispone de una nueva y poderosa herramienta para la obtención de marcadores basados en el ADN. Estos marcadores presentan muchas ventajas, ya que no son

afectados por el ambiente y se puede obtener una gran cantidad de marcadores polimórficos. Como ya se ha visto en la introducción general existen muchos tipos de marcadores moleculares. Combinándolos es posible encontrar suficiente polimorfismo para los estudios de diversidad.

En el presente estudio se han analizado un grupo de variedades usadas como genitores en el programa de mejora genética del IVIA para la introducción de resistencia a Sharka. Han sido estudiadas utilizando marcadores del tipo RFLP, RAPD y AFLP.

4.2.- OBJETIVOS.

El objetivo del presente estudio es investigar el uso de los marcadores moleculares en la especie albaricoquero. Los resultados de cada tipo de marcadores han sido comparados en cuanto a su polimorfismo, habilidad para evaluar la diversidad genética, el establecimiento de relaciones entre cultivares, comparándolos con su origen geográfico, y la elaboración de mapas genéticos.

4.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se utilizaron 16 variedades de albaricoquero pertenecientes a la colección de variedades del IVIA. Se eligieron variedades procedentes de Norteamérica, que son probablemente híbridos entre albaricoques europeos y asiáticos (Badenes y col., 1996): Stark Early Orange (SEO), Goldrich (GOL), Harcot (HAR), Hargrand (HAG) y Henderson (HEN), todos ellos resistentes a Sharka excepto Hargrand; procedentes de Francia: Royal (ROY) y Rouge de Sernhac (SEN); y España: Canino (CAN), Moniquí (MON), Búlida (BUL), Navarros (NAV), Velázquez (VEL), Valenciano (VAL), Ginesta (GIN), Tadeo (TAD) y Corbató (COR). En el **Anejo 2** se incluyen figuras de las variedades utilizadas.

Tabla 4.1.- Variedades presentes en el estudio, su origen y resistencia (r) o susceptibilidad (s) al virus de la Sharka.

Variedades	Origen	Resistencia a Sharka
Stark Early Orange	Norteamérica	r
Harcot	Norteamérica	r
Hargrand	Norteamérica	s
Moniquí	España	s
Henderson	Norteamérica	r
Goldrich	Norteamérica	r
Velázquez	España	s
Ginesta	España	s
Valenciano	España	s
Tadeo	España	s
Navarros	España	s
R. Sernhac	Francia	s
Royal	Francia	s
Búlida	España	s
Canino	España	s
Corbató	España	s

Para diferenciar las distintas variedades a nivel genético se emplearon tres técnicas de marcadores moleculares: RFLPs, RAPDs y AFLPs.

En RFLPs se utilizaron inicialmente 12 sondas procedentes de almendro, amablemente cedidas por el IRTA de Cabrils, combinadas de tres en tres con un total de 4 enzimas: EcoRI, BamHI, XbaI y Hind III (Promega). Sin embargo, la falta de datos en algunas variedades hizo que se eliminaran del estudio las combinaciones correspondientes a XbaI y Hind III.

Para los RAPDs se utilizaron un total de 40 cebadores pertenecientes a las series OPB y OPC de Operon Technologies.

En AFLPs fueron utilizadas 6 combinaciones de cebador/enzima, las cuales pueden observarse en la **tabla 4.7**.

El análisis de los resultados se realizó utilizando el software NTSYS (Exeter Software, Setauket, NY), (Rolfh, 1993).

Para la elección de un estimador de la distancia genética en marcadores moleculares se compararon los índices de Nei y Jaccard. El índice de Nei se basa en el número de fragmentos de amplificación compartidos por las distintas variedades presentes en el estudio. La similaridad se define de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$N D (a, b) = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

- N_{ab} es el número de bandas que comparten los genotipos a y b.
- N_a es el número de bandas correspondientes al genotipo a.
- N_b es el número de bandas correspondientes al genotipo b.

El índice de Jaccard es un estimador de distancias genéticas al igual que el índice de Nei. Las distancias en este caso se definen de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$J D = 1 - N_{ab} / [(N_a + N_b) - N_{ab}]$$

- N_{ab} es el número de bandas que comparten los genotipos a y b.
- N_a es el número de bandas correspondientes al genotipo a.
- N_b es el número de bandas correspondientes al genotipo b.

Se evaluó la correlación entre estos dos estimadores de distancias genéticas en los tres tipos de marcadores utilizados en el estudio.

De acuerdo con la presencia (1) o ausencia de bandas (0) se obtuvo una matriz de similaridad usando el índice Nei (Nei y Li, 1979) como estimador de las distancias genéticas.

Se realizó un dendograma de las 16 variedades basando en la matriz de similitud para cada tipo de marcadores: RFLPs, RAPDs y AFLPs. Para ello se aplicó el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method). La comparación entre los distintos sistemas de marcadores empleados (RFLPs, RAPDs y AFLPs) se realizó usando el test de Mantel de correspondencia entre matrices (Mantel, 1967). Para tener una estimación de la similitud entre dendogramas y determinar si las diferencias entre ellos eran significativas se obtuvieron valores de coeficientes para cada dendograma, seguidos de la construcción de una matriz de coeficientes para cada tipo de marcador. Estas matrices de coeficientes también fueron comparadas utilizando el test de Mantel.

Para comparar los marcadores moleculares con los marcadores isoenzimáticos, de acuerdo con los resultados de Badenes y col. (1996), se construyó una matriz de similitud basada en la distancia de Nei (1972).

4.4.- RESULTADOS.

4.4.1.- **Índices estimadores de las distancias genéticas.**

La comparación entre los índices de Nei y Jaccard se realizó con la finalidad de observar posibles discrepancias entre ambos métodos a la hora de estimar distancias genéticas. La correlación más baja obtenida entre estimadores se observó con los RFLPs (0.89). Las correlaciones entre los índices de Nei y Jaccard fueron muy altas para los marcadores basados en PCR, AFLPs y RAPDs, que dieron un valor de 0.98 en ambos casos (**Fig. 4.1**). Esto llevó a la utilización del índice Nei como único estimador de las distancias genéticas en los tres marcadores moleculares comparados.

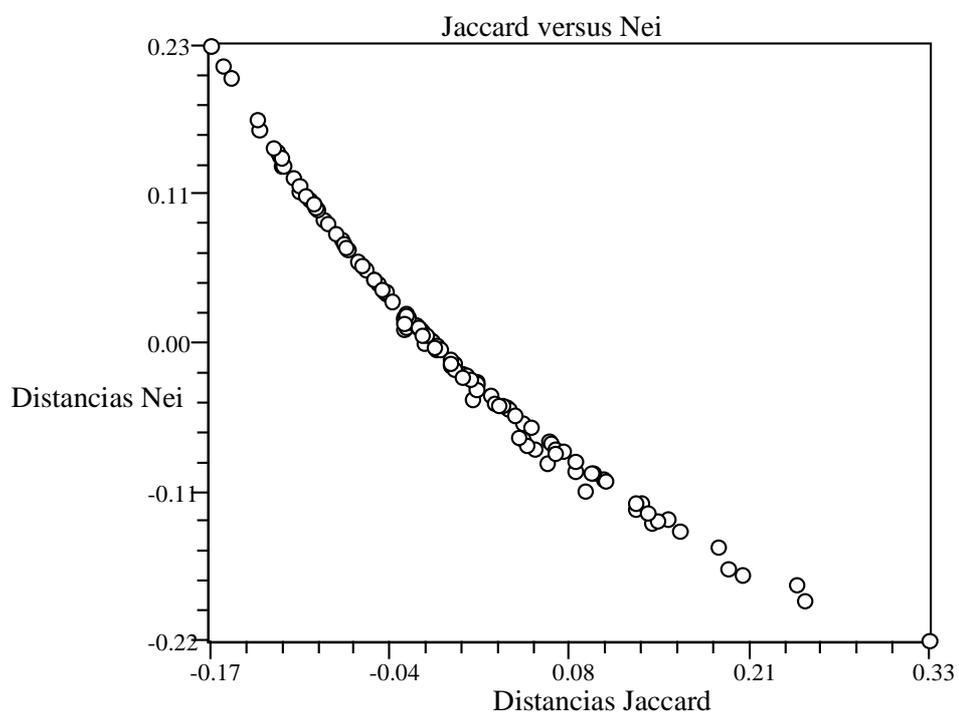


FIGURA 4.1.- Comparación entre los coeficientes de Nei y Jaccard para el cálculo de las distancias genéticas entre variedades en el sistema de marcadores AFLPs

4.4.2.- RFLPs

4.4.2.1.- Polimorfismo.

La combinación de doce sondas y dos enzimas (EcoRI, BamHI) utilizadas en RFLPs dio lugar a 49 bandas (**Tabla 4.7**). La combinación de las sondas AC6/AG8/AG12 con las dos enzimas no dio lugar a ningún fragmento polimórfico. Tres combinaciones de sondas dieron 11 bandas polimórficas, las cuales permitieron establecer diferencias entre las 16 variedades estudiadas. Variedades muy próximas entre sí pudieron ser identificadas por una única combinación sonda/enzima. Las sondas AG40/Ext1/S6 distinguían las variedades "Royal" y "Rouge de Sernhac", ambas francesas. "Canino" y "Búlida", dos variedades españolas, también fueron diferenciadas por una única combinación de sondas. Las sondas AG6/AG7/AG41 en la enzima BamHI mostraron bandas presentes en "Valenciano" y ausentes en "Ginesta" y viceversa. Estas dos últimas variedades pertenecen al grupo de variedades valencianas. Se trata de dos variedades muy próximas, por lo que se espera también su proximidad a nivel genético. Todas las variedades norteamericanas usadas como donantes de resistencia a Sharka en los programas de mejora genética europeos han sido identificadas por combinaciones específicas sonda/enzima. Los cultivares "Harcot" y "Hardgrand" procedentes de Ontario (Canadá) fueron identificados por una combinación sonda/enzima. El resumen del polimorfismo obtenido se muestra en la **tabla 4.2**.

Tabla 4.2.- Combinaciones de sondas y enzimas de RFLPs utilizadas en las 16 variedades de albaricoquero. (+) indica presencia y (-) indica ausencia del marcador.

Enzima	SONDAS	BAND	SEO	HAR	HAG	MON	HEN	GOL	VEL	GIN	VAL	TAD	NAV	SEN	ROY	BUL	CAN	COR	
ECOR1	AG46/AG9/Ole1	I	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
		II	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		III	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
	AG6/AG7/AG41	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
		II	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	AG40/Ext1/S6	I	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
		II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	AC6/AG8/AG12	MONOMORFICA																	
	BamH1	AG46/AG9/Ole1	I	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
			II	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AG6/AG7/AG41		I	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	
		II	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AG40/Ext1/S6		I	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
		II	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AC6/AG8/AG12		MONOMORFICA																	

4.4.2.2.- Agrupación de variedades.

El dendrograma obtenido se muestra en la **figura 4.2**. El agrupamiento central del dendrograma contiene las variedades españolas "Velázquez", "Ginesta" y "Búlida". Se observa un segundo grupo unido al anterior que incluye las variedades "Royal", "Canino" y "Corbató", variedades todas ellas pertenecientes al grupo europeo, aunque su origen sea diferente. "Royal" es una variedad francesa, mientras que "Canino" y "Corbató" son variedades valencianas. Muy cerca de estas últimas variedades nos encontramos las variedades "Valenciano" y "Tadeo", ambas de origen valenciano. Un tercer grupo unido a los anteriores incluye la variedad "Moniquí" de origen murciano y la variedad "Sernhac" de origen francés. Las variedades norteamericanas no se agrupan juntas, sino que se unen al grupo central separadamente. Primero "Stark Early Orange" y "Henderson" y posteriormente "Harcot" y "Goldrich". Estas cuatro variedades norteamericanas se caracterizan por ser resistentes al virus de la Sharka. De acuerdo con estos resultados las variedades más alejadas a nivel genético del grupo de variedades europeas son "Harcot" y "Goldrich". La correlación entre la matriz cofenética y el valor cofenético del agrupamiento fue de 0.83, lo cual representa una buena aproximación. La

correlación entre la matriz de distancias genéticas obtenida para RFLPs y las matrices obtenidas para otro tipo de marcadores moleculares se muestra en la **tabla 4.8**.

Tabla 4.3.- Matriz de similaridad entre cultivares usando marcadores RFLPs. Las distancias han sido calculadas con el índice de Nei (Nei y Li, 1979).

	SEO	HAR	HAG	MON	HEN	GOL	VEL	GIN	VAL	TAD	NAV	SEN	ROY	BUL	CAN	COR
SEO	1,00															
HAR	0,45	1,00														
HAG	0,30	0,43	1,00													
MON	0,32	0,37	0,33	1,00												
HEN	0,48	0,48	0,38	0,33	1,00											
GOL	0,21	0,30	0,25	0,18	0,25	1,00										
VEL	0,33	0,31	0,35	0,29	0,35	0,22	1,00									
GIN	0,30	0,29	0,32	0,26	0,32	0,18	0,28	1,00								
VAL	0,36	0,40	0,37	0,40	0,37	0,31	0,26	0,48	1,00							
TAD	0,40	0,36	0,32	0,35	0,40	0,18	0,28	0,43	0,36	1,00						
NAV	0,30	0,36	0,24	0,35	0,32	0,55	0,14	0,17	0,24	0,23	1,00					
SEN	0,40	0,43	0,40	0,43	0,40	0,36	0,28	0,35	0,36	0,38	0,50	1,00				
ROY	0,29	0,34	0,31	0,42	0,31	0,50	0,20	0,33	0,35	0,30	0,59	0,45	1,00			
BUL	0,32	0,30	0,33	0,45	0,33	0,20	0,29	0,45	0,31	0,32	0,27	0,40	0,24	1,00		
CAN	0,21	0,22	0,25	0,27	0,25	0,40	0,21	0,36	0,25	0,24	0,40	0,30	0,29	0,36	1,00	
COR	0,38	0,34	0,31	0,33	0,38	0,33	0,27	0,42	0,35	0,37	0,47	0,45	0,33	0,42	0,83	1,00

4.4.3.- RAPDs

4.4.3.1.- Polimorfismo.

Se emplearon 40 cebadores de 10 nucleótidos para la realización de este estudio. Aunque los 40 cebadores empleados en el estudio dieron lugar a amplificaciones, solamente 22 de ellos generaron fragmentos polimórficos, cuyos patrones de bandas eran altamente reproducibles. Se observaron un total de 45 fragmentos polimórficos, obteniéndose por cada cebador entre 1 y 3 fragmentos polimórficos (1.13 marcadores/cebador como media). Sólo dos cebadores generaron de 4 a 6 fragmentos polimórficos. Todas las variedades pudieron ser identificadas por medio de las bandas polimórficas obtenidas.

4.4.3.2.- Agrupación de variedades.

A partir de las bandas polimórficas obtenidas se calculó una matriz de similitud (Tabla 4.4) y a partir de ella se elaboró un dendrograma (Fig 4.3), donde aparecen en el mismo grupo las variedades norteamericanas "Stark Early Orange" y "Henderson". Estas dos variedades se diferencian muy claramente del resto de las variedades bajo estudio en lo que respecta a su pomología y sus necesidades de frío. Una segunda agrupación incluye las también variedades norteamericanas "Harcot" y "Goldrich". Todos estos cultivares son resistentes a Sharka y forman una agrupación separada del resto de las variedades estudiadas. Esto sugiere que las variedades que poseen el carácter resistencia a Sharka tienen un antecesor común. La variedad "Hargrand" de origen canadiense se agrupa con las variedades europeas. Se trata de una variedad que, al contrario del resto de las variedades norteamericanas estudiadas, presenta susceptibilidad al virus de la Sharka. Estos resultados sugieren que, pese a que esta variedad procede de un cruce entre variedades asiáticas y europeas, se aproxima genéticamente mucho más a las variedades europeas. Los otros grupos se encuentran formados por variedades europeas. Las dos variedades francesas "Royal" y "Sernhac" se agrupan juntas. Las variedades valencianas "Tadeo", "Canino" y "Corbató" aparecen juntas en otro grupo. También forman otro grupo las variedades murcianas "Velázquez", "Navarros" y "Moniquí". Las variedades europeas que más se alejan del grupo de cultivares resistentes a Sharka son las variedades valencianas "Valenciano" y "Ginesta", las cuales se caracterizan por su precocidad y sus bajos requerimientos de frío invernal. La distribución de las variedades en el dendrograma se realiza de acuerdo a las necesidades de frío, de manera que las variedades con mayores requerimientos de frío "Stark Early Orange" y "Henderson" se sitúan en un extremo del dendrograma, separadas de las variedades adaptadas a zonas más cálidas "Valenciano" y "Ginesta", que se sitúan al otro extremo.

El dendrograma obtenido se ajusta bastante a la matriz de distancias ya que presenta una correlación cofenética del 0.8. Las correlaciones entre la matriz de

distancias genéticas obtenida a partir de RAPDs con el resto de matrices obtenidas con los otros marcadores utilizados en el estudio puede observarse en la **tabla 4.8**.

Tabla 4.4.- Matriz de similitud entre cultivares usando marcadores RAPDs. Las distancias han sido calculadas con el índice de Nei (Nei y Li, 1979).

	SEO	HAR	HAD	MON	HEN	GOL	VEL	GIN	VAL	TAD	NAV	SEN	ROY	BUL	CAN	COR
SEO	1															
HAR	0,68	1														
HAD	0,76	0,73	1													
MON	0,68	0,58	0,65	1												
HEN	0,77	0,7	0,73	0,65	1											
GOL	0,72	0,7	0,65	0,62	0,61	1										
VEL	0,65	0,55	0,7	0,81	0,67	0,63	1									
GIN	0,49	0,36	0,43	0,64	0,41	0,36	0,57	1								
VAL	0,54	0,51	0,56	0,74	0,47	0,43	0,64	0,73	1							
TAD	0,67	0,68	0,68	0,72	0,73	0,73	0,73	0,43	0,53	1						
NAV	0,57	0,42	0,51	0,81	0,54	0,58	0,79	0,57	0,6	0,61	1					
SEN	0,68	0,7	0,69	0,69	0,74	0,65	0,75	0,45	0,59	0,82	0,63	1				
ROY	0,71	0,68	0,6	0,72	0,64	0,73	0,61	0,48	0,57	0,76	0,7	0,82	1			
BUL	0,64	0,65	0,77	0,69	0,65	0,57	0,67	0,6	0,74	0,68	0,55	0,73	0,68	1		
CAN	0,68	0,65	0,65	0,8	0,65	0,61	0,67	0,55	0,7	0,72	0,71	0,73	0,81	0,77	1	
COR	0,68	0,62	0,69	0,83	0,65	0,62	0,74	0,56	0,74	0,68	0,7	0,69	0,72	0,76	0,87	1

4.4.4.- AFLPs.

4.4.4.1.- Polimorfismo.

Para el estudio se utilizaron 6 combinaciones cebador/enzima, que dieron lugar a un total de 231 fragmentos polimórficos. Esto supone una media de 38.5 marcadores por combinación cebador/enzima. Este valor es 34 veces superior a RAPDs y 85 veces superior a RFLPs (**Tabla 4.9**). Todas las variedades fueron identificadas con una sola combinación cebador/enzima. Se encontraron 2 marcadores específicos de las variedades norteamericanas: AA/CTT 22 y AC/CAA 22, así como marcadores específicos de variedades norteamericanas resistentes al virus de la Sharka (**Tabla 4.11**). El cruce entre la variedad norteamericana Goldrich y la variedad autóctona Valenciano ha sido utilizado para la realización de un mapa genómico de albaricoquero, con lo que es de especial interés el encontrar marcadores que distingan ambas

variedades. Aproximadamente el 50% de los marcadores obtenidos por esta técnica distinguían al cultivar Goldrich de las variedades valencianas. Concretamente 104 marcadores de los 231 obtenidos por medio de AFLPs estaban presentes en Goldrich y ausentes en la variedad autóctona Valenciano (Currot). Los loci polimórficos correspondientes a cada combinación cebador/enzima utilizados en el estudio de diversidad y los loci que distinguen las dos variedades pueden verse en la **tabla 4.5**.

Tabla 4.5.- Marcadores AFLPs obtenidos en el estudio de diversidad de albaricoquero, que distinguen las variedades Goldrich y Valenciano.

AFLPs (enzima/cebador)	Loci polimorficos	Loci diferentes
EcoRI AC/MseI CTT	34	17
EcoRI AG/MseI CCA	26	15
EcoRI AC/ MseI CCA	38	19
EcoRI AA/MseI CTT	47	26
EcoRI AG/MseI CTT	31	14
EcoRI AC/MseI CAA	55	28

La **figura 4.8** muestra los resultados obtenidos para la combinación EcoRI AA/ MseI CTT en las 16 variedades estudiadas.

4.4.4.2.- Agrupación de variedades.

Al igual que para los otros dos tipos de marcadores moleculares, se obtuvo una matriz de similaridad (**Tabla 4.6**) y un dendograma (**Fig. 4.4**) en el cual se observan las relaciones genéticas entre las variedades estudiadas. La correlación cofenética fue del 0.82. Los resultados del agrupamiento obtenido con las 6 combinaciones cebador/enzima se ajustan perfectamente al origen geográfico de las variedades bajo estudio. Los dos grupos ecogeográficos, norteamericano y europeo, se agrupan separadamente, tal y como se ha observado ya para el caso de los marcadores tipo RAPDs. Sin embargo esta es la primera vez en que se separan las variedades europeas de acuerdo con su origen local, dando lugar a dos grupos claramente diferenciados de variedades murcianas y variedades valencianas. El otro grupo de variedades europeas

locales presente en este estudio se encuentra representado por dos variedades francesas, las cuales forman un agrupamiento independiente. El estudio por separado de cada una de las combinaciones cebador/enzima da como resultado dendrogramas que se aproximan al resultado obtenido en RAPDs, donde se observan las mayores diferencias en la posición relativa de los cultivares europeos. Utilizando el test de Mantel se obtuvieron las correlaciones entre matrices de similitud para cada combinación cebador/enzima, que oscilaron entre 0.46, valor obtenido de la comparación entre EcoRI AC/MseI CCA y EcoRI AC/MseI CAA, y 0.68, correspondiente a la comparación entre EcoRI AC/MseI CAA y EcoRI AA/MseI CTT. Las peores correlaciones resultaron de la comparación entre la combinación EcoRI AG/MseI CCA y el resto de combinaciones cebador/enzima, que oscilaron entre 0.22 y 0.42. Se establecieron también las correlaciones entre la matriz obtenida con la totalidad de las combinaciones cebador/enzima y las sucesivas matrices obtenidas a partir de 1, 2, 3, y 4 combinaciones cebador/enzima. Estos resultados pueden observarse en la **tabla 4.10**.

Tabla 4.6.- Matriz de similitud entre cultivares usando marcadores AFLPs. Las distancias han sido calculadas con el índice de Nei (Nei y Li, 1979).

	SEO	HAR	HAG	MON	HEN	GOL	VEL	GIN	VAL	TAD	NAV	SEN	ROY	BUL	CAN	COR
SEO	1															
HAR	0,62	1														
HAG	0,67	0,7	1													
MON	0,52	0,55	0,63	1												
HEN	0,77	0,61	0,6	0,44	1											
GOL	0,63	0,68	0,75	0,63	0,57	1										
VEL	0,52	0,55	0,61	0,81	0,48	0,61	1									
GIN	0,35	0,44	0,38	0,49	0,31	0,39	0,51	1								
VAL	0,43	0,51	0,45	0,58	0,37	0,44	0,61	0,72	1							
TAD	0,59	0,58	0,62	0,74	0,54	0,62	0,74	0,47	0,62	1						
NAV	0,58	0,61	0,65	0,82	0,48	0,66	0,8	0,5	0,62	0,77	1					
SEN	0,53	0,62	0,6	0,62	0,49	0,57	0,62	0,52	0,63	0,67	0,65	1				
ROY	0,56	0,63	0,62	0,72	0,46	0,66	0,71	0,52	0,61	0,69	0,73	0,75	1			
BUL	0,55	0,59	0,61	0,67	0,51	0,66	0,71	0,56	0,57	0,7	0,71	0,69	0,73	1		
CAN	0,55	0,65	0,63	0,69	0,5	0,64	0,67	0,53	0,59	0,68	0,72	0,75	0,75	0,71	1	
COR	0,46	0,49	0,51	0,58	0,41	0,45	0,6	0,59	0,65	0,62	0,58	0,59	0,56	0,55	0,61	1

4.4.5.- Isoenzimas

Los resultados obtenidos con los tres tipos de marcadores moleculares fueron comparados con 6 sistemas isoenzimáticos correspondientes a 7 loci obtenidos por Badenes y col. (1996). Se calculó la matriz de similaridad (**Tabla 4.7**) y a partir de ella se obtuvo un dendrograma (**Fig. 4.5**), que generaba una agrupación diferente a la obtenida por medio de los marcadores basados en ADN. Los isoenzimas no fueron capaces de distinguir las variedades Ginesta y Valenciano, ambas originarias de Valencia, las variedades Búlida, Corbató y Tadeo, originarias de diferentes zonas españolas y las variedades Canino y Hardgrand. La principal diferencia con respecto al resto de dendrogramas es que no se produce la separación de las variedades europeas y norteamericanas. Las comparaciones entre isoenzimas y los marcadores basados en ADN no son significativas (**Tabla 4.8**). La correlación cofenética fue la más baja observada entre marcadores (0,56), lo que indica que el agrupamiento obtenido no es muy fiable.

Tabla 4.7.- Matriz de similaridad entre cultivares usando isoenzimas. Las distancias han sido calculadas con el índice de Nei (Nei 1972).

	SEO	HAR	HAG	MON	HEN	GOL	VEL	GIN	VAL	TAD	NAV	SEN	ROY	BUL	CAN	COR
SEO	1															
HAR	0,57	1														
HAG	0,5	0,79	1													
MON	0,57	0,79	0,86	1												
HEN	0,57	0,86	0,86	0,86	1											
GOL	0,57	0,71	0,79	0,71	0,71	1										
VEL	0,36	0,71	0,79	0,79	0,79	0,57	1									
GIN	0,36	0,57	0,64	0,79	0,64	0,5	0,86	1								
VAL	0,36	0,57	0,64	0,79	0,64	0,5	0,86	1	1							
TAD	0,5	0,93	0,86	0,86	0,93	0,79	0,79	0,64	0,64	1						
NAV	0,5	0,86	0,93	0,93	0,93	0,71	0,86	0,71	0,71	0,93	1					
SEN	0,43	0,79	0,86	0,86	0,86	0,64	0,86	0,71	0,71	0,86	0,93	1				
ROY	0,57	0,86	0,79	0,93	0,86	0,79	0,71	0,71	0,71	0,93	0,86	0,79	1			
BUL	0,5	0,93	0,86	0,86	0,93	0,79	0,79	0,74	0,64	1	0,93	0,86	0,93	1		
CAN	0,57	0,79	0,86	1	0,86	0,71	0,79	0,79	0,79	0,86	0,93	0,86	0,93	0,86	1	
COR	0,5	0,93	0,86	0,86	0,93	0,79	0,79	0,64	0,64	1	0,93	0,86	0,93	1	0,86	1

Tabla 4.8.- Correlaciones obtenidas a partir de las distancias genéticas (Nei y Liu, 1978), entre variedades utilizando diferentes tipos de marcadores.

	Isoenzimas	RFLPs	RAPDs	AFLPs
Isoenzimas	1			
RFLPs	0.23	1		
RAPDs	0.23	0.28	1	
AFLPs	0.13	0.16	0.60	1

Tabla 4.9.- Variabilidad genética obtenida con los sistemas de marcadores RFLP, RAPD y AFLP en albaricoquero.

Sistema de marcadores	Nº Marcadores	Loci polimórficos
RFLPs (enzima/sonda)		
EcoRI AG46/AG9/Ole1	12	2
EcoRI AG6/AG7/AG41	4	2
EcoRI AG40/Ext 1/ S6	11	2
EcoRI AC6/AG8/AG12	2	0
BamHI AG46/AG9/Ole1	7	2
BamHI AG6/AG7/AG41	6	1
BamHI AG40/Ext 1/ S6	4	2
BamHI AC6/AG8/AG12	3	0
TOTAL	49	11
Marcadores RAPDs		
40 cebadores	449	45
AFLPs (enzima/cebador)		
EcoRI AC/MseI CTT	113	34
EcoRI AG/MseI CCA	121	26
EcoRI AC/ MseI CCA	124	38
EcoRI AA/MseI CTT	179	47
EcoRI AG/MseI CTT	153	31
EcoRI AC/MseI CAA	177	55
TOTAL	867	231

Tabla 4.10.- Comparación entre matrices de similitud obtenidas a partir de subgrupos de marcadores procedentes de las diferentes combinaciones cebador/enzima de AFLP y la matriz obtenida a partir de los datos de las 6 combinaciones. Las correlaciones fueron obtenidas por medio del test de Mantel (Mantel, 1967). N representa al número de combinaciones de matrices de distancias que se han comparado con la matriz de las 6 combinaciones.

Combinaciones cebador/enzima	Comparación con matriz 6 comb. cebador/enzima.	N
1 combinación	r = 0.48	10
2 combinaciones	r = 0.70	10
3 combinaciones	r = 0.91	6
4 combinaciones	r = 0.98	2

Tabla 4.11.- Marcadores que definen variedades resistentes a Sharka: Stark Early Orange (SEO), Harcot (HAR), Henderson (HEN) y Goldrich (GOLD).

Sistema marcadores	SEO, HAR, HEN, GOLD	SEO, HAR, HEN	SEO, HEN, GOLD	SEO, GOLD	SEO, HEN	HAR, GOLD
RFLPs	-	-	-	-	-	-
RAPDs	B17-500	-	-	-	-	-
AFLPs	-	AC-CTT18 AC-CCA31	AG-CTT22	AG-CTT7 AG-CCA9	AG-CCA17 AC-CTT3	AG-CCA4 AG-CCA10

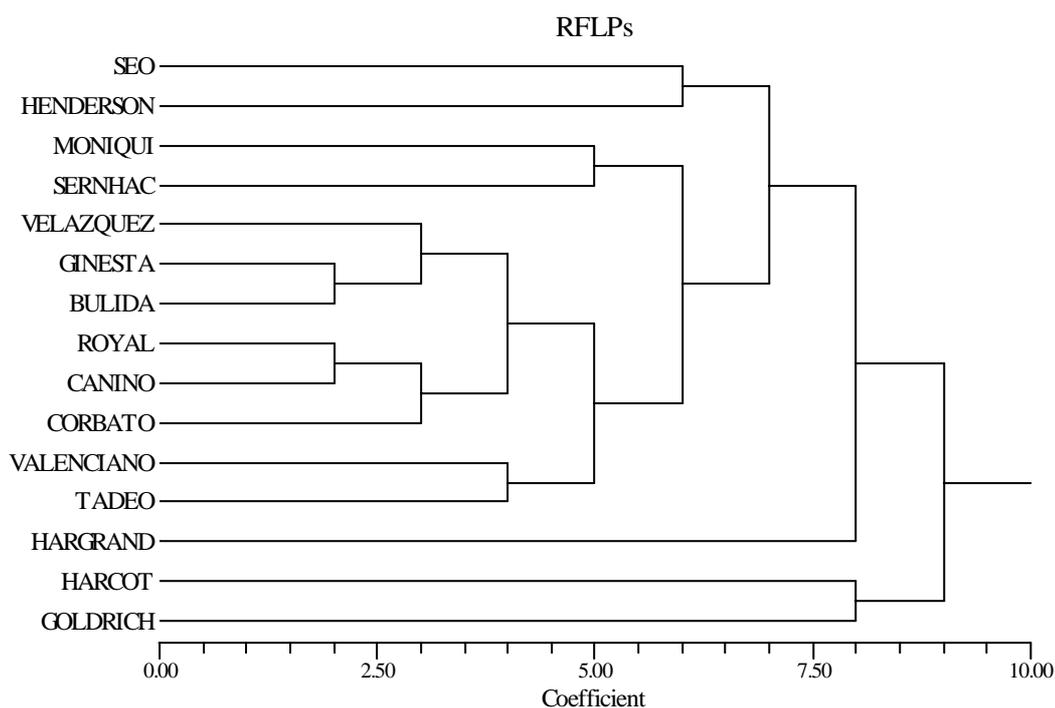


FIGURA 4.2.- Dendrograma de las variedades de albaricoquero agrupadas con el análisis UPGMA a partir de las distancias genéticas obtenidas con el índice de Nei para el sistema de marcadores RFLP.

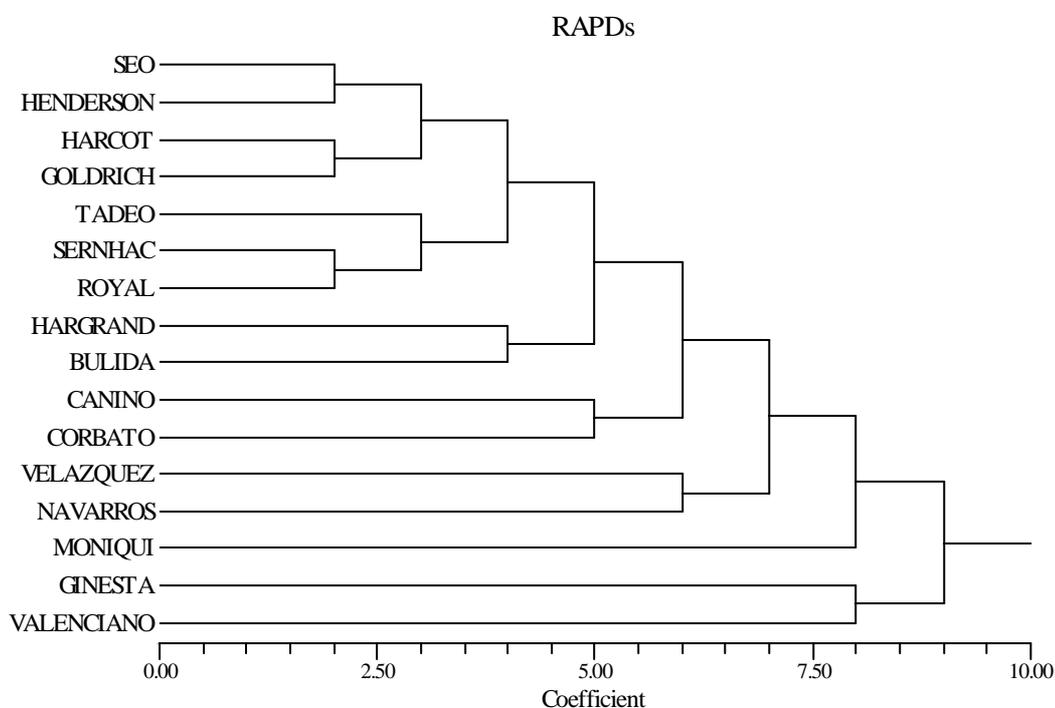


FIGURA 4.3.- Dendrograma de las variedades de albaricoquero agrupadas con el análisis UPGMA a partir de las distancias genéticas obtenidas con el índice de Nei para el sistema de marcadores RAPD.

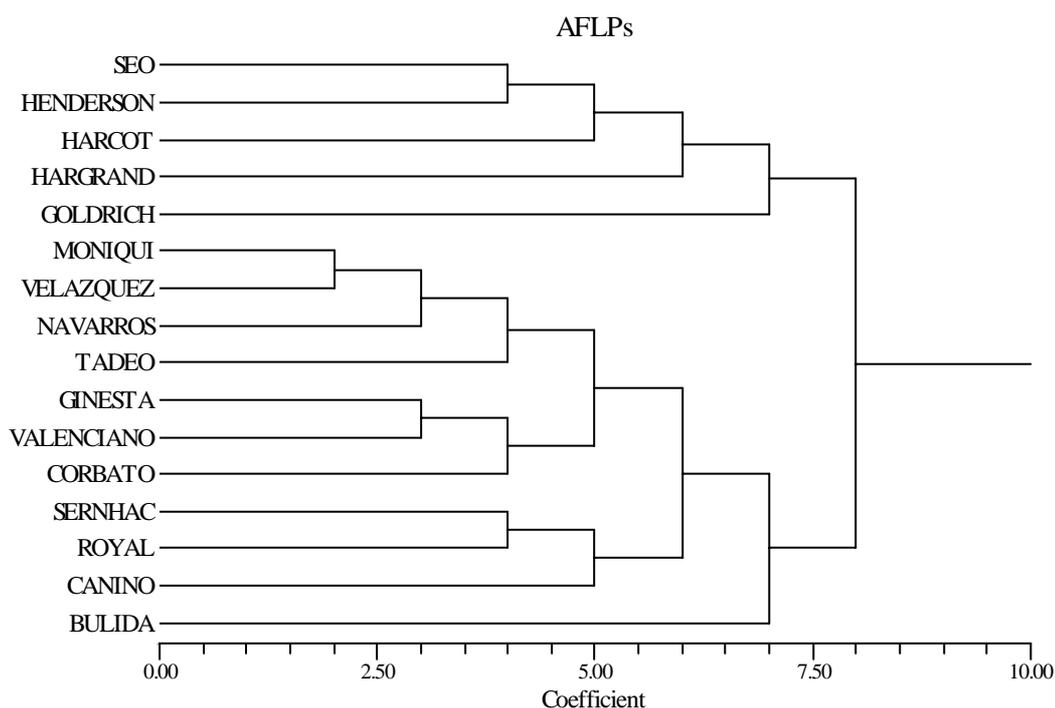


FIGURA 4.4.- Dendrograma de las variedades de albaricoquero agrupadas con el análisis UPGMA a partir de las distancias genéticas obtenidas con el índice de Nei para el sistema de marcadores AFLP.

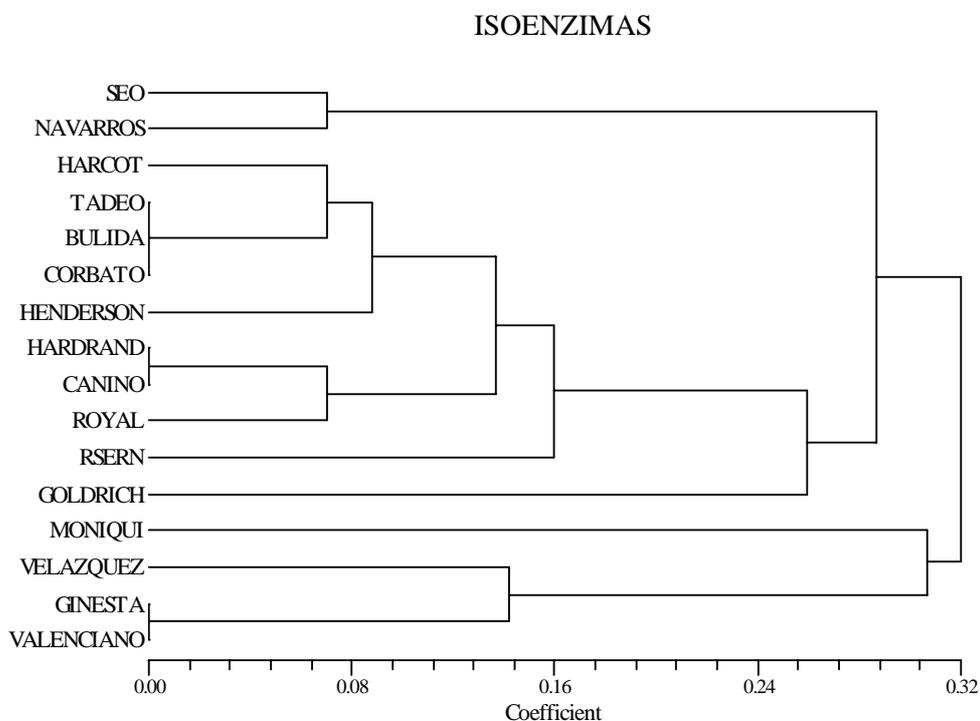


FIGURA 4.5.- Dendrograma de las variedades de albaricoquero agrupadas con el análisis UPGMA .Distancias genéticas obtenidas con el índice de Nei para Isoenzimas.

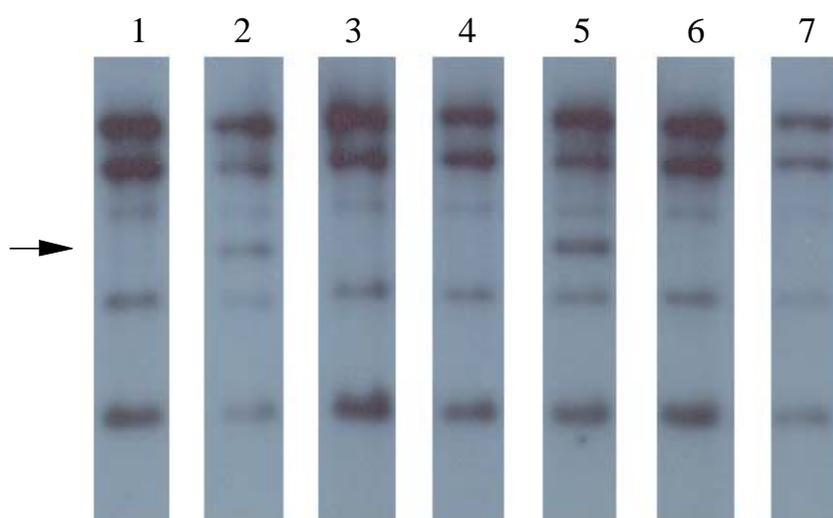


Figura 4.6.- Análisis RFLP de 7 de las 16 variedades de albaricoque incluidas en el estudio. La hibridación corresponde a la combinación de sondas AG6/AG7/AG41 utilizando la enzima BamHI. El marcador obtenido se encuentran señalado con una flecha. Las variedades de izquierda a derecha son: SEO, Hargrand, Velázquez, Ginesta, R. Sernach, Búlida y Canino.

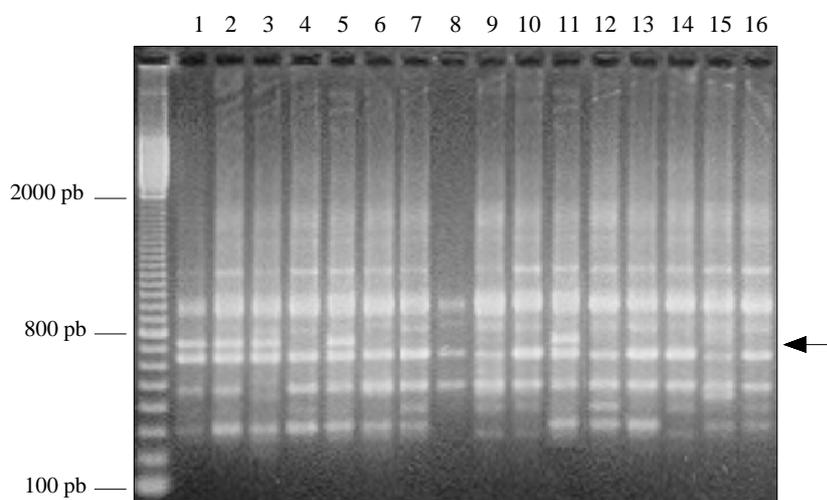


FIGURA 4.7.- Análisis RAPD de las 16 variedades de albaricoque incluidas en el estudio. La amplificación corresponde al cebador C-20. El marcador obtenido se encuentra señalado con una flecha y tiene un peso molecular de 750 pb. Las variedades de izquierda a derecha son: SEO, Harcot, Hargrand, Moniquí, Henderson, Goldrich, Velázquez, Ginesta Valenciano, Tadeo, Navarros, R. Sernach, Búlida, Canino y Corbató

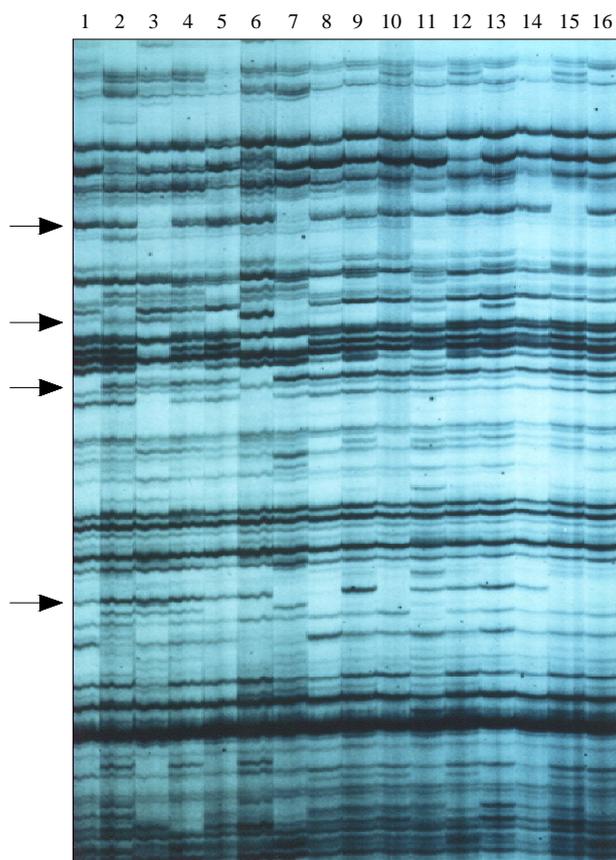


FIGURA 4.8.- Análisis AFLP de las 16 variedades de albaricoque incluidas en el estudio. La amplificación corresponde a la combinación EcoRI AA/Msel CTT. Algunos de los marcadores obtenidos se encuentran señalados con flechas. Las variedades de izquierda a derecha son: Corbató, SEO, Harcot, Hargrand, Moniquí, Henderson, Goldrich, Valenciano, Velázquez, Ginesta, Tadeo, Navarros, R. Sernach, Búlida y Canino.

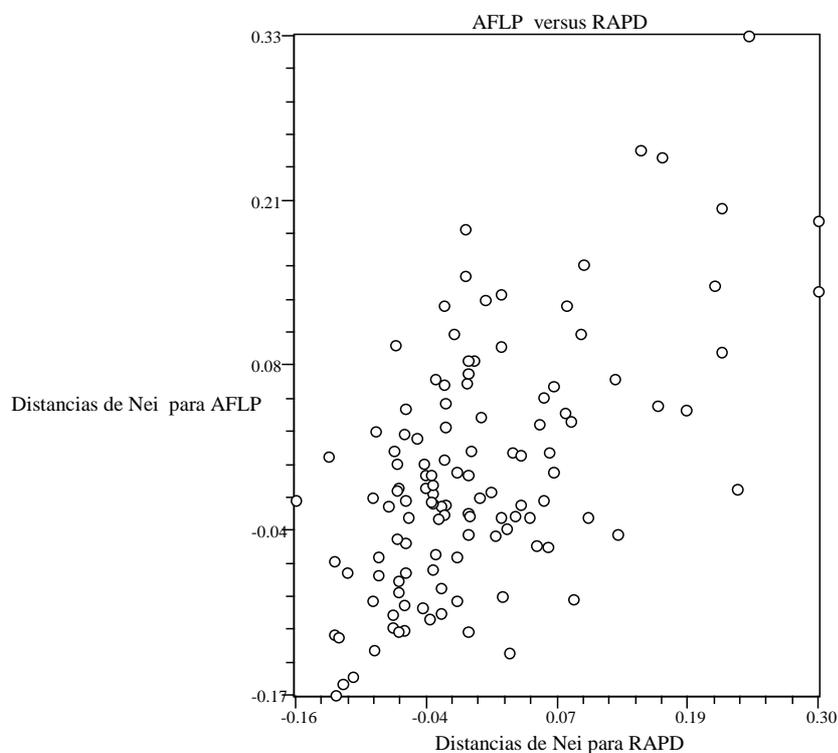


FIGURA 4.9.- Representación de las distancias genéticas obtenidas comparando los resultados de RAPD y AFLP.

4.5.- DISCUSIÓN.

El albaricoquero es una de las especies del género *Prunus* menos conocida y estudiada a nivel genético. Previamente a la realización de cualquier estudio basado en marcadores moleculares, resulta necesario determinar el grado de adecuación de los distintos tipos de marcadores. Nuestro interés se centra en la identificación de cultivares, el análisis de diversidad dentro de la especie y la construcción de mapas genómicos. Los marcadores evaluados pueden aportar información muy útil sobre la genética del albaricoquero, pero no todos los tipos de marcadores son adecuados. La selección de un tipo de marcador u otro dependerá del estudio que estemos realizando, teniendo en cuenta además el grado de resolución de los marcadores y el coste en la obtención de los mismos.

4.5.1.- Identificación de variedades.

Se obtuvo una gradación en la capacidad de resolución y discriminación de los distintos sistemas de marcadores, siendo baja para RFLPs, alta para RAPDs y muy alta para AFLPs, observándose que a mayor número de marcadores obtenidos, mayor era la capacidad de discriminación del sistema de marcadores empleado y mejor era la correlación existente entre estos sistemas de marcadores al compararlos entre sí. Tanto los RFLPs, los RAPDs como los AFLPs generaron fenotipos únicos para cada cultivar, ayudando así a su identificación. En nuestro estudio el bajo número de sondas utilizadas en RFLPs, unido al bajo nivel de polimorfismo y a la laboriosidad de la técnica, resultó en una limitación de los loci polimórficos obtenidos. Este polimorfismo no fue suficiente para obtener una adecuada clasificación de los genotipos y el establecimiento de relaciones entre cultivares. Por otro lado, una simple combinación cebador/enzima en AFLP proporcionó más información que 40 reacciones RAPD, lo cual resulta especialmente importante en cultivos que se propagan por clonación, donde esta resolución puede evitar costos innecesarios en los programas de mejora. Debido a que los AFLPs requieren el marcaje radioactivo de uno de los cebadores y mucho trabajo previo, es necesario realizar un estudio entre el coste de la técnica y su nivel de

resolución, antes de decidir qué técnica es la más adecuada. Debido a la simplicidad de los ensayos, los RAPDs resultan especialmente atractivos para su utilización en estudios genéticos de genotipos pertenecientes a la misma especie. Esta técnica se utiliza todavía para la identificación de variedades comerciales y para la protección de patentes en plantas (Baird y col., 1996). Sin embargo se han planteado algunas dudas a cerca de la fiabilidad de los RAPDs. Smith y col. (1994) mostraron que, en ocasiones, la ausencia de fragmentos era debida a una baja resolución de la técnica, que impedía la observación de bandas presentes. En muchas ocasiones tiene lugar la amplificación de fragmentos que tienen el mismo peso molecular, pero que pertenecen a regiones genómicas distintas, con lo que no pueden ser diferenciados. Estos problemas pueden ser resueltos con la estandarización de la técnica y la selección únicamente de bandas fiables y reproducibles. De acuerdo con nuestros resultados, la técnica de los RAPDs es una buena alternativa para la identificación varietal y el establecimiento de relaciones entre cultivares de acuerdo a su origen y su adaptación histórica. Powell y col. (1996), trabajando con *Glycine max* L., obtuvieron índices de comparación entre los marcadores AFLPs, SSRs, RAPDs y RFLPs similares a los obtenidos para el albaricoquero.

4.5.2.- Diversidad genética entre variedades de albaricoquero

Fueron evaluados 4 sistemas de marcadores comparando las matrices de similaridad y los dendogramas obtenidos con los orígenes de los cultivares incluidos en el estudio. Todos los sistemas de marcadores estudiados diferenciaban claramente los dos grupos ecogeográficos a los cuales pertenecen las variedades estudiadas: europeo y norteamericano. Todos los marcadores agruparon las variedades con un origen geográfico común, pero la mejor correlación obtenida correspondió a los AFLPs. Debido al bajo número de loci polimórficos obtenidos por las isoenzimas y RFLPs, la comparación de estas dos técnicas con los marcadores basados en PCR es sólo aproximada. Por ello no son extraños los valores de correlación tan bajos obtenidos con estos marcadores. Cuando comparamos los agrupamientos obtenidos en isoenzimas y los marcadores basados en ADN se observan algunos agrupamientos similares, pero en general existen diferencias importantes. Esto puede ser explicado también por el bajo

número de loci evaluados. La comparación entre RAPDs y AFLPs dio lugar a un índice de correlación del 60%. Resultados similares fueron obtenidos por Spooner y col. (1996). Estos autores compararon isoenzimas, RFLPs y RAPDs en especies silvestres de patata. Observaron que, a mayor número de marcadores obtenidos, mayor era la capacidad de discriminación del sistema de marcadores empleado y mejor era la correlación existente entre estos sistemas de marcadores al compararlos entre sí. Los marcadores basados en PCR están muy bien correlacionados entre sí. La correlación obtenida es muy alta cuando comparamos RAPDs y AFLPs, así como comparando las matrices obtenidas a partir de bloques de marcadores procedentes de AFLPs entre sí (**Tabla 4.9**). Thorman y col. (1994) se plantearon el estudio del número mínimo de marcadores necesario para obtener una clasificación estable de los genotipos. Concluyeron que comparando RFLPs y RAPDs en especies de *Brassica*, los RAPDs necesitaban un mayor número de bandas que las necesarias en RFLPs para alcanzar un 10% del coeficiente de variación. Sin embargo, este nivel se obtiene en RAPDs con la utilización de un número de cebadores menor al número de sondas necesarias en RFLPs. En nuestro estudio, el bajo número de sondas utilizadas en RFLPs, unido al bajo nivel de polimorfismo, resultó en una limitación de los loci polimórficos obtenidos. Este polimorfismo no fue suficiente para obtener una adecuada clasificación de los genotipos y el establecimiento de relaciones entre cultivares. Cuando comparamos los RAPDs y los AFLPs, observamos que los RAPDs proporcionan un número de bandas polimórficas por cebador 10 veces inferior y una menor precisión en la agrupación de las variedades genéticamente próximas. Los AFLPs dieron lugar al mayor número de loci. Las relaciones entre variedades estimadas para una sola combinación cebador/enzima en AFLPs fueron similares a las obtenidas en el análisis de RAPDs. Pese a la baja diversidad genética de los albaricoques cultivados, los AFLPs dieron una media de 37 bandas informativas por combinación cebador/enzima. Sharma y col. (1996) obtuvieron resultados similares en lentejas (*Lens culinaris* L.), mientras que en vid (*Vitis vinifera* L.) el grado de polimorfismo obtenido fue superior (Cervera y col., 1998). Los AFLPs proporcionaron los mejores resultados en el establecimiento de las relaciones existentes entre las variedades de albaricoquero estudiadas. Este tipo de marcadores puede ser muy útil para completar colecciones de germoplasma y en la

selección de variedades genéticamente próximas para su utilización en programas de mejora genética. Resultados parecidos fueron obtenidos por Zhu y col. (1998) en un estudio de diversidad de arroz. Estos autores comparaban los subgrupos de marcadores obtenidos en AFLPs y ninguno de ellos era capaz de identificar los tres grupos de arroz estudiados. A medida que se disminuía el número de marcadores, se iba perdiendo la agrupación de los cultivares. En nuestro estudio, los mejores resultados se obtuvieron considerando los marcadores resultantes de las 6 combinaciones cebador/enzima, es decir, utilizando para el agrupamiento la totalidad de los marcadores obtenidos. Sin embargo, debido a la alta correlación obtenida al comparar los resultados del total de combinaciones de cebador/enzima empleadas en el estudio y los obtenidos con sólo 3 combinaciones de cebador/enzima (**Tabla 4.9**), podemos decir que basta con la utilización de 3 combinaciones de cebador/enzima para distinguir las variedades. Esta es la primera vez que por medio de una técnica de marcadores moleculares (AFLPs) se consigue la agrupación de variedades de albaricoquero de acuerdo a su origen local dentro de los genotipos europeos. Este hecho destaca a los AFLPs como una técnica muy adecuada para su utilización en estudios genéticos. La utilización de otros tipos de marcadores que proporcionan un menor número de marcadores, lleva a una menor discriminación entre los cultivares europeos.

4.5.3.- Elaboración de mapas genómicos

Uno de los principales objetivos de nuestro estudio es determinar qué tipo de marcadores proporciona suficiente información, que permita la elaboración de mapas genómicos detallados de las familias obtenidas en nuestros programas de mejora. Los programas de mejora genética desarrollados en Francia, Italia, Grecia y España (Audergon, 1995; Bassi y col., 1995; Egea y col., 1997; Karayiannis y col., 1991) pretenden la introducción de resistencia al virus de la Sharka por medio de cruces entre variedades norteamericanas y europeas. De acuerdo con Kostina (1969), los cultivares asiáticos tienen unas necesidades de frío invernal elevadas para superar el período de latencia. La utilización de este tipo de cultivares como donantes de resistencia a Sharka no puede realizarse en los países de la cuenca mediterránea, donde los inviernos son

suaves. Esto ha llevado al uso de algunas variedades de origen norteamericano como genitores, ya que representan un puente entre el grupo europeo y el asiático, además de introducir resistencia a Sharka y otros caracteres de interés agronómico. Para nuestro programa de mejora hemos seleccionado como genitor al cultivar norteamericano Goldrich, que tiene unas necesidades medias de frío invernal. Como genitor del grupo europeo se ha seleccionado la variedad autóctona Valenciano. Esta familia, además de segregar para el carácter resistencia a Sharka, segrega para otros caracteres agronómicos de interés.

Un mapa genómico permite la mejora asistida por marcadores moleculares, permitiendo a los mejoradores la selección de plántulas sin necesidad de realizar inoculaciones del virus y posteriores estudios de localización del virus en la planta, técnicas todas ellas muy laboriosas. Todos los tipos de marcadores estudiados han dado lugar a polimorfismo presente en las variedades resistentes y ausente en las susceptibles, pero el número de estos marcadores por reacción de PCR o de hibridación por RFLP fue muy diferente. Partiendo de genitores distantes desde el punto de vista genético en un cruce intraespecífico, los RAPDs podrían resultar un buen sistema para su utilización en la realización de un mapa genómico. La familia que nos ocupa resulta de un cruce de una variedad norteamericana y una variedad europea. Los RAPDs han demostrado ser eficaces en la diferenciación de estas dos variedades, por lo que se puede asegurar su eficiencia en la obtención de polimorfismo en el estudio de la población segregante derivada de este cruce. Sin embargo se han estudiado los RAPDs para la población segregante formada a partir del cruce de dos variedades autóctonas murcianas y se ha observado que, pese a que los RAPDs producen normalmente un polimorfismo elevado, este polimorfismo puede ser limitado cuando los parentales utilizados son muy similares desde el punto de vista genético. Esto puede convertirse en una limitación importante en aquellos programas de mejora genética que utilizan este tipo de cruces, en los que se pretende mejorar caracteres importantes como la calidad del fruto. En este tipo de familias será difícil la construcción de mapas genómicos basados en RFLPs y RAPDs. Esto no resulta un problema si el tipo de marcadores utilizado es AFLP, ya que se obtiene una gran cantidad de marcadores que distinguen

entre cultivares muy próximos, lo que indica que puede obtenerse un mapa completo y saturado de estas familias basado en marcadores RAPDs y AFLPs. Los RFLPs son interesantes en la comparación de las especies del género *Prunus*. Las sondas procedentes de otras especies de este género pueden ser probadas en albaricoquero, permitiendo el establecimiento de homologías.

4.6.- CONCLUSIONES.

La poca información genética existente en albaricoquero ha acentuado la necesidad de obtener marcadores moleculares para estudios de identificación, diversidad genética y desarrollo de mapas genómicos en esta especie. Sin embargo, no todos los marcadores estudiados son adecuados para la consecución de estos objetivos. La selección de unos marcadores u otros va a depender del balance entre la resolución requerida y el coste necesario para conseguir dicha información.

- Los marcadores tipo RFLP permiten la identificación de variedades de albaricoquero. Sin embargo, debido a su bajo polimorfismo y a la laboriosidad de la técnica, no son recomendables para la aplicación rutinaria en identificación varietal de albaricoquero.
- Los marcadores tipo RFLP han demostrado ser adecuados para medir la diversidad genética y la elaboración de mapas genómicos. El polimorfismo obtenido por esta técnica depende de la heterocigosidad de la especie, de modo que su eficacia en albaricoquero dependerá de la utilización de un mayor número de combinaciones sonda/enzima.

- Los marcadores tipo RAPD son eficaces para la identificación varietal. Aunque presentan algunos problemas, sobretodo en lo que respecta a resolución y a reproducibilidad, una vez se han fijado y estandarizado las condiciones de trabajo, resultan una técnica rápida y sencilla. Los marcadores obtenidos agruparon las variedades de acuerdo con su origen geográfico.
- Los marcadores tipo RAPD son suficientemente polimórficos para la elaboración de mapas genómicos en cruzamientos intraespecíficos, siempre y cuando los parentales no sean muy próximos genéticamente.
- Los marcadores tipo AFLP han permitido la agrupación de las variedades de albaricoquero de acuerdo a su origen local dentro de los genotipos europeos. Este hecho destaca a los AFLPs como una técnica muy adecuada para su utilización en estudios de diversidad en poblaciones compuestas por genotipos muy próximos entre sí.
- Los marcadores tipo AFLP proporcionan un elevado polimorfismo, por lo que esta técnica resulta adecuada para la elaboración de mapas genómicos, incluso si se ha utilizado una familia cuyos parentales son muy próximos genéticamente.

***5.- MAPAS GENÓMICOS DE DOS VARIEDADES DE
ALBARICOQUERO BASADOS EN MARCADORES MOLECULARES
TIPO RAPD Y AFLP***

5.1.- INTRODUCCIÓN.

Las especies leñosas se caracterizan por su gran tamaño y por un periodo intergeneracional largo. Esto dificulta el desarrollo de estudios genéticos, lo que se traduce en un menor progreso en los programas de mejora realizados en frutales con respecto a los realizados en las especies hortícolas anuales. La mejora genética de las especies a través de su selección por el hombre depende de la habilidad de controlar los efectos genéticos y distinguirlos de los efectos que el medio ambiente produce sobre el fenotipo. Los marcadores obtenidos a partir de las técnicas basadas en el ADN son ilimitados en número y su uso e identificación no se ven afectados por el ambiente (Vogel y col., 1996). El mapeo genético se ha convertido en una herramienta muy potente para la localización y aislamiento de genes que controlan tanto caracteres simples como complejos. Los marcadores moleculares ligados a estos caracteres tienen un alto valor para la identificación y selección de plantas con caracteres deseables mucho antes de que éstos se expresen. Esta es la base de la selección asistida por marcadores (MAS).

En especies del género *Prunus* han sido desarrollados mapas genómicos basados en marcadores moleculares, tanto en cruces interespecíficos de melocotonero x almendro (Joobeur y col., 1998; Jáuregui, 1998) como en cruces intraespecíficos de almendro (Viruel y col., 1995; Ballester, 1998), melocotonero (Dielewanger y col., 1998; Lu y col., 1998) y cerezo (Wang y col., 1998). El albaricoquero es dentro de las especies del género *Prunus* la menos estudiada a nivel genético. Se ha determinado la herencia de unos pocos caracteres de interés, como la autocompatibilidad (Burgos y col., 1997) o la androesterilidad (Burgos y Ledbetter, 1994). También se han realizado estudios de diversidad basados en isoenzimas (Badenes y col., 1996), caracteres morfológicos (Badenes y col., 1998a) e identificación de cultivares por medio de RFLPs, RAPDs y AFLPs (Hurtado y col., 1999; De Vicente y col., 1998). La construcción de un mapa genético en albaricoquero representa una herramienta muy valiosa para la mejora de esta especie y permite el desarrollo de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS).

El cultivo del albaricoquero en los países del sur de Europa (Grecia, España, Italia y Francia) está siendo afectada por la expansión del Plum Pox Virus (PPV) o virus de la Sharka. Las características de este virus y los graves daños que causa en albaricoquero amenazan con eliminar totalmente su cultivo en estas zonas en los próximos 10 años. La obtención de variedades resistentes se ha convertido en un objetivo prioritario dentro de esta especie. Desde la extensión de la Sharka (Plum Pox Virus), todos los programas de mejora genética desarrollados en los países mediterráneos se han encaminado a obtener variedades resistentes al virus (Audergon, 1995; Bassi y col., 1995; Egea y col., 1997; Karayiannis y col., 1991). La obtención de un marcador molecular ligado al gen de resistencia a Sharka permitiría acelerar los programas de mejora genética de esta especie, ya que posibilitaría la selección de materiales resistentes mucho antes de que el gen se expresase. Para poder obtener un marcador molecular de un carácter de interés es necesario partir de una hipótesis sobre la herencia del mismo. Para ello ha sido necesaria la determinación de la resistencia o susceptibilidad al virus en cada uno de los individuos de la población utilizada para la elaboración del mapa. Esta determinación ha sido realizada paralelamente en el desarrollo de otra tesis, dentro de la misma Unidad de Fruticultura del IVIA, cuyo objetivo primordial es la obtención de un método adecuado para la determinación de resistencia al virus de la Sharka en plántulas de albaricoquero (Moustafa, 1999).

La elección de un sistema de marcadores para su uso en la construcción de un mapa genómico depende del tipo de información genética requerida y de su capacidad para la detección de polimorfismo en una población dada. El albaricoquero es una especie con un grado de heterocigosidad medio dentro de las especies de *Prunus*. Se encuentra por encima del melocotonero, pero por debajo del almendro, el cerezo y el ciruelo (Byrne y Littleton, 1989). El desarrollo de las técnicas moleculares basadas en la PCR ha reducido el coste en la identificación de marcadores genéticos y permite la determinación genotípica de individuos a gran escala para cualquier loci (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Los marcadores tipo RAPD proporcionan una fuente de gran cantidad de marcadores si se comparan con los RFLPs (Chaparro y col., 1994). Aunque proporcionan marcadores dominantes, que son menos informativos, el grado de

polimorfismo obtenido en RAPDs es suficiente incluso para especies con baja diversidad genética. Los marcadores tipo AFLP presentan una gran resolución, son altamente repetitivos y proporcionan gran cantidad de loci. La mayoría de los fragmentos de AFLP corresponden a posiciones únicas del genoma y pueden ser utilizados como referencia en el mapeo genético (Thomas y col., 1995; Vos y col., 1995; Cervera y col., 1998). Los estudios previos de diversidad hechos en albaricoquero utilizando diferentes marcadores moleculares, permitieron la elección de los marcadores basados en PCR (RAPDs y AFLPs) para la elaboración de un mapa genómico. Para ello se utilizó una familia procedente de un cruce intraespecífico de dos variedades de albaricoquero pertenecientes a grupos ecogeográficos distintos: la variedad norteamericana Goldrich y la variedad autóctona Valenciano.

5.2.- OBJETIVOS

La elaboración del mapa genómico de albaricoquero se engloba dentro del programa de mejora genética que se viene realizando en el IVIA. Los objetivos principales perseguidos en la elaboración de este mapa genómico son los siguientes:

- Favorecer el desarrollo de la mejora asistida por marcadores moleculares en esta especie y servir de ayuda a los mejoradores.
- Encontrar un marcador molecular ligado al carácter resistencia a Sharka, que permita la selección precoz de la resistencia en plántulas procedentes del programa de mejora genética.

5.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.3.1.- Población segregante.

La variedad norteamericana Goldrich se utilizó como genitor femenino para la introducción del carácter resistencia a Sharka. Como genitor masculino se utilizó la variedad autóctona Valenciano, que se caracteriza por ser autocompatible, además de

presentar otros caracteres agronómicos de interés. Las razones para la elección de esta familia fueron que era la más grande disponible de entre los cruzamientos realizados en Murcia y Valencia y que no sólo segregaba para el carácter resistencia a PPV, sino que lo hacía para otros caracteres como las necesidades de frío invernal, la época de recolección y el tamaño de los frutos. El estudio de esta familia, además, permite una aproximación al mejor entendimiento de la herencia de la resistencia a PPV en albaricoquero.

Para la elaboración del mapa se utilizaron 81 individuos precedentes de una F1 del cruce de estas dos variedades.

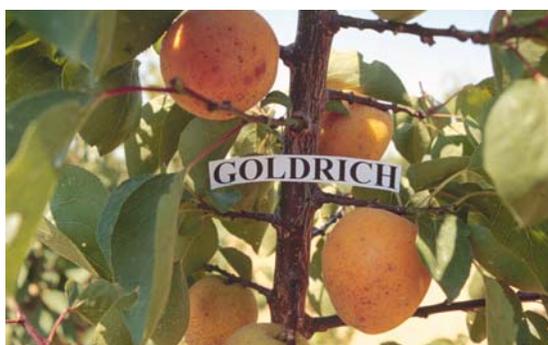


FIGURA 5.1.- Variedad norteamericana utilizada como parental femenino : Goldrich.

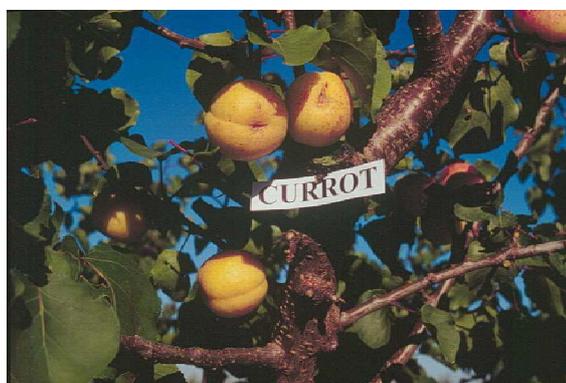


FIGURA 5.2.- Variedad autóctona utilizada como parental masculino: Valenciano 1 (Currot).

5.3.2.- Obtención de los marcadores.

5.3.2.1.- RAPDs

Se ensayaron un total de 160 cebadores de 10 nucleótidos, suministrados por Operon Technologies, Alameda (California), pertenecientes a las series OPB, OPC, OPM, OPP, OPR, OPY, OPZ y OPV. La selección de los cebadores polimórficos se realizó con una muestra formada por los dos parentales y 6 individuos de la población de acuerdo con Grattapalia y Sederoff, (1994). Se eligieron aquellos cebadores polimórficos para ambos padres y que segregaban en la descendencia. Por este

procedimiento fueron seleccionados 44 cebadores. La obtención de los marcadores tipo RAPDs se realizó tal y como se describe en los materiales y métodos generales.

5.3.2.2.- AFLPs

Para la elaboración del mapa se emplearon 14 combinaciones de cebador/enzima utilizando como cebadores Eco +2 / Mse +3 nucleótidos específicos. La obtención de los marcadores tipo AFLPs se realizó tal y como se describe en los materiales y métodos generales.

5.3.3.- Análisis de los datos.

Los marcadores fueron obtenidos leyendo directamente las fotos de los geles (RAPDs) y las radiografías (AFLPs), contrastando la lectura independientemente por dos personas. Los marcadores que mostraron segregación fueron codificados para cada uno de los individuos de la población en función de la presencia (1) o ausencia (0) de bandas. Sólo fueron codificados aquellos marcadores que presentaban bandas claramente definidas y que no podían llevar a engaño. La desviación de los marcadores obtenidos con respecto a la segregación mendeliana esperada se determinó utilizando el test de la Chi-cuadrado con un nivel de confianza $\alpha = 0.05$. Los marcadores que presentaron distorsión con respecto a la segregación mendeliana fueron analizados aparte. Los loci fueron separados en tres tipos:

- Aquellos que mostraban segregación para el parental femenino. Goldrich era heterocigoto para este marcador y Valenciano homocigoto. Estos marcadores presentaban segregación 1:1.
- Aquellos que mostraban segregación para el parental masculino. Valenciano era heterocigoto y Goldrich homocigoto. Estos marcadores también presentaban segregación 1:1.
- Aquellos marcadores que eran heterocigotos en ambos parentales y mostraban segregación 3:1.

Los marcadores con segregación 1:1 fueron usados para la construcción de los mapas correspondientes a cada uno de los padres. Los marcadores que daban segregación 3:1 fueron introducidos posteriormente en el análisis para la comparación de los mapas correspondientes al parental masculino y femenino.

5.3.4.- **Obtención del carácter resistencia a Sharka.**

Fueron recogidas varetas de cada uno de los 81 individuos correspondientes a la F1 de la población estudiada. Estas varetas fueron injertadas sobre melocotonero GF-305, seleccionado como indicador polivalente de virus por la Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière de la Grande Ferrade (INRA de Burdeos, Francia), debido a su elevada sensibilidad a la mayoría de los virus que afectan a frutales de hueso. Para la evaluación de la resistencia se realizó la inoculación del virus y el injerto de los híbridos sobre melocotonero GF-305 simultáneamente, con 6 repeticiones por origen. Previamente a la observación de síntomas en hojas y el análisis de presencia o ausencia del virus por ELISA-DASI, las plantas se sometieron a un ciclo de frío artificial en cámara a 5°C. Para confirmar los resultados, las plantas se sometieron a un segundo ciclo de frío, poda y nuevo crecimiento. La ausencia del virus en las plantas que no mostraron síntomas ni en el primero ni en el segundo ciclo fue confirmada por RT-PCR. Sólo los híbridos que resultaron negativos durante los dos ciclos en todas las plantas analizadas, después de su comprobación por ELISA-DASI y RT-PCR, fueron considerados resistentes (Moustafa, 1999). Un esquema del proceso puede observarse en el Anejo 6.

La presencia (susceptibilidad) (0) o ausencia (resistencia) (1) de síntomas fue codificada para cada uno de los individuos de la población. La desviación en la segregación con respecto a la hipótesis de herencia del carácter esperada se estudió utilizando el test de la Chi-cuadrado, tomando como nivel de confianza $\alpha = 0.05$.

Los marcadores obtenidos para el mapa genómico se compararon con los marcadores que diferenciaban las variedades resistentes de las sensibles a Sharka en el

estudio de diversidad, tanto en RAPDs como en AFLPs. Con ello se pretendía encontrar equivalencias entre marcadores, que ayudaran a encontrar marcadores ligados a este carácter con mayor facilidad (**Tabla 5.1**). Los valores correspondientes al ligamiento entre marcadores fueron obtenidos con el programa LINKEM (Vowden y col., 1995).

Tabla 5.1.- Marcadores que definen variedades resistentes a Sharka: Stark Early Orange (SEO), Harcot (HAR), Henderson (HEN) y Goldrich (GOLD) y sus equivalentes en el mapa.

Sistema marcadores	SEO, HAR, HEN, GOLD	SEO, HAR, HEN	SEO, HEN, GOLD	SEO, GOLD	SEO, HEN	HAR, GOLD
AFLPs	-	AC-CTT18 AC-CCA31	AG-CTT22	AG-CTT7 AG-CCA9	AG-CCA17 AC-CTT3	AG-CCA4 AG-CCA10
RAPDs	B17-500	-	-	-	-	-
Equivalente mapa	-	-	AG-CTT16	-	-	-

5.3.5.- Elaboración del mapa.

Los marcadores heterocigotos presentes en un parental y no en el otro se usaron para la construcción de mapas genómicos separados para la madre (Goldrich) y para el padre (Valenciano), usando el programa Joinmap (Stamp, 1993). La familia obtenida en este cruzamiento es una F1, pero debido a que los parentales utilizados son altamente heterocigotos, se puede asumir que su segregación coincide con una F2 de una población normal (“Two-way pseudo-testcross strategy”, propuesta por Grattapalia y Sederoff, 1994). El programa MAPMAKER (Lander y col., 1987) usando como soporte MS-DOS fue usado para comparar los resultados obtenidos con Joinmap. En este caso la matriz de datos fue duplicada con los datos codificados a la inversa, para poder detectar la presencia de marcadores ligados en fase de repulsión. Se utilizó un LOD (Log of the Odds Ratio) ≥ 5 para la obtención de grupos de ligamiento formados por marcadores con un alto nivel de ligamiento, los cuales fueron utilizados como soporte para el ordenamiento posterior del resto de los marcadores. Las frecuencias de recombinación entre pares de marcadores fueron calculadas utilizando el LINKEM (Vowden y col., 1995). Ello permitió identificar marcadores adicionales para su

incorporación a los grupos de ligamiento ya establecidos. Al final de este proceso los marcadores que no pudieron ser incluidos a un $LOD \geq 2.5$ fueron excluidos del mapa. La frecuencia de recombinación máxima utilizada en este estudio fue de $\theta = 0.4$. Las distancias genéticas en centimorgans fueron calculadas usando la función Kosambi. Una vez establecidos los grupos de ligamiento, éstos fueron dibujados usando el programa Drawmap. Para el establecimiento de comparaciones entre los dos mapas se añadieron finalmente los marcadores heterocigotos en ambos padres con segregación 3:1.

5.4.- RESULTADOS.

5.4.1.- Polimorfismo.

5.4.1.1.- RAPDs

De los 160 cebadores arbitrarios probados fueron seleccionados 44. El resto de los cebadores no dieron lugar a bandas polimórficas. Se obtuvo una media de 9 bandas por reacción y entre 1 y 3 bandas polimórficas por cebador. El total de marcadores polimórficos obtenidos después de estudiar toda la población fue de 67. Se observó la presencia de marcadores que se alejaban de la segregación esperada, correspondientes a 6 loci (9.0%) (**Tabla 5.2**). El número de marcadores correspondientes a cada parental fue: 30 para Goldrich y 19 para Valenciano. Doce marcadores se encontraban presentes en ambos padres y segregaban 3:1. El tamaño de los fragmentos de RAPDs osciló entre 200 a 1600 pb. Se encontró un locus codominante Z17- 650 / Z17-750 el cual daba una segregación 1:2:1. Los resultados obtenidos con esta familia se compararon con el análisis de estos mismos 160 cebadores en otra familia procedente del cruce de dos variedades murcianas. Se obtuvo sólo un 16% de cebadores que producían la amplificación de bandas polimórficas, lo que supone un polimorfismo inferior a la mitad del obtenido para la familia Goldrich x Valenciano. El total de los marcadores RAPDs obtenidos y su distribución en ambos mapas puede consultarse en el Anejo 5.

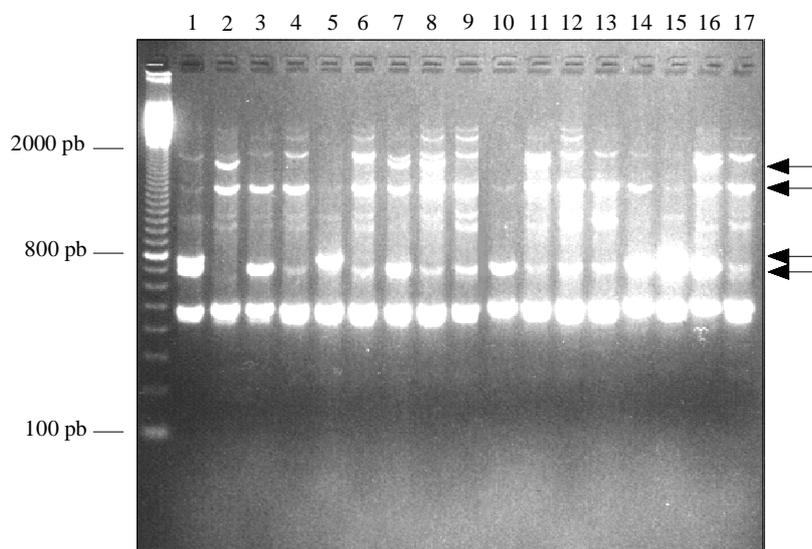


FIGURA 5.3.- Amplificación RAPD utilizando el cebador B-8. Con este cebador se han obtenido 4 marcadores (señalados con flechas). Los individuos 1 y 2 corresponden a los parentales Goldrich y Valenciano respectivamente.

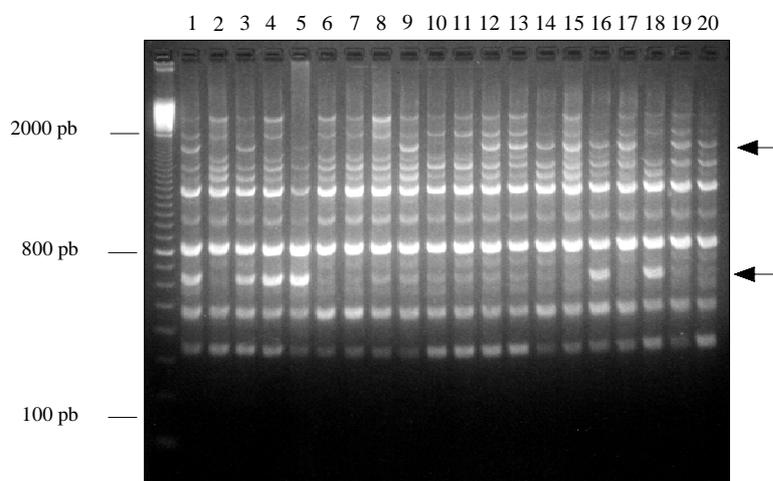


FIGURA 5.4.- Amplificación RAPD utilizando el cebador C-16. En este caso han amplificado 2 bandas polimórficas. Al igual que en el caso anterior los individuos 1 y 2 corresponden a los parentales Goldrich y Valenciano respectivamente.

5.4.1.2.- AFLPs

Se usaron cebadores Eco +2/Mse +3 y se obtuvo una media de 132 bandas por reacción. Todas las combinaciones de cebador/enzima utilizadas dieron lugar a amplificaciones polimórficas. Se obtuvieron un total de 147 bandas polimórficas (10.5 bandas polimórficas por combinación de cebador/enzima como promedio) (**Tabla 5.4**). 26 loci dieron segregaciones que se alejaban de la segregación esperada (17.7%) (**Tabla 5.2**). De los 98 marcadores de segregación 1:1, 65 fueron heterocigotos para el parental femenino (Goldrich) y 32 lo fueron para el masculino (Valenciano). 45 marcadores estaban presentes en ambos parentales y segregaban 3:1 (**Tabla 5.2**). Se obtuvo un loci codominante (EcoAA/MseCAC 5 y EcoAA/MseCAC 9), que mostró una segregación 1:2:1. Al igual que en RAPDs, la distribución del total de los marcadores AFLPs obtenidos en ambos mapas puede consultarse en el Anejo 5.

Tabla 5.2 Tipos de segregación obtenidos con los marcadores RAPD y AFLP.

Sistema marcadores	Total de bandas	Bandas con segregación 1:1		Bandas con segregación 3:1	Bandas con segregación distorsionada
RAPDs		Goldrich	Valenciano		
	67	30	19	12	6
AFLPs	143	65	32	45	26

Tabla 5.3.-Variabilidad genética del albaricoquero obtenida con marcadores RAPD y AFLP.

Sistema marcadores	Nº marcadores	Loci Polimórficos		% Polimorfismo	
RAPDs		Goldrich	Valenciano	Goldrich	Valenciano
160 cebadores	1504	42	31	2.8	2.0
AFLPs					
14 Combinaciones	1848	110	77	5.9	4.2

Tabla 5.4.- Número de fragmentos polimórficos obtenidos con marcadores AFLP de acuerdo a la combinación cebador/enzima usada.

Combinación cebador/enzima	Nº de fragmentos detectados	Nº de marcadores polimórficos
EcoRI + AA- Msel + CAA	149	7
EcoRI + AA- Msel + CCC	137	14
EcoRI + AA- Msel + CAC	167	8
EcoRI + AA- Msel + CCA	143	20
EcoRI + AA- Msel + CTT	127	14
EcoRI + AC- Msel + CAA	165	15
EcoRI + AC- Msel + CTG	106	9
EcoRI + AC- Msel + CCC	87	9
EcoRI + AC- Msel + CAG	119	4
EcoRI + AC- Msel + CCA	121	5
EcoRI + AC- Msel+ CTT	90	5
EcoRI + AG- Msel + CAA	177	13
EcoRI + AG- Msel + CCA	73	7
EcoRI + AG- Msel + CTT	181	17
Total	1848	147
Media	132	10.5

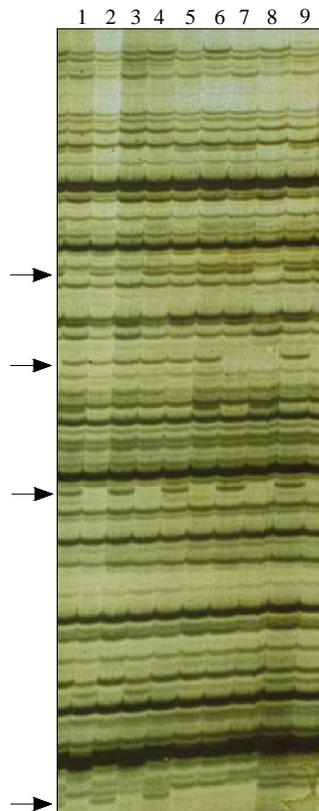
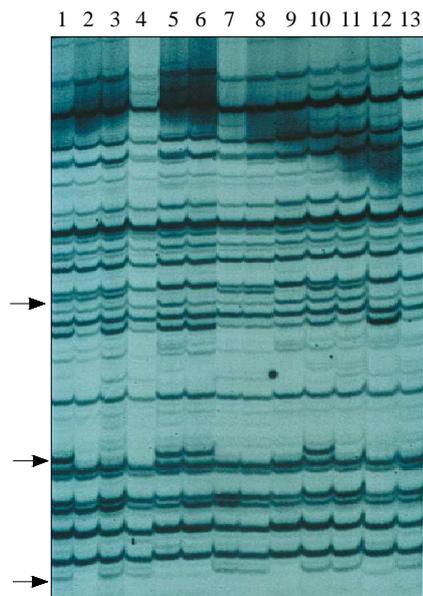


FIGURA 5.5.- Amplificación de fragmentos AFLP para la población segregante Goldrich x Valenciano 1. Esta amplificación corresponde a la combinación cebador/enzima EcoRI AA/Msel CTT. Algunos de los fragmentos polimórficos obtenidos están señalados con flechas. El polimorfismo obtenido por esta técnica fue muy superior al de RAPD. Se obtuvo una media de 10,5 fragmentos polimórficos por combinación cebador/enzima.

FIGURA 5.6.- Fragmentos de AFLP correspondientes a la combinación cebador/enzima EcoRI AA/Msel CCA., El cebador de EcoRI AA, combinado con cualquiera de los cebadores de tres nucleótidos específicos de Msel, dio en general amplificaciones de gran resolución y un mayor número de fragmentos polimórficos : Una media de 12,6 fragmentos polimórficos frente a 12,3 correspondiente a EcoRI AG y 7,8 correspondiente a EcoRI AC.



5.4.2.- **Elaboración del mapa.**

Sólo los marcadores que daban lugar a segregación mendeliana fueron inicialmente utilizados para la construcción del mapa. Los grupos de ligamiento se mantuvieron estables en un rango de LOD entre 4.0 y 6.0. A LOD menor que 4.0 se producía la aglomeración de los grupos de ligamiento, mientras que incrementando el LOD por encima de 6.0 se producía la fragmentación de los grupos. El albaricoquero es una especie diploide $2n = 16$, por lo tanto tiene $n = 8$ cromosomas, de aquí que se espera obtener un total de 8 grupos de ligamiento para cada mapa. A LOD 5.0 el parental femenino Goldrich tenía un total de 64 marcadores agrupados en 8 grupos de ligamiento, lo cual se ajusta a lo esperado. Sin embargo Valenciano tenía 30 marcadores agrupados en 9 grupos de ligamiento. Once marcadores heterocigotos para Goldrich y 5 marcadores heterocigotos para Valenciano no pudieron ser incluidos en el mapa a LOD 5.0, con lo que fueron considerados como marcadores accesorios y se colocaron posteriormente en el mapa a un LOD más bajo (LOD 3.0). Los marcadores que presentaban desviaciones con respecto a la segregación esperada fueron añadidos posteriormente determinando su posición más probable, ajustándose al orden ya establecido. Tres de estos marcadores fueron incluidos en el mapa de Goldrich y 4 de ellos se situaron en el mapa de Valenciano. Diecisiete marcadores heterocigotos en Goldrich y 12 marcadores heterocigotos en Valenciano no se pudieron incluir en ningún grupo de ligamiento y se mantuvieron como no ligados. Los mapas obtenidos pueden verse en las **Figuras 5.7 y 5.8**.

5.4.3.- **Comparación entre mapas.**

Los marcadores heterocigotos para ambos padres se consideran menos informativos y fueron introducidos posteriormente en el mapa con la finalidad de establecer homologías. Treinta y ocho marcadores con segregación 3:1 fueron incluidos inicialmente en el análisis, utilizando el programa Joinmap. A cada uno de los grupos de ligamiento ya obtenidos se les añadieron estos 38 marcadores, para determinar a qué grupo de ligamiento pertenecían. Aquellos marcadores con segregación 3:1, que

aparecían ligados a varios grupos, eran estudiados utilizando el LINKEM (Vowden y col., 1995). La asignación de estos marcadores a un grupo de ligamiento u otro se realizó atendiendo a la frecuencia de recombinación y al LOD con respecto al resto de los marcadores del grupo. De estos 38 marcadores, 26 se incluyeron en el mapa de Goldrich y 12 se incluyeron en el mapa de Valenciano. Once de estos marcadores establecieron homologías, relacionando a 5 grupos de ligamiento de ambos mapas (**Fig 5.9**). Hasta 3 marcadores por grupo de ligamiento establecieron homologías entre mapas, observándose sólo en un caso cruzamientos entre marcadores. La introducción de este tipo de marcadores en el mapa no altera la distribución y el orden de los marcadores en los grupos de ligamiento establecidos previamente. Se detectaron 18 marcadores cuya segregación se alejaba de la segregación mendeliana 3:1 esperada. Estos marcadores se incluyeron también en los mapas, y pese a su mala segregación muchos de ellos se posicionaron en grupos de ligamiento: en 7 grupos de Goldrich y en 4 grupos de Valenciano. Solamente 3 de ellos no se ligaron a ningún grupo en Goldrich y 9 permanecieron no ligados en Valenciano. Al igual que los marcadores que cumplían la segregación 3:1, el incluir estos marcadores en el mapa no produjo ninguna alteración en los resultados, ni contradecía el orden previamente establecido.

5.4.4.- Longitud y densidad del mapa.

Se situaron un total de 115 marcadores en el mapa de Goldrich, los cuales definían un distancia total de mapa de 569.2 cM. La distancia media entre marcadores fue de 4.9 cM. Sólo un intervalo fue superior a 25 cM. De entre los 8 grupos de ligamiento del mapa de Goldrich, 6 fueron considerados como "mayores". Los otros dos grupos de ligamiento contenían 4 y 5 marcadores respectivamente, con una distancia de entre 6.0 a 40.2 cM. El mapa de Goldrich contenía casi 2 veces el número de marcadores presente en Valenciano. El mapa de Valenciano contenía 64 marcadores que daban una longitud de mapa de 448.3 cM, con un intervalo entre marcadores de 6.6 cM. Sólo un intervalo fue mayor de 30 cM. El mapa de Valenciano estaba formado por 4 grupos "mayores" que contenían de 6 a 22 marcadores, dando una longitud de mapa de 56.3 a 117.3 cM. Los otros 5 grupos de ligamiento contenían de 2 a 5 marcadores,

dando una longitud comprendida entre 8.4 a 41.3 cM. Se realizó la estima de la distancia total del genoma para ambos mapas, utilizando el método de Hulbert y col. (1988). Se estimó el tamaño total del genoma para el parental femenino, Golrich, en 811 cM, y para el parental masculino, Valenciano, en 840 cM.

5.4.5.- Herencia del carácter resistencia a Sharka.

El carácter resistencia a Sharka fue procesado conjuntamente con el resto de los marcadores para determinar su posición en el mapa. De los 80 híbridos estudiados, 39 resultaron susceptibles a PPV ya en el primer ciclo: presencia de síntomas y del virus en las hojas de albaricoquero. Estas plantas no fueron sometidas a un segundo ciclo. Estos resultados se ajustaban a una segregación 1:1 del carácter. Con estos datos se realizó el análisis del carácter y se introdujo en el mapa. El carácter se situó en el sexto grupo de ligamiento del mapa correspondiente al parental resistente Goldrich (LOD = 3). El marcador más cercano al carácter fue M19-750, situado a una distancia de 8.9 cM. Sólo se encontró un marcador que definía a las variedades Stark Early Orange, Goldrich y Henderson, todas ellas resistentes al virus de la Sharka, y que tenía un equivalente en el mapa. Se trataba del marcador AG-CTT16, situado en el grupo de ligamiento 6 de Goldrich a una distancia 37.8 cM (LOD = 3.02, $r = 0.29$)(**Tablas 5.1 y 5.5**).

Tabla 5.5.- Valores de segregación de los marcadores más probablemente asociados al carácter resistencia a Sharka en la primera aproximación a la herencia del carácter.

Locus	Segregación esperada	Frecuencias observadas	Ligamiento a resistencia a Sharka			
			χ^2	r	LOD-Score	Distancia mapa cM
M19-750	3:1	54P/25A	1.86	0.43	0.13	17
V9-1300	1:1	50P/29A	5.58*	0.39	0.8	12.2
AA-CTT7	1:1	38P/37A	0.01	0.29	2.87	47.6
AG-CTT16	1:1	35P/41A	0.47	0.29	3.02	40.6
AG-CTT6	1:1	36P/38A	0.05	0.26	3.97	41.3

* Marcadores con segregación distorsionada.
P: Presencia de banda. A: Ausencia de banda.

La posición en el mapa de esta primera aproximación a la herencia del carácter puede verse en la **Figura 5.10**.

De los 41 híbridos que no mostraron síntomas ni presencia del virus por ELISA durante el primer ciclo, 20 fueron positivos por síntomas y por ELISA en el segundo ciclo. Esto confirma la necesidad de estudiar las plantas durante dos ciclos sucesivos para determinar la resistencia a PPV. Finalmente, otros 21 híbridos no mostraron síntomas ni presencia del virus en las hojas después de haber sido sometidas a estos dos ciclos, ni siquiera por el método RT-PCR, que es el método más sensible de los que se dispone en la actualidad (Moustafa, 1999). En resumen, se obtuvieron 59 híbridos susceptibles frente a 21 híbridos resistentes al virus. Esta segregación corresponde a una herencia determinada por 2 genes dominantes independientes. Goldrich sería heterocigoto para ambos y Valenciano homocigoto recesivo.

MAPA GOLDRICH

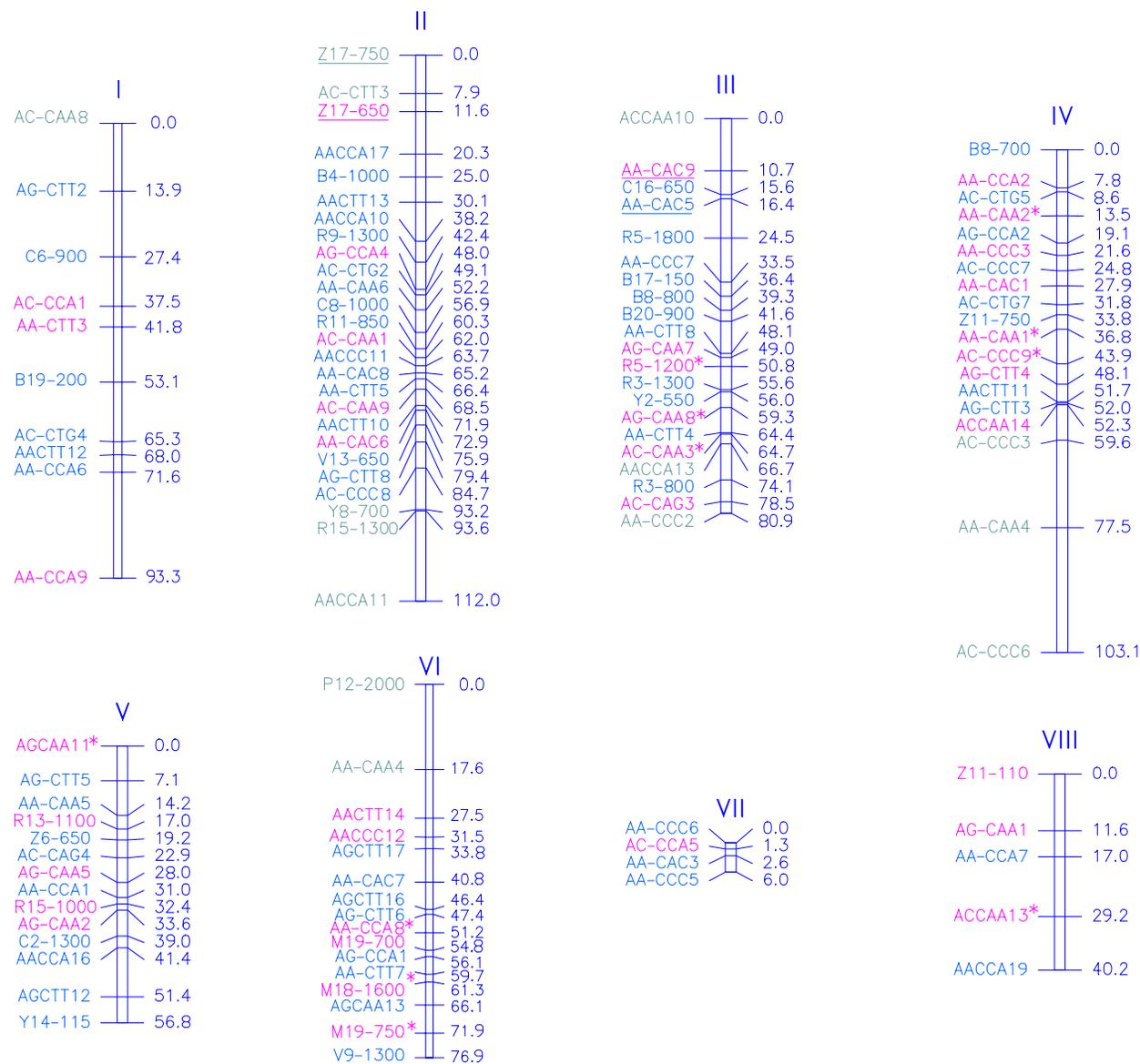


Figura 5.7

MAPA VALENCIANO

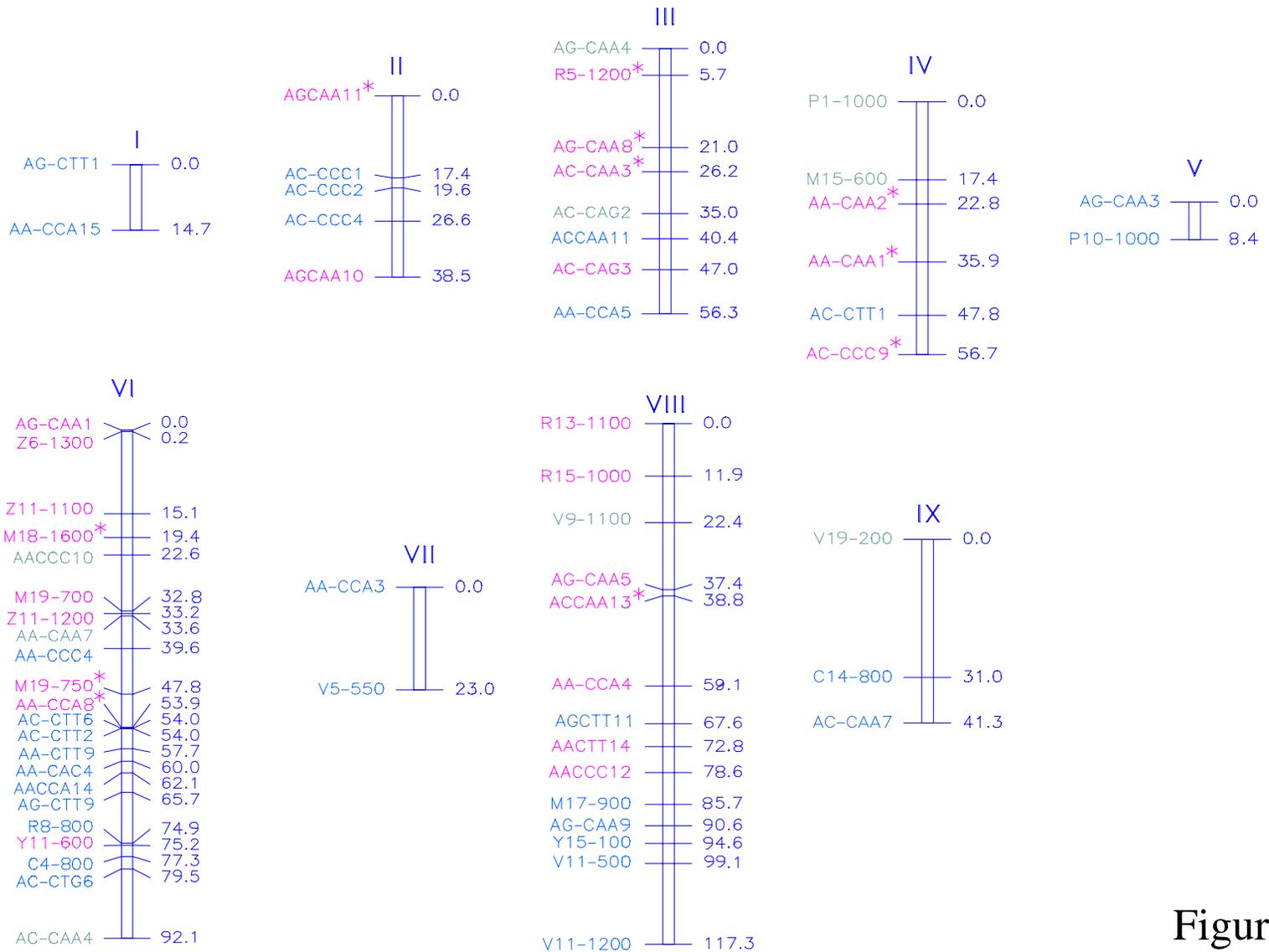


Figura 5.8

COMPARACIÓN ENTRE MAPAS

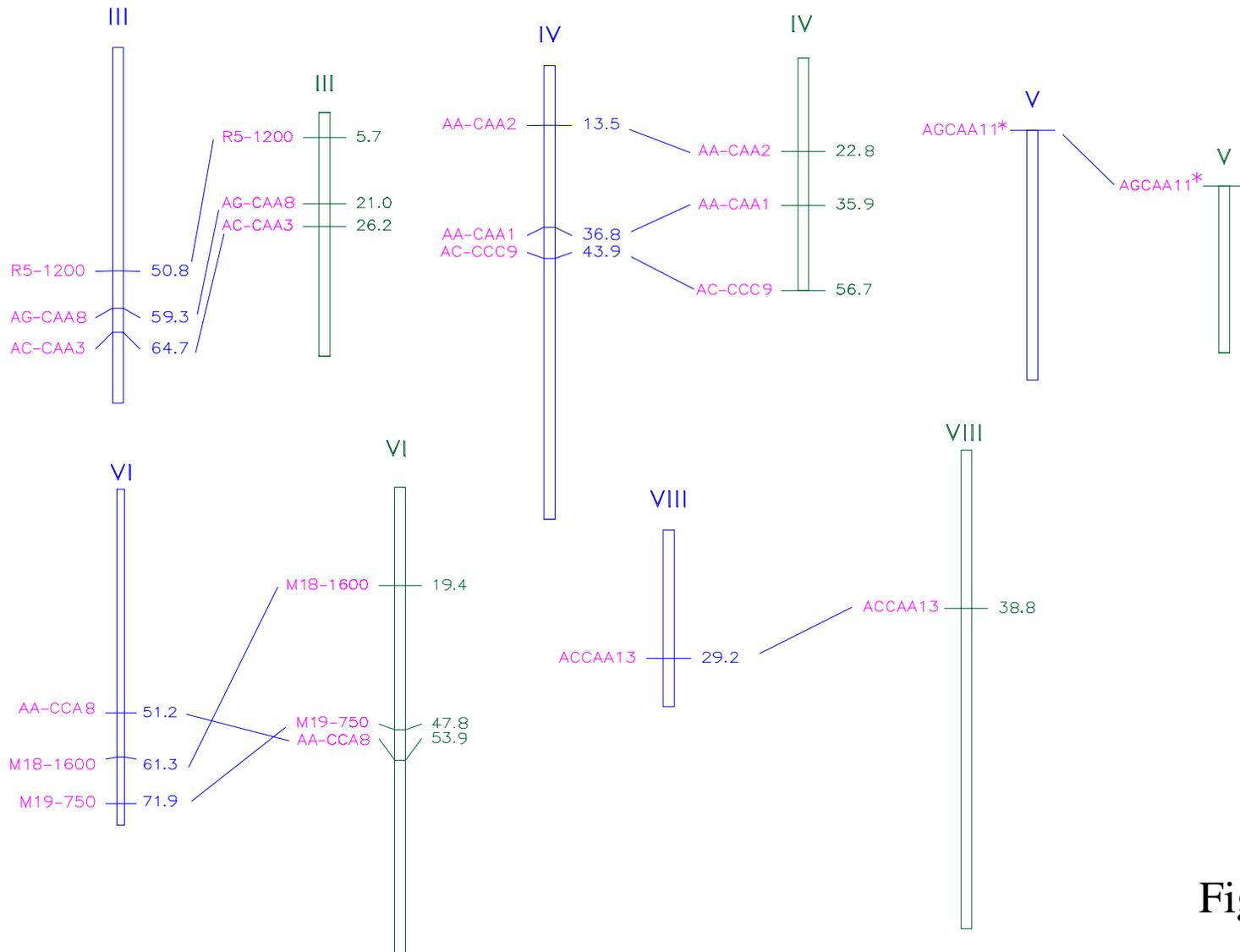


Figura 5.9

POSICIÓN DEL CARÁCTER RESISTENCIA A SHARKA

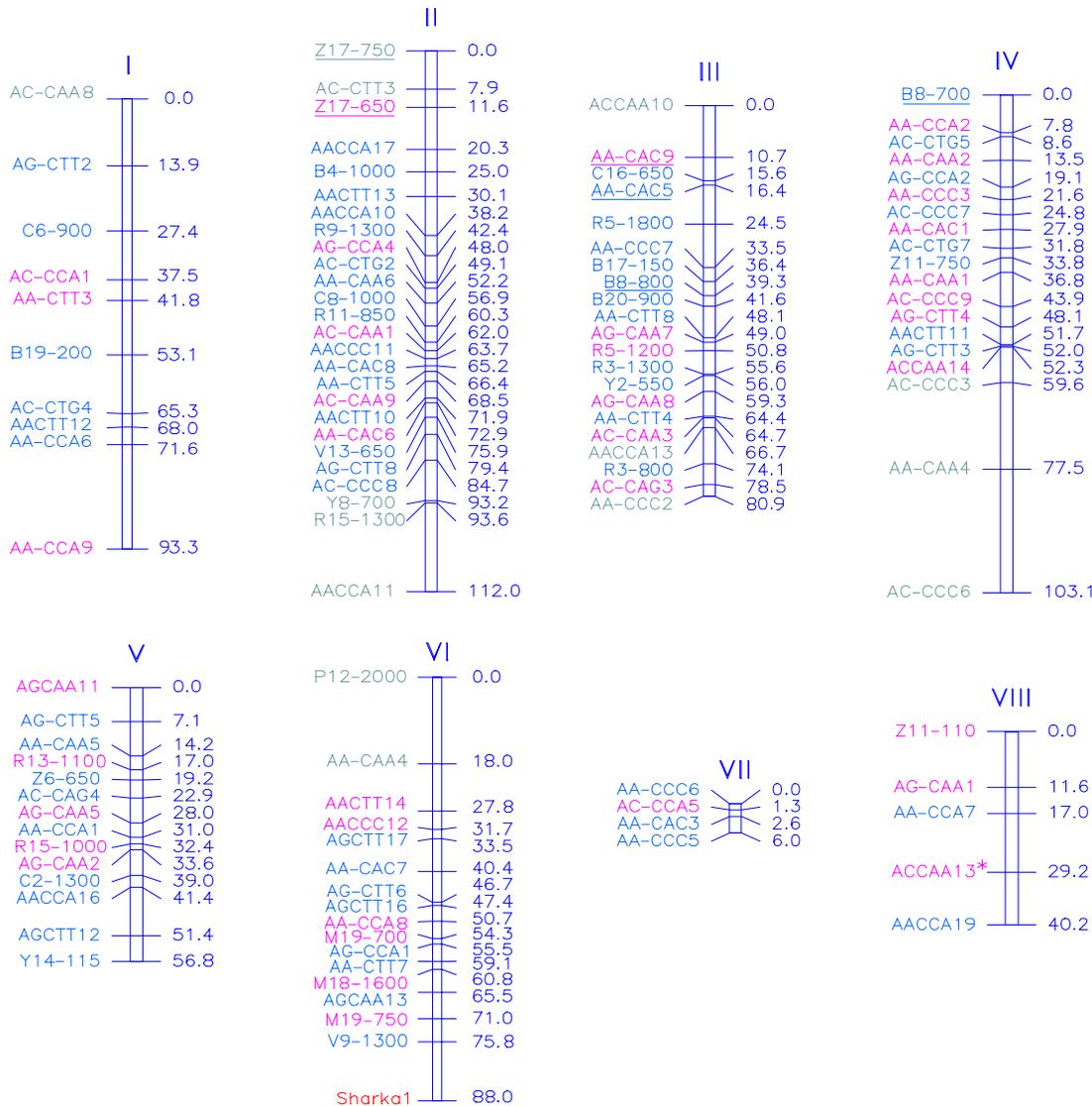


Figura 5.10

5.5.- DISCUSIÓN.

5.5.1.- Polimorfismo.

5.5.1.1.- RAPDs

De los cebadores probados, una media del 27.5% dieron lugar a fragmentos polimórficos. Se encontraron un total de 67 marcadores polimórficos. Tal y como se esperaba, el polimorfismo obtenido en albaricoquero fue mayor al del melocotonero. Dielewanger y col. (1998) y Chaparro y col. (1994) obtuvieron el 17% y el 16% respectivamente. En todos los casos la media de marcadores obtenidos por cebador fue 1.5, similar a la obtenida en el presente estudio. El albaricoquero es más heterocigoto que el melocotonero, pero si utilizamos poblaciones formadas a partir de cruces entre cultivares europeos muy relacionados entre sí, el polimorfismo obtenido es similar al del melocotonero. En el otro extremo, se encuentran las especies forestales perennes, que se caracterizan por su elevada heterocigosidad. En estas especies se ha obtenido una alta eficiencia con esta técnica. Grattapalia y Sederoff, (1994) obtuvieron un 64.9 % de polimorfismo y una media de 3.69 marcadores polimórficos por cebador en una familia obtenida a partir de un cruce interespecífico en el género *Eucalyptus*. Esto acentúa la importancia que adquiere la correcta selección de las familias a la hora de abordar este tipo de estudios.

5.5.1.2.- AFLPs

Se obtuvo un promedio de 132 bandas por combinación cebador/enzima y 10.5 marcadores polimórficos por combinación. Han sido obtenidos valores similares en *Asparagus officinalis* por Spade y col., (1998). Sin embargo, el nivel de polimorfismo obtenido con este tipo de marcadores en melocotonero fue menor. Dielewanger y col., (1998) probaron 18 combinaciones de cebador/enzima y obtuvieron una media de 6.1 marcadores por combinación. En *Eucalyptus* se obtuvo un grado de polimorfismo mayor (39%) en un cruce interespecífico (Marques y col., 1998), así como también éste fue

superior en *Pinus tadea* L. (24.8%) (Remington y col., 1999). Estos resultados indican que los AFLPs son marcadores altamente informativos y muy eficientes para su utilización en la elaboración de mapas genómicos, incluso si la especie tiene un elevado número de genes en homocigosis. En la especie albaricoquero el polimorfismo obtenido fue muy alto, lo que indica que se trata de una técnica muy adecuada para el análisis de familias procedentes de cruzamientos controlados en las que los padres son altamente heterocigotos. Combinando los AFLPs con los cruzamientos controlados se pueden obtener progresos muy importantes en la elaboración de mapas genómicos y, en consecuencia, en la mejora genética de especies leñosas en general y de los frutales en particular.

El uso de marcadores RAPD y AFLP es una estrategia general para la construcción de mapas genómicos, sobre todo si se parte de especies de las que se tiene poca información previa a nivel genético. Su eficiencia es directamente proporcional al nivel de heterocigosidad de las especies en estudio. Ésta depende del sistema de reproducción de la especie y de las diferencias genéticas de los individuos que son cruzados. En albaricoquero ambos sistemas de marcadores han resultado adecuados para la realización del mapa.

5.5.2.- **Heterocigosidad.**

En Goldrich se han obtenido 1.6 veces más marcadores que en Valenciano utilizando los marcadores tipo RAPDs, mientras que en AFLPs esta relación corresponde al doble de marcadores obtenidos en Goldrich con respecto a Valenciano (**Tabla 5.4**). Estos resultados están en consonancia con el origen de las variedades y biología floral. La variedad Goldrich es autoincompatible y pertenece al grupo norteamericano, el cual de acuerdo con Byrne y Littleton (1989) podría haberse originado a partir de la hibridación de cultivares procedentes de Asia y Europa, y por lo tanto, pertenece al grupo más diverso genéticamente. Valenciano es una variedad autocompatible perteneciente al grupo Europeo, el cual es el de menor diversidad genética dentro de la especie albaricoquero. Estas diferencias en la heterocigosidad

presente en estos dos cultivares ya fueron encontradas en estudios previos con la utilización de isoenzimas (Badenes y col., 1996), así como en los resultados obtenidos en el capítulo dedicado a la diversidad en la presente tesis. Aproximadamente el 50% de los marcadores AFLPs obtenidos en los estudios de diversidad distinguían al cultivar Goldrich de las variedades valencianas.

5.5.3.- Marcadores con segregación distorsionada.

La proporción de marcadores con segregación distorsionada fue de 6 loci en RAPDs (9%). Este resultado es similar al obtenido por Verhaegen y Plomion (1996) y Byrne y col. (1995) en *Eucalyptus*, pero menor al obtenidos por Chaparro y col. (1994) en melocotonero. En AFLPs se encontraron un 18% de estos marcadores, valor que es superior al obtenido en *Eucalyptus* (15%) por Marques y col. (1998), pero inferior al obtenido por Kuang y col. (1999) en *Pinus* (34%). En almendro (Viruel y col. 1995) obtuvieron un 16% de estos marcadores en un mapa basado en marcadores tipo RFLPs. En cruces interespecíficos entre almendro y melocotonero Joobeur y col. 1998 encontraron una gran proporción de estos marcadores (46%). Foolad y col., (1995) obtuvieron resultados parecidos (37%) en un cruce similar. De acuerdo con estos autores, en este tipo de cruces interespecíficos se producen durante la meiosis traslocaciones y deleciones debidas a la deficiente alineación entre cromosomas, a causa de tratarse de especies diferentes. Esto puede explicar las alteraciones observadas en la segregación. Sólo tres loci heterocigotos para Goldrich presentes en el mapa muestran distorsión en la segregación, mientras que en Valenciano nos encontramos con 2 loci. El resto de los loci con segregación distorsionada incluidos en el mapa corresponden a marcadores heterocigotos para ambos padres, cuya segregación esperada era 3:1. La presencia de genes letales o las reestructuraciones en los cromosomas que tienen lugar de generación en generación pueden llevar a la alteración de la segregación de los marcadores (Causse y col., 1994). Las bandas polimórficas que no se ajustan a la segregación mendeliana esperada pueden ser útiles incluso si no existe una exacta correspondencia entre la herencia observada y la esperada (Marques y col., 1998). Sin embargo en el caso de los marcadores basados en la PCR, este tipo de

marcadores puede ser debido a fallos en la lectura de los marcadores, ya que dos bandas de similar tamaño procedentes de loci diferentes pueden ser indistinguibles en un gel.

5.5.4.- Grupos de ligamiento.

A partir de 115 loci heterocigotos para Goldrich se obtuvieron 8 grupos de ligamiento, mientras que en Valenciano 64 loci heterocigotos dieron lugar a 9 grupos de ligamiento. Se establecieron homologías entre 5 de los grupos de ligamiento de ambos parentales (**Fig 5.9**). Estos resultados sugieren que los 8 grupos encontrados en Goldrich corresponden a los 8 cromosomas de la dotación haploide de *Prunus armeniaca*. Son necesarios un mayor número de marcadores en Valenciano para conseguir que los 9 grupos de ligamiento encontrados se reduzcan a 8.

La distribución de los marcadores a lo largo del mapa no fue uniforme, obteniéndose zonas con agrupamientos débiles entre loci y zonas de baja densidad de marcadores. Esto también ha sido observado en otras especies y en otros sistemas de marcadores (Viruel y col., 1995; Foolad y col., 1995; Marques y col., 1998; Boivin y col., 1999). La proporción de marcadores no ligados fue similar a la encontrada por Lu y col. (1998) y menor a la encontrada por Eujayl y col. (1998).

La estima de la distancia obtenida en mapas de otras especies de *Prunus* fue la siguiente: almendro 393 cM (Viruel y col., 1995); melocotonero 396 cM (Chaparro y col., 1994); melocotonero x almendro 491 cM (Joobeur y col., 1998). La construcción de forma independiente de un mapa para el parental femenino y para el parental masculino en albaricoquero dio como resultado una longitud de 570 cM y 448 cM respectivamente. De acuerdo con la estima del tamaño total del genoma, el mapa obtenido para el parental femenino Goldrich cubre un 70% del genoma mientras que el mapa del parental masculino Valenciano cubre el 53%.

5.5.5.- Comparación entre mapas.

Se establecieron homologías entre grupos de ligamiento de ambos mapas utilizando los marcadores con segregación 3:1. De los 38 marcadores que presentaban la segregación mendeliana esperada 3:1, 11 marcadores establecieron homologías entre 5 grupos de ligamiento de Goldrich y de Valenciano. Se observaron homologías en las cuales llegan a haber hasta 3 marcadores. El orden de los marcadores que sirven de puente fue idéntico en ambos mapas, excepto en uno de los casos (**Fig 5.3**). Para el establecimiento de homologías entre todos los grupos de ligamiento sería necesario obtener un mayor número de marcadores heterocigotos para Valenciano. Para llegar a demostrar la homología entre los grupos definidos en estos dos mapas y los obtenidos en otras especies, sería necesaria la utilización de marcadores tipo RFLPs, ya utilizados en otros mapas del género *Prunus*.

El grupo II de Goldrich es el más grande de los obtenidos en el mapa y podría corresponder al grupo I descrito en *Prunus* (Joobeur y col., 1998). En este género se ha descrito la presencia de un cromosoma con un tamaño correspondiente al doble del resto de los cromosomas. Este hecho puede ser debido a que su tamaño real sea grande o a que exista una alta frecuencia de recombinación.

5.5.6.- Herencia del carácter resistencia a Sharka y su posición en el mapa.

Existen muy pocos datos sobre la segregación del carácter resistencia a Sharka en albaricoquero, a causa de la dificultad de determinar este carácter en una familia con un número suficientemente grande de descendientes y de hacerlo sin errores que induzcan a clasificar como resistente a una planta que no lo sea en realidad. Dosba et al. (1991), estudiando una familia de 76 híbridos del cruzamiento Scream x Stark Early Orange encontraron una proporción próxima a $\frac{3}{4}$ de híbridos susceptibles y $\frac{1}{4}$ de híbridos resistentes, lo que les llevó a proponer una hipótesis de dos genes independientes y dominantes para explicar este tipo de herencia. Martínez-Gómez (1998) analizó el comportamiento frente a PPV de 291 híbridos de albaricoquero

obtenidos de 20 cruzamientos distintos, dentro del programa de mejora genética que se lleva a cabo en el CEBAS de Murcia. El número de híbridos analizados de cada familia oscilaba entre 2 y 50 plantas. Se ensayó una sola repetición de cada híbrido, injertado sobre melocotonero GF-305. Las observaciones se realizaron durante dos ciclos, en el caso de las primeras familias que comenzaron a estudiarse, y un solo ciclo en las familias creadas más recientemente. Los resultados obtenidos se ajustaban a una segregación 1:1 de resistentes/susceptibles, lo que parecía indicar un carácter monogénico dominante para la resistencia a sharka, siendo heterocigóticos para este carácter los genitores resistentes utilizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Moustafa (1999), después del primer ciclo de observaciones, casi la mitad de los híbridos se mostraron como susceptibles y la otra mitad como resistentes, ajustándose a una segregación resistente/susceptible 1:1, como la obtenida por Martínez-Gómez (1998). La herencia del carácter sería debida, por tanto, a un solo gen dominante. Goldrich sería heterocigoto para dicho gen y Valenciano sería homocigoto recesivo. Sin embargo, después del segundo ciclo de observaciones, la mitad aproximadamente de los híbridos que antes se habían mostrado como resistentes aparecieron como susceptibles, ajustándose ahora a una segregación resistente/susceptible 1:3 (21/58). El valor de la Chi cuadrado para este ajuste es de 0,07 que, con un grado de libertad, resulta $p = 0,8$. Estos resultados parecen indicar la existencia de un segundo gen dominante implicado en la resistencia a sharka, de modo que sólo los híbridos heterocigotos para ambos genes serían resistentes.

Un esquema de los genotipos posibles y los fenotipos resultantes puede verse en la **tabla 5.6**. Según este esquema, el segundo gen se manifestaría de forma diferida respecto del primero y la herencia del carácter resistencia a Sharka en albaricoquero confirmaría la hipótesis preliminar de Dosba et al. (1991) de dos genes independientes y dominantes.

Tabla 5.6.- Hipótesis de herencia de la resistencia a Sharka.

	1º CICLO DE FRIO		2º CICLO DE FRIO	
GOLDRICH $R_1 r_1 R_2 r_2$	$\frac{1}{2} R_1 r_1$ RESISTENTE	$\frac{1}{4} R_1 r_1 R_2 r_2$	$\frac{1}{4} R_1 r_1 R_2 r_2$ RESISTENTE	
		$\frac{1}{4} R_1 r_1 r_2 r_2$	$\frac{1}{4} R_1 r_1 r_2 r_2$ SUSCEPTIBLE	
VALENCIANO 1 $r_1 r_1 r_2 r_2$	$\frac{1}{2} r_1 r_1$ SUSCEPTIBLE	$\frac{1}{4} r_1 r_1 R_2 r_2$	$\frac{1}{4} r_1 r_1 R_2 r_2$ SUSCEPTIBLE	
		$\frac{1}{4} r_1 r_1 r_2 r_2$	$\frac{1}{4} r_1 r_1 r_2 r_2$ SUSCEPTIBLE	

Los primeros resultados obtenidos con el carácter resistencia a Sharka fueron incluidos en el mapa. El carácter monogénico de herencia simple se situó en el sexto grupo de ligamiento. Este resultado es importante, ya que, aunque no se haya obtenido un marcador molecular que permita la selección de individuos resistentes, nos indica la posición del mismo en el mapa. Esto servirá de base para los próximos trabajos en albaricoquero, en los que uno de los objetivos será la saturación de esta zona con marcadores, lo que permitirá la obtención de un marcador molecular. Un marcador para este gen posibilitará, en el proceso de selección, la eliminación del 50% de los individuos procedentes de un cruce de estas características, lo que supondrá el aumento en la eficiencia de la mejora para resistencia a Sharka.

En trabajos previos, los marcadores moleculares han demostrado ser efectivos en la superación de las limitaciones y desventajas de los métodos tradicionales de mejora genética utilizados en frutales. En el presente trabajo se ha elaborado el primer mapa genómico de la especie albaricoquero. Este mapa permitirá situar en el futuro los distintos caracteres agronómicos para los que segrega esta familia, abriendo la posibilidad de la aplicación de la mejora asistida por marcadores moleculares en la especie albaricoquero.

5.6.- CONCLUSIONES.

- Se ha elaborado el primer mapa genómico para la especie albaricoquero, obteniéndose un número de grupos de ligamiento que se ajusta a la dotación cromosómica de la especie. El presente mapa favorecerá el desarrollo de la mejora asistida por marcadores moleculares en la especie albaricoquero, sirviendo de apoyo a los mejoradores.
- Los mapas de albaricoquero obtenidos para la familia procedente del cruce Goldrich x Valenciano cubren un 70% del genoma del parental femenino (Goldrich) y un 53% del genoma del parental masculino (Valenciano).
- Es necesaria la saturación de los mapas obtenidos con un mayor número de marcadores, para facilitar la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés y conseguir en Valenciano una reducción de los 9 grupos de ligamiento encontrados a los 8 grupos correspondientes a la dotación cromosómica de la especie.
- Ha sido determinada la herencia de carácter resistencia Sharka. El carácter monogénico de herencia simple, resultante de la primera determinación de la resistencia, se situó en el sexto grupo de ligamiento. Este es el primer paso para la saturación del genoma en esta zona, lo que permitirá en un futuro la selección precoz de plántulas resistentes por medio de marcadores moleculares.

***6.- BÚSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A LA
ANDROESTERILIDAD Y LA AUTOCOMPATIBILIDAD EN
ALBARICOQUERO***

6.1.- INTRODUCCIÓN.

La mejora genética convencional se basa en el cruce controlado de genotipos seleccionados. El manejo de estos cruces requiere el conocimiento de la biología floral de la especie. La autoincompatibilidad y la androesterilidad son dos caracteres relacionados con la biología de la flor, que pueden representar una limitación en los programas de mejora genética. La mayoría de las variedades resistentes al virus de la Sharka son autoincompatibles. Su utilización en los programas de mejora genética para la introducción de resistencia al virus también introduce en las variedades europeas un carácter no deseado como es la autoincompatibilidad. Dado el hecho de que la obtención de resistencia a Sharka es uno de los principales objetivos en los programas de mejora genética desarrollados en los países mediterráneos, y la determinación de la autocompatibilidad es un método muy laborioso, la obtención de marcadores moleculares ligados al alelo de autocompatibilidad sería de gran utilidad en la mejora del albaricoquero.

La incompatibilidad en albaricoquero es gametofítica, de modo que el carácter se encuentra controlado por un gen (S) que se caracteriza por poseer varios alelos. Los alelos de la autocompatibilidad permiten a los tubos polínicos crecer en cualquier estilo y alcanzar los óvulos. Los alelos de autoincompatibilidad evitan el crecimiento del tubo polínico si el alelo correspondiente al grano de polen coincide con el alelo del pistilo (Burgos y col., 1997; Mc Cornick, 1998; Newbiggin y col., 1993). La determinación del genotipo requiere controlar la polinización y observar el crecimiento de los tubos polínicos en el estilo (Ballester y col., 1998). Recientemente, con la identificación de las RNAsas relacionadas con los alelos S en las especies de *Prunus*, se ha abierto una nueva posibilidad para la determinación de los fenotipos (Boskovic y Tobutt, 1996; Boskovic y col., 1997; Tao y col., 1997; Burgos y col., 1998). Sin embargo la obtención de las proteínas RNAsas y su separación por electroforesis (Sassa y col., 1992) requiere árboles adultos.

La androesterilidad es un carácter que parece estar controlado por un gen simple recesivo (Burgos y Ledbetter, 1994). Las anteras que presentan androesterilidad pueden ser distinguidas visualmente de las anteras normales durante el período de floración. Anteras deshidratadas y sin color indican androesterilidad, apreciándose un gran contraste con las anteras normales, turgentes y de color amarillo. De este modo la determinación del fenotipo se realiza simplemente por medio de la observación de las anteras, con el inconveniente de que para ello es necesario que el árbol sea adulto. El cruce de dos árboles androfértiles que contengan el alelo recesivo de androesterilidad lleva a obtener un 25% de individuos androestériles en la descendencia, lo que convierte este carácter en un factor limitante importante en la eficiencia de los programas de mejora genética. La posibilidad de distinguir y aislar individuos androestériles en el período de plántula supondría un incremento en la eficiencia de los programas de mejora, facilitando considerablemente el trabajo del mejorador. La selección de individuos con un genotipo adecuado podría conducir a cruzamientos en los que se disminuyera la proporción de individuos androestériles en la descendencia. Esto resulta igualmente válido para el caso de la autocompatibilidad.

Para la autocompatibilidad la existencia de marcadores moleculares parcialmente ligados al gen *Sc* permitiría la determinación de fenotipos en estados muy tempranos del desarrollo de la plántula, ahorrando así mucho tiempo y espacio. La clonación y la secuenciación de algunas regiones de los alelos de autoincompatibilidad fue realizada en manzano por Broothaerts y col. (1995). Estas secuencias permitieron la determinación del fenotipo de plántulas derivadas de cruzamientos en los que se conocía la dotación alélica de los padres. En avellano (Pomper y col., 1998), se identificaron 2 marcadores tipo RAPD específicos para alelos *S*. La localización del gen de autoincompatibilidad en un mapa genómico de almendro fue realizada por Ballester y col. (1998), pero no existe todavía ningún marcador ligado a él. Recientemente han sido desarrollados otros estudios en *Prunus*. El albaricoquero sin embargo es, desde el punto de vista molecular y genético, la especie menos conocida dentro de este género. Existe muy poca información disponible sobre marcadores moleculares ligados a caracteres de interés en esta especie. Sería muy útil para los mejoradores el aumento de

los conocimientos genéticos de esta especie, así como la obtención de marcadores moleculares ligados a estos genes.

Los marcadores tipo RAPD (Williams y col., 1990) combinados con Bulk Segregant Analysis (BSA) (Michelmore y col., 1991) han sido usados para la búsqueda de marcadores ligados a caracteres en manzano (Yang y Kruger, 1994; Yang y col., 1997), melocotonero (Chaparro y col., 1994; Warburton y col., 1996) y avellano (Pomper y col., 1998). El valor de un marcador genético depende de lo fuertemente unidos que estén el marcador y el carácter. En el presente estudio, aprovechando los datos de segregación para los caracteres autocompatibilidad y androesterilidad de una familia de un cruce intraespecífico de albaricoquero (Gitano x Pepito Rubio), procedente del programa de mejora del Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia), se han utilizado los marcadores tipo RAPD asociados a BSA con la finalidad de encontrar marcadores ligados a estos loci. Los BSA son particularmente útiles con marcadores tipo RAPD, ya que permiten probar muchos cebadores para encontrar, de manera muy eficiente, polimorfismo entre pares de muestras formadas por una mezcla de ADN de individuos que se diferencian en un sólo carácter. La técnica de los RAPDs fue escogida porque se puede incorporar con facilidad a los programas de mejora genética sin necesidad de la asistencia de un laboratorio de biología molecular. Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas (Hallden y col., 1996). En el presente estudio la eficiencia de los BSA ha sido comparada con los ensayos de selección directa de cebadores tipo RAPD.

6.2.- OBJETIVOS.

Los objetivos que se propusieron para el presente capítulo fueron:

- La obtención de marcadores moleculares asociados a los caracteres autocompatibilidad y androesterilidad en la familia segregante Gitano x Pepito del Rubio, para su aplicación a la mejora asistida por marcadores moleculares (MAS) en albaricoquero.
- Estudio de la eficiencia de la técnica BSA (Bulk Segregant Analysis) combinada con los marcadores tipo RAPD para la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés y su comparación con la selección directa de cebadores.

6.3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

6.3.1.- **Material vegetal.**

El material vegetal estaba formado por 122 individuos (Anejo 6) descendientes del cruce Gitano x Pepito del Rubio perteneciente al programa de mejora genética desarrollado por el Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia). Este cruce segrega para los caracteres autocompatibilidad y androesterilidad. La variedad Gitano es una variedad autoincompatible mientras que Pepito del Rubio es autocompatible. Ambas variedades son heterocigotas para el carácter androesterilidad.

6.3.2.- **Determinación de la Androesterilidad.**

La androesterilidad puede ser directamente determinada con la observación de las anteras durante la floración. Varias muestras de anteras con las características observadas para androesterilidad fueron escogidas al azar, deshidratadas y su polen fue examinado. En todos los casos en que las anteras presentaban los tipos de deformación

descritos, éstas eran incapaces de producir polen.

6.3.3.- Determinación de la Autocompatibilidad.

La recolección de las muestras de flores, la preparación de los pistilos y el polen, y las polinizaciones controladas fueron llevadas a cabo por el equipo del Departamento de Mejora y Patología Vegetal del CEBAS-CSIC (Murcia). La metodología seguida para la preparación de los pistilos y la observación al microscopio del crecimiento del polen en el estilo fue descrita por Burgos y col. (1993); Ballester y col. (1998). La determinación de las ribonucleasas estilares (Burgos y col., 1998) permitió el conocimiento del genotipo de los parentales correspondientes a esta familia y parte de la progenie obtenida del cruce. Gitano fue $S_{5_}$ y Pepito del Rubio fue ScS_2 .

6.3.4.- BSA (Bulk Segregant Analysis).

Se utilizaron 228 cebadores (Operon Technologies, Alameda, California) pertenecientes a las series B, C, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, Y, Z, AQ y AR. Se utilizaron dos metodologías. Una de ellas fue el BSA (Bulk Segregant Analysis) descrito por Michelmore y col., (1991). Fueron estudiadas 4 muestras correspondientes a: androesterilidad, androfertilidad, autocompatibilidad y autoincompatibilidad. Cada muestra contenía el ADN en cantidades iguales correspondiente a 10 individuos que compartían un determinado carácter. Se realizó una mezcla con el ADN correspondiente a 10 individuos que contenían el alelo Sc y el alelo S_5 , siendo por tanto todos los individuos autocompatibles. También se mezcló el ADN correspondiente a 10 individuos autoincompatibles, los cuales contenían los alelos S_2 y S_5 . Se tenía conocimiento del carácter autocompatibilidad en la descendencia, con lo que se pudo realizar el análisis de la segregación por medio de marcadores RAPDs para los alelos Sc , S_2 y S_5 .

Las 4 muestras fueron probadas con los 228 cebadores. El polimorfismo

observado, que permitía distinguir entre las 4 muestras, fue posteriormente probado en 20 individuos de los cuales se conocía su dotación genética, no coincidentes con los individuos utilizados en las mezclas de ADN. Los marcadores que mostraron ligamiento con alguno de los caracteres en estudio en los 20 individuos, fueron probados con el resto de la población hasta un total de 80 individuos.

6.3.5.- Análisis por selección directa de cebadores.

Se realizó un segundo análisis basado en la selección directa de cebadores polimórficos a partir de una muestra de la población segregante formada por los dos parentales y 6 individuos de la población (Grattapalia y Sederoff, 1994). La selección de los candidatos a marcadores se basó en el tipo de segregación obtenida. Sólo se seleccionaban aquellos cebadores que daban lugar al tipo de segregación que se ajustaba a la esperada para el carácter estudiado. Se utilizaron 160 cebadores (Operon Technologies, Alameda, Calif.) de las series B, C, M, P, R, V, Y y Z. Ambos padres son heterocigotos para el gen androesterilidad, de modo que las bandas presentes en ambos padres con segregación 3:1 fueron consideradas como precandidatos a marcadores del gen androfertilidad (en fase de acoplamiento). Las bandas ausentes en ambos padres con segregación 3:1 fueron consideradas como precandidatos al gen de androesterilidad (en fase de repulsión). El genotipo del parental autocompatible Pepito del Rubio es ScS_2 , mientras que el parental autoincompatible, Gitano, es S_5_- (Burgos y col., 1998). Las bandas presentes en Pepito del Rubio y ausentes en Gitano, que daban lugar a una segregación 1:1, fueron consideradas como precandidatas a marcadores para el gen de autocompatibilidad (Sc o S_2). Las bandas presentes en Gitano y ausentes en Pepito del Rubio, que daban segregación 1:1, fueron consideradas como marcadores para el alelo S_5 . Los candidatos a marcadores seleccionados fueron probados en 80 individuos de la población para el estudio de ligamiento. Los datos fueron recodificados para observar un posible ligamiento en fase de repulsión. Los valores de ligamiento fueron obtenidos usando el programa LINKEM (Vowden y col., 1995).

6.4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.4.1.- BSA (Bulk Segregant Analysis).

BSA se basa en la elaboración de muestras que contienen una mezcla equilibrada de ADN procedente de individuos que comparten un carácter de interés. En nuestro caso se establecieron 4 mezclas con ADN procedente de individuos obtenidos de una población segregante para 2 caracteres: la autocompatibilidad y la androesterilidad. Se estudiaron individuos autocompatibles frente a individuos autoincompatibles e individuos autofértiles frente a individuos androestériles. Partimos de individuos altamente heterocigotos. Al establecer mezclas de ADN con un número suficiente de individuos, se establece una mezcla equilibrada de genotipos, de modo que el único polimorfismo observado corresponderá con una probabilidad muy alta al marcador ligado al carácter. Las diferencias entre genotipos que no correspondan al carácter en estudio se observarán en bandas que sólo diferirán en su intensidad (Michelmore y col., 1991).

En el presente estudio, 10 cebadores de entre los 228 probados dieron 12 bandas que diferían entre mezclas (**Tabla 6.1**). Estos cebadores fueron ensayados de manera independiente con los 20 individuos cuyo genotipo estaba previamente determinado, con la finalidad de estudiar el ligamiento del marcador al carácter. Se obtuvieron 2 marcadores ligados al carácter androfertilidad (M4-950 y M17-1000), 1 marcador ligado a autocompatibilidad (P12-1500) y otro ligado a autoincompatibilidad (C17-1200). El ligamiento fue estudiado para toda la población, formada por 80 individuos no coincidentes con las mezclas iniciales de ADN ni con los 20 individuos determinados. Solamente M4-950 resultó ligado al alelo de androfertilidad (**Fig 6.1**). La banda estaba presente en los genotipos androfértiles y ausente en los genotipos androestériles, de modo que el marcador estaba ligado en fase de acoplamiento. Tanto P12-1500 como C17-1200 resultaron no ligados a ningún carácter. El porcentaje de falsos positivos puede ser muy elevado, ya que la presencia de una banda en una mezcla de ADN puede ser debida a alguno de los componentes de la mezcla, tal y como se comprobó

posteriormente al estudiar los individuos que componían la mezcla por separado. Esto suele ocurrir con bandas de pequeño tamaño, sin embargo en nuestro estudio este fenómeno ha ocurrido en bandas de tamaño entre 700- 1500 Kb (**Tabla 6.1**). Resultados parecidos fueron obtenidos por Warburton y col. (1996) en la obtención de marcadores ligados a caracteres en melocotonero, utilizando también la combinación RAPDs y BSA. En nuestro estudio, la eficiencia de la metodología en términos de marcadores obtenidos en función del número de cebadores probados fue muy baja. El 96% de las bandas polimórficas entre mezclas de ADN correspondían a bandas no ligadas a ningún carácter. El único marcador obtenido estaba ligado al carácter androfertilidad y mostraba un valor de recombinación de 0.3. Para que la utilización de un marcador en la selección sea eficiente se requiere un grado de ligamiento mayor. Chaparro y col. (1994), después de probar 170 cebadores, no encontraron ningún marcador ligado a androesterilidad en melocotonero. El mismo resultado fue obtenido por Warburton y col. (1996), aunque utilizaron 360 cebadores. Una posible explicación a este hecho se debe a que los marcadores tipo RAPD dan lugar a marcadores dominantes, lo que lleva a una reducción en la eficiencia de los BSA. No es posible diferenciar el heterocigoto del homocigoto dominante, lo que dificulta la localización del alelo recesivo. Esto es especialmente importante para caracteres como la androesterilidad, en los que interesa disminuir su presencia en la población.

Existen varias fuentes de error en la selección de marcadores con la utilización de los BSA combinados con los marcadores tipo RAPD (Hallden y col., 1996). En el caso de la androesterilidad, que correspondería a un carácter de herencia simple, el fenotipo fértil puede tener dos formas genotípicas (AA y Aa), que pasarían a formar parte de la misma mezcla de ADN. Los marcadores tipo RAPDs al ser dominantes no podrían distinguir la presencia del alelo recesivo. Si el marcador está ligado al carácter en fase de acoplamiento no hay posibilidad de error. La banda aparece en la mezcla de ADN correspondiente al fenotipo androfértil. Donde se puede perder información es en los marcadores ligados al carácter en fase de repulsión. En este caso la dificultad de distinguir entre el heterocigoto y el homocigoto dominante sí que supondría un problema, ya que la banda estaría presente en ambas mezclas, la androfértil y la

androestéril, ligada al alelo recesivo (Mezcla 1: AA + Aa, presencia de banda con intensidad baja; Mezcla 2: aa, presencia de banda con intensidad alta). El error se produciría al no observar el polimorfismo, con la consiguiente pérdida de un marcador. Uno de los problemas más comunes encontrados en la aplicación de esta técnica en el presente estudio ha sido el observar polimorfismo no ligado al carácter. Este fenómeno puede ser explicado por la competencia en la amplificación de bandas descrita por Hallden y col. (1996). La mayor fuente de errores se encuentra cuando se dispone de un marcador ligado al carácter en fase de repulsión, que interfiere la amplificación de un marcador no ligado. Esto puede ocurrir en caracteres de herencia simple como la androesterilidad. En este caso podemos observar la amplificación de una banda que se ajusta exactamente al polimorfismo esperado para el carácter androesterilidad. Llamaremos B a este marcador. Si el marcador B está ligado en fase de acoplamiento, se espera que la banda esté presente en los androfértiles y ausente en los androestériles. Si la amplificación de la banda B es interferida en presencia de una banda A, cuando encontremos el genotipo AABb no habrá amplificación de la banda B. Sólo obtendremos amplificación de B en los genotipos AaBB, AaBb, aaBB y aaBb, observando diferente intensidad de banda en función de la dotación genética. La distribución de los caracteres en las mezclas de ADN se realiza al azar, a excepción del carácter estudiado, para el cual la dotación genética en cada mezcla es artificialmente diferente, lo cual permite la observación del polimorfismo. Si el marcador A está ligado al carácter en fase de repulsión, los individuos homocigotos dominantes y heterocigotos para este marcador (AA y Aa) se encuentran en la mezcla correspondiente a la androesterilidad. La presencia de estas bandas actuarán evitando la amplificación de la banda B, con lo que estará ausente en la mezcla correspondiente a la androesterilidad, pero presente en la mezcla correspondiente a la androfertilidad, ya que aquí la banda A está como homocigoto recesivo (aa) y no interfiere en su amplificación. Ello daría a entender que se trata de un marcador ligado al carácter en fase de acoplamiento. Sin embargo al estudiar la población en su conjunto se desmiente la presencia de ligamiento.

Sin embargo la técnica de los BSA ha sido utilizada con éxito en caracteres

dominantes. Es el caso del marcador ligado al gen de resistencia al moteado en manzano (Yang y col., 1997), la obtención de dos marcadores ligados al gen de resistencia a la podredumbre de raíces del tabaco (Bai y col., 1995) y marcadores ligados a genes de resistencia al mildiu en lechuga (Paran y Michelmore, 1993). En *Prunus* han sido obtenidos marcadores en melocotonero ligados a caracteres dominantes como la dureza del hueso, la carne blanca y el hueso libre (Chaparro y col., 1994; Waburton y col., 1996).

Cuando se contrastan mezclas que tienen diferente composición alélica, es posible encontrar marcadores ligados a alelos específicos. Por ejemplo, Pomper y col. (1998), usando marcadores tipo RAPD, combinándolos con BSA y contrastando las mezclas de acuerdo con sus alelos, encontraron marcadores ligados al alelo de autoincompatibilidad S_2 y S_1 en avellano. En nuestro estudio ninguno de los marcadores que distinguían las mezclas autocompatibles (conteniendo los alelos ScS_5) y las autoincompatibles (S_2S_5) estaban ligados a los alelos Sc o S_2 .

Tabla 6.1.-Marcadores obtenidos con BSA (Bulk Segregant Analysis).

Marcador	SI	SC	MF	MS
B14-1500	+	-	-	-
B17-700	+	+	+	-
C17-1200	+	-	-	-
M3-1600	+	+	-	+
M4-950	+	-	+	-
M17-1000	+	+	+	-
P2-1500	-	+	+	-
P2-900	-	-	-	+
V1-900	-	+	-	-
V7-1300	+	-	-	-
V7-950	+	+	+	-
AQ7-700	-	-	-	+

SI Autoincompatible; SC Autocompatible; MF Androfértil; MS Androestéril.

El nombre de los marcadores corresponde a la serie de Operon Technologies, seguido por el peso molecular del marcador (pb). + indica presencia de banda. - indica ausencia de banda.

6.4.2.- Análisis por selección directa de cebadores.

6.4.2.1.- Androesterilidad.

Este carácter está controlado por un gen simple recesivo, por lo que se espera una segregación en la descendencia de 3:1, ya que ambos padres son heterocigotos para el carácter. De esta manera los marcadores que cumplían estos requisitos fueron seleccionados como candidatos. De los 160 cebadores probados se seleccionaron 17 marcadores, los cuales fueron probados para el resto de la población formada por 80 individuos. Se encontraron 3 marcadores ligados en fase de acoplamiento (bandas presentes en el androfértil y ausentes en el androestéril) al gen de androfertilidad: Y15-950, V10-1300 y M4-950 y un marcador ligado en fase de repulsión (bandas presentes en el androestéril y ausentes en el androfértil): B5-450 (**Tabla 6.2**). Sólo M4-950 fue previamente obtenido por BSA. La razón por la cual los marcadores Y15-950 y V10-1300 no fueron obtenidos por BSA puede ser explicada por un fenómeno de competencia en la amplificación en las mezclas de ADN (Williams y col., 1993). La amplificación se inicia probablemente en muchos lugares, pero sólo algunas de estas amplificaciones pueden ser después visualizadas. También se observó el fenómeno contrario. Bandas que eran amplificadas en las mezclas de ADN no fueron observadas después en los individuos pertenecientes a estas mezclas estudiándolos por separado. El análisis del ligamiento mostró que aunque estos marcadores están próximos al gen de androfertilidad, no están lo suficientemente cerca para ser utilizados en la mejora asistida por marcadores moleculares.

Tabla 6.2.-Marcadores ligados al carácter androesterilidad.

Marcador	Ms	ms	r	Chi	P	LOD
M4-950	+	-	0.30	6.36	0.006	1.35
Y15-950	+	-	0.25	9.97	0.009	2.11
V10-1300	+	-	0.20	9.96	0.001	2.09
B5-450*	-	+	0.07	-	-	-

Ms: alelo de androfertilidad; ms: alelo de androesterilidad.

* Este marcador no fue probado en toda la población, sólo en una muestra de 11 individuos.

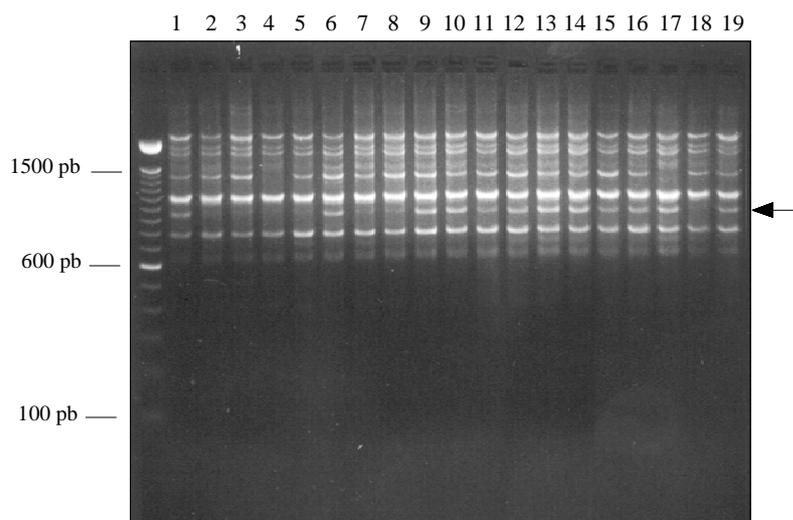


FIGURA 6.1.-Amplificación RAPD correspondiente al cebador M4 para la descendencia del cruce Gitano x Pepito del Rubio. El marcador correspondiente a 950 pb, señalado con una flecha, está presente en los individuos androfértiles y ausente en los androestériles. De izquierda a derecha: Marcador 100 pb, Gitano (1), Pepito del Rubio (2), individuos androestériles incluido un falso positivo (3-9), individuos androfértiles (10-17), mezcla de ADN de individuos androestériles (18) y mezcla de ADN de individuos androfértiles (19).

6.4.2.2.- Autocompatibilidad.

De acuerdo con Burgos y col. (1998), los genotipos para la autocompatibilidad de Gitano y Pepito del Rubio eran S_5 (autoincompatible) y ScS_2 (autocompatible), respectivamente. De esta forma los cebadores que producían bandas presentes en Pepito del Rubio y daban segregación 1:1 eran candidatos a marcadores de los alelos Sc o S_2 . Por otro lado las bandas presentes en Gitano y daban segregación 1:1 eran candidatos a marcadores del alelo S_5 . Se determinó la dotación genética de 11 de los individuos de la población por medio de las RNAs. El análisis del ligamiento entre los marcadores obtenidos y los alelos S se realizó con los 11 individuos determinados y dieron lugar a 2 marcadores ligados al alelo Sc . B11-550 estaba presente en todos los individuos que portaban el alelo Sc excepto uno. También para este marcador se observó un falso positivo. La frecuencia de recombinación obtenida entre el marcador B11-550 y el alelo Sc fue 0.27. El marcador P10-1200 estaba presente en todos los individuos con el alelo Sc , también excepto uno, y no se detectaron falsos positivos (Tabla 6.3 y Fig 6.2). Su frecuencia de recombinación fue 0.1, lo que le convierte en un candidato a marcador de selección. Este marcador debería ser probado para el resto de la población, una vez

determinada la dotación alélica de sus individuos, para confirmar el grado de ligamiento. Ningún marcador fue encontrado ligado al alelo S_5 . Debido a que no se disponía de datos a cerca de la dotación alélica del resto de los individuos de la población, no se pudo estudiar el ligamiento para la población correspondiente a 80 individuos, de modo que estos resultados deben considerarse como preliminares.

Tabla 6.3.- Individuos de la población cuyos genotipos para autocompatibilidad se encuentran determinados.

Individuo	Fenotipo	Genotipo	B11-550	P10-1200
Gitano	SI	S_5 _	-	-
Pepito del Rubio	SC	Sc S_2	+	+
Z11435	SI	S_2S_5	+	-
Z11423	SI	S_2S_5	-	-
Z11102	SC	Sc S_5	+	+
Z11337	SC	Sc S_5	+	+
Z11445	SC	Sc S_5	+	+
Z11419	SC	Sc S_5	+	+
Z10828	SI	Sc_	+	-
Z10829	SI	S_2S_5	+	+
Z11128	SC	Sc S_5	-	+
Z11431	SC	S_2 _	-	-
Z11503	SC	Sc S_5	+	+

El nombre de los marcadores corresponde a la serie de Operon Technologies, seguido por el peso molecular del marcador (pb). + indica presencia de banda. - indica ausencia de banda.

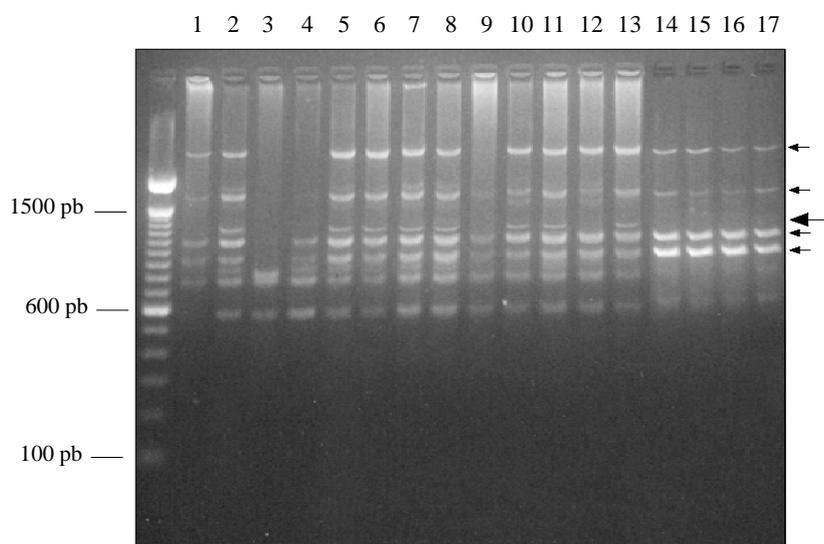


FIGURA 6.2.- Amplificación RAPD correspondiente al cebador P10 para la descendencia del cruce Gitano x Pepito del Rubio. De izquierda a derecha: Marcador 100 pb, Gitano (1) , Pepito del Rubio (2), Z11435, Z11423, Z11102, Z11337, Z11445, Z11419, Z10828, Z10829, Z11128, Z11431, Z11503, mezcla ADN individuos androestériles (14), mezcla ADN individuos androfértiles (15), mezcla individuos autocompatibles (16) y mezcla ADN individuos autoincompatibles (17). El marcador correspondiente a 1200 pb esta señalado con la flecha grande. Como puede verse este marcador no está presente en las mezclas de ADN. Las flechas pequeñas muestran los fragmentos de amplificación obtenidos en las mezclas de ADN que también están presentes en los individuos.

Comparando los dos métodos utilizados (BSA y selección directa de cebadores), 4 muestras fueron necesarias para BSA y 8 para selección directa de cebadores. Aunque en este último caso se utilizó un menor número de cebadores (160) se obtuvieron muchos más marcadores que los obtenidos por BSA. Sin embargo con esta última técnica corremos el riesgo de encontrar mucho polimorfismo no relacionado con el carácter estudiado. Sólo se obtuvo un marcador de androfertilidad siguiendo los dos procedimientos (M4-950). Otros dos marcadores más cercanos al carácter que el marcador M4-950 fueron obtenidos por selección directa de cebadores. Revisando las fotos de los geles, se observa que estos marcadores corresponden a bandas muy débiles obtenidas por medio de BSA para el carácter androfertilidad, lo que hizo que no fueran seleccionadas para el análisis. Resultados parecidos fueron obtenidos para los alelos de autocompatibilidad. Las bandas ligadas al alelo Sc obtenidas por selección directa de

cebadores no estaban presentes en las correspondientes muestras en BSA (**Fig 6.2**). Como ya se ha dicho, la causa de este fenómeno puede ser debida a la competencia en las mezclas de ADN, ya que algunas bandas presentes en los individuos estudiados de forma independiente no se encontraban en las mezclas. La familia estudiada procede de un cruce entre dos parentales muy heterocigotos. Esto explica que el porcentaje de bandas ligadas al carácter obtenidas con selección directa de cebadores sea muy bajo con respecto a las obtenidas por BSA, ya que en el primer caso las bandas polimórficas obtenidas pueden corresponder a otros caracteres.

Con el objetivo de aumentar la eficiencia de los BSA sería conveniente el uso de marcadores que proporcionaran un mayor polimorfismo y que no presentaran los problemas de competencia que se observan en los marcadores tipo RAPDs. De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo de diversidad de la presente tesis, el polimorfismo obtenido por combinación cebador/enzima con los AFLPs fue 40 veces superior al obtenido en RAPDs. Sin embargo, la incorporación de esta técnica a los programas de mejora genética requiere la colaboración de un laboratorio de biología molecular. Nuestros resultados sugieren que las mezclas de ADN en las que se contrastan los alelos de caracteres de interés, como pueden ser la autocompatibilidad y la androfertilidad, junto con una técnica que aumente el polimorfismo, como los AFLPs, incrementaría considerablemente la eficiencia en la obtención de marcadores moleculares. Esta alternativa podría resultar muy adecuada para futuros estudios moleculares en albaricoquero.

Esta es la primera vez que se obtienen datos de cosegregación entre caracteres de especial interés y marcadores moleculares en la especie albaricoquero.

6.5.- CONCLUSIONES.

- La combinación de las dos técnicas basadas en marcadores tipo RAPD utilizadas en el estudio, BSA y selección directa de cebadores, ha dado como resultado la obtención de cuatro marcadores ligados al gen de androesterilidad: M4-950, Y15-950 y V10-1300 en fase de acoplamiento y B5-450 en fase de repulsión. Los tres primeros marcadores no pueden ser considerados como marcadores de selección, ya que las frecuencias de recombinación con respecto al carácter son muy altas. Sin embargo, el marcador B5-450 es un buen candidato a marcador de selección, ya que su frecuencia de recombinación es $r = 0.07$.
- Se han obtenido dos marcadores de autocompatibilidad: B11-550 y P10-1200. Los resultados de estos marcadores son preliminares, ya su ligamiento sólo ha sido estudiado en 11 individuos de dotación alélica conocida. La frecuencia de recombinación de uno de ellos P10-1200 era de $r = 0.1$, lo que le convierte en un candidato a marcador de selección. Su grado de ligamiento al carácter debería ser probado una vez determinada la composición alélica de los individuos de toda la población.
- Se ha estudiado la eficiencia de los BSA combinados con RAPD en la obtención de marcadores ligados a caracteres de interés. La eficiencia de la metodología en términos de marcadores obtenidos en función del número de cebadores probados fue muy baja. El 96% de las bandas polimórficas entre mezclas de ADN correspondían a bandas no ligadas a ningún carácter. Esto ha llevado a proponer el uso de los BSA combinados con otro tipo de marcadores moleculares, cuya eficiencia en la obtención de polimorfismo sea mayor. Los marcadores AFLPs han demostrado ser muy eficaces en la obtención de polimorfismo en la especie albaricoquero. Su utilización conjunta con la técnica del Bulk Segregant Analysis aumentaría considerablemente la eficiencia en la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés. Esta alternativa podría resultar muy adecuada para futuros estudios moleculares en albaricoquero.

7.- CONCLUSIONES GENERALES

7.- CONCLUSIONES

Los resultados descritos en los diferentes capítulos de esta memoria permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Los marcadores tipo RFLP permiten la identificación de variedades de albaricoquero. Sin embargo, debido a su bajo polimorfismo y a la laboriosidad de la técnica, no son recomendables para la aplicación rutinaria en identificación varietal de albaricoquero. Los marcadores tipo RFLP han demostrado ser adecuados para medir la diversidad genética y la elaboración de mapas genómicos. El polimorfismo obtenido por esta técnica depende de la heterocigosidad de la especie, de modo que su eficacia en albaricoquero dependerá de la utilización de un mayor número de combinaciones sonda/enzima.
- Los marcadores tipo RAPD son eficaces para la identificación varietal, y pueden ser utilizados de forma rutinaria, ya que resultan una técnica rápida y sencilla. Los marcadores obtenidos agruparon las variedades de acuerdo con su origen geográfico. Estos marcadores son suficientemente polimórficos para la elaboración de mapas genómicos en cruzamientos intraespecíficos, siempre y cuando los parentales no sean muy próximos genéticamente.
- Los marcadores tipo AFLP han permitido la agrupación de las variedades de albaricoquero de acuerdo a su origen local dentro de los genotipos europeos. Este hecho destaca a los AFLPs como una técnica muy adecuada para su utilización en estudios de diversidad en poblaciones compuestas por genotipos muy próximos entre sí. Estos marcadores proporcionan un elevado polimorfismo, por lo que esta técnica resulta adecuada para la elaboración de mapas genómicos, incluso si se ha utilizado una familia cuyos parentales son muy próximos genéticamente.

- Se ha elaborado el primer mapa genómico para la especie albaricoquero, obteniéndose un número de grupos de ligamiento que se ajusta a la dotación cromosómica de la especie. El presente mapa favorecerá el desarrollo de la mejora asistida por marcadores moleculares en la especie albaricoquero, sirviendo de apoyo a los mejoradores.
- Los mapas de albaricoquero obtenidos para la familia procedente del cruce Goldrich x Valenciano cubren un 70% del genoma del parental femenino (Goldrich) y un 53% del genoma del parental masculino (Valenciano). Es necesaria la saturación de los mapas obtenidos con un mayor número de marcadores, para facilitar la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés y conseguir en Valenciano una reducción de los 9 grupos de ligamiento encontrados a los 8 grupos correspondientes a la dotación cromosómica de la especie.
- Ha sido determinada la herencia de carácter resistencia Sharka. El carácter monogénico de herencia simple, resultante de la primera determinación de la resistencia, se situó en el sexto grupo de ligamiento. Este es el primer paso para la saturación del genoma en esta zona, lo que permitirá en un futuro la selección precoz de plántulas resistentes por medio de marcadores moleculares.
- Se ha estudiado la eficiencia de los BSA combinados con RAPD en la obtención de marcadores ligados a caracteres de interés. La eficiencia de la metodología en términos de marcadores obtenidos en función del número de cebadores probados fue muy baja. El 96% de las bandas polimórficas entre mezclas de ADN correspondían a bandas no ligadas a ningún carácter. Esto ha llevado a proponer el uso de los BSA combinados con otro tipo de marcadores moleculares, cuya eficiencia en la obtención de polimorfismo sea mayor. Los marcadores AFLPs han demostrado ser muy eficaces en la obtención de polimorfismo en la especie albaricoquero. Su utilización conjunta con la técnica del Bulk Segregant Analysis aumentaría considerablemente la eficiencia en la obtención de marcadores moleculares ligados a genes de interés. Esta alternativa podría resultar muy adecuada para futuros estudios moleculares en albaricoquero.

ANEJOS

ANEJO I

I.1.- TAMPONES EXTRACCIÓN ADN

• **CTAB x 2**

CTAB	10 gr
NaCl	40,1 gr
Polivinil-pirolidina	5 gr
EDTA 0,5 M pH = 8	20 ml
Tris HCl 0,5 M pH = 8	50 ml
Sodio Bisulfito (opcional)	0,1 gr
H ₂ O	420 ml

I.2.- PREPARACIÓN DE LA RNA-asa.

1.- Diluir la RNA-asa pancreática (RNA-asa A) a una concentración 10 mg/ml en 10 mM Tris HCl (pH = 7,5) y 15 mM NaCl.

2.- Calentar a 100°C durante 5 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

3.- Guardar a -20 °C.

I.3.- TAMPONES ELECTROFORESIS

• **TAE x 50**

Tris	242 gr
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0,5 M pH = 8	100 ml
H ₂ O	

Se esteriliza a 120° durante 20 minutos.

• **TBE x10**

Tris	108 gr
Ácido bórico	55 gr
EDTA 0,5 M pH = 8	40 ml
H ₂ O	1Litro

Se esteriliza a 120° durante 20 minutos.

I.4.- MEDIOS CULTIVO BACTERIAS COMPETENTES.

- **Medio LB**

Bacto-triptona	10 gr
Extracto de bacto levadura	5 gr
NaCl	10 gr
H ₂ O	1 Litro

Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH.

- **Medio LB + Agar**

Bacto-triptona	10 gr
Extracto de bacto levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Agar	15 gr
H ₂ O	1 Litro

- **SOB**

Bacto-triptona	20 gr
Extracto de bacto levadura	5 gr
NaCl	0,6 gr
KCl 250 mM	10 ml
H ₂ O	1 Litro

Ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave.

I.5.- TAMPONES SOUTHERN

- **Solución Desnaturalizante.**

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 M

- **Solución Neutralizante.**

Tris HCl 0,5 M pH = 7,4
NaCl 1,5 M

- **SSC x 20**

NaCl 3 M
Citrato sódico 0,3 M

I.6.- TAMPONES DETECCIÓN

- **Tampón 1**

Ácido maléico 100 mM
NaCl 150 mM

- **Tampón 2**

Tampón 1 + 2 % Blocking Reagent

- **Tampón 3**

Tris HCl 0,1 M
NaCl 0,1 M
MgCl₂ 0,05 M

I.7.- COLORANTES ELECTROFORESIS

- **Azul de bromofenol.**

SDS 1%
Sacarosa 50 %
EDTA 1 mM
Azul de bromofenol

Se añade el polvo de azul de bromofenol en pequeñas cantidades hasta conseguir el color deseado.

- **Colorante AFLPs**

Formamida	50 ml
EDTA 0,5 M	1 ml
Xileno cianol	0,125 gr
Azul de bromofenol	0,125 gr

La formamida debe ser desionizada con 1,5 gr de Amberlita durante 30 min y posteriormente filtrada antes de hacer el colorante.

ANEJO II

VARIETADES DE ALBARICOQUERO UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE DIVERSIDAD

1.-VARIETADES NORTEAMERICANAS.



SEO



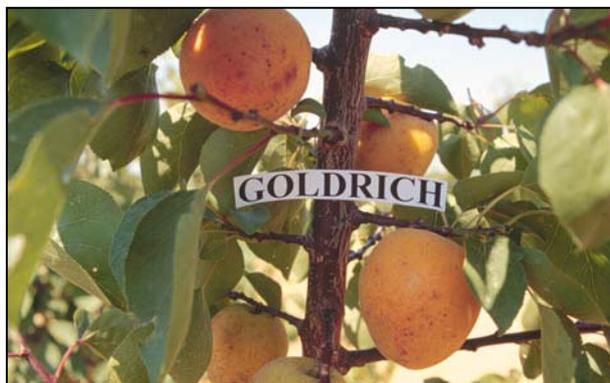
HENDERSON



HARCOT



HARGRAND

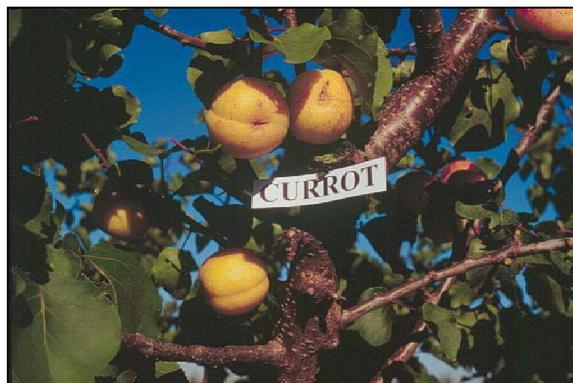


GOLDRICH

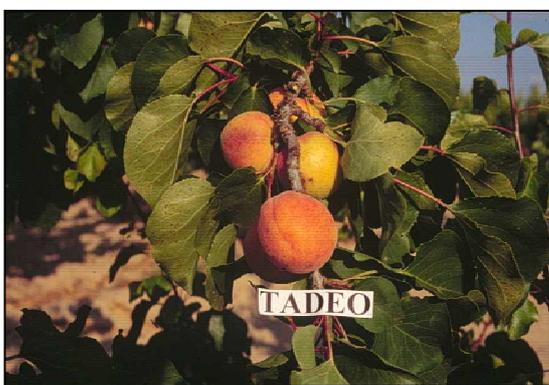
2.-VARIETADES VALENCIANAS.



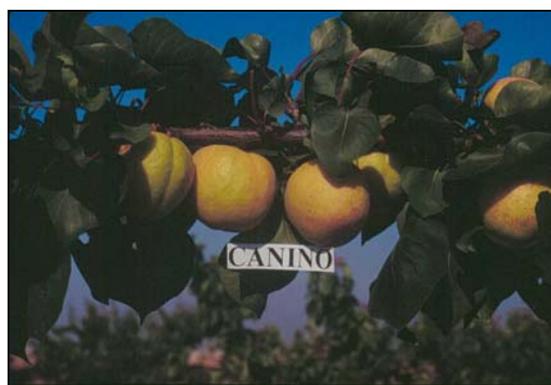
GINESTA



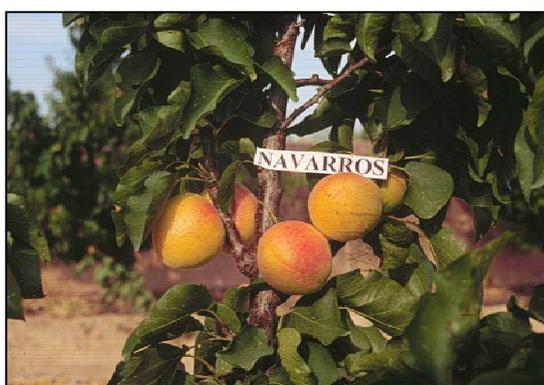
VALENCIANO



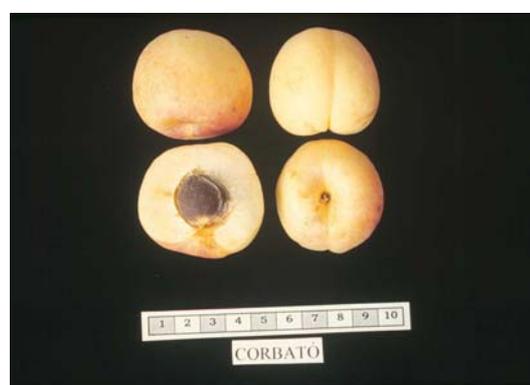
TADEO



CANINO

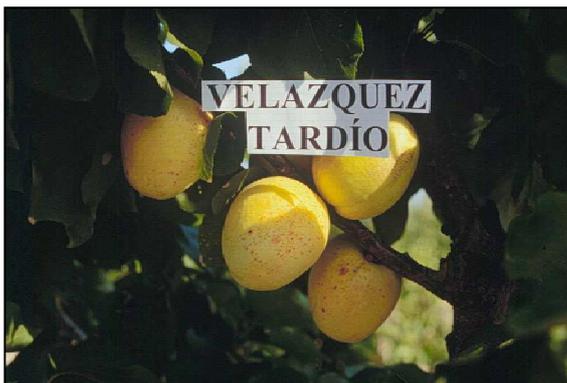


NAVARROS

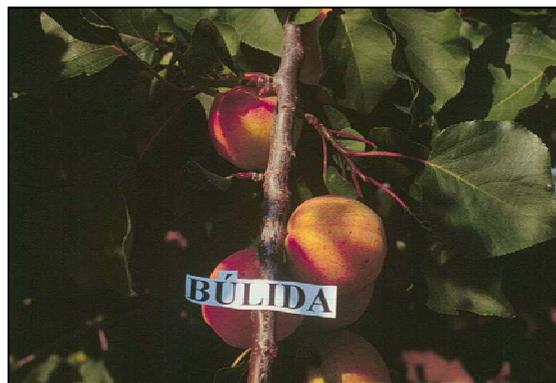


CORBATÓ

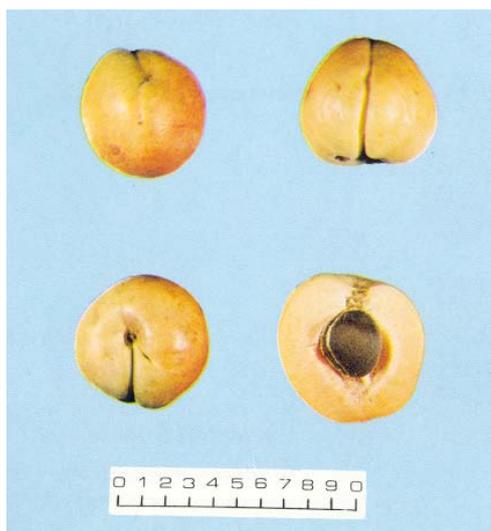
3.- VARIEDADES MURCIANAS.



VELAZQUEZ T.



BÚLIDA



MONIQUÍ

4.- VARIEDADES FRANCESAS



R. SERNHAC



ROYAL

ANEJO III

INDIVIDUOS DE LAS POBLACIONES SEGREGANTES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Las tablas siguientes contienen los individuos estudiados para las dos poblaciones segregantes:

- Goldrich x Valenciano: Población que da segregación para los caracteres resistencia a Sharka y autoincompatibilidad (Tabla III.1).
- Gitano x Pepito del Rubio: Población que da segregación para los caracteres autoincompatibilidad y androesterilidad.

Tabla III.1.- Población segregante procedente del cruce Goldrich x Valenciano 1.

S40101	S40110	S40119	S40129	S40138	S40205	S40214	S40224	S40233
S40102	S40111	S40120	S40130	S40139	S40206	S40215	S40225	S40235
S40103	S40112	S40121	S40131	S40140	S40207	S40216	S40226	S40236
S40104	S40113	S40122	S40132	S40141	S40208	S40217	S40227	S40237
S40105	S40114	S40123	S40133	S40142	S40209	S40219	S40228	S40238
S40106	S40115	S40124	S40134	S40201	S40210	S40220	S40229	S40239
S40107	S40116	S40126	S40135	S40202	S40211	S40221	S40230	S40240
S40108	S40117	S40127	S40136	S40203	S40212	S40222	S40231	S40241
S40109	S40118	S40128	S40137	S40204	S40213	S40223	S40232	S40242

Tabla III.2.- Población segregante procedente del cruce Gitano x Pepito del Rubio.

Z10717	Z10829	Z11003	Z11106	Z11135	Z11249	Z11431	Z11512	Z11551	Z11642
Z10737	Z10833	Z11006	Z11107	Z11137	Z11260	Z11433	Z11513	Z11607	Z11643
Z10739	Z10834	Z11009	Z11108	Z11139	Z11302	Z11434	Z11519	Z11609	Z11645
Z10742	Z10836	Z11011	Z11116	Z11141	Z11309	Z11435	Z11520	Z11610	Z11646
Z10805	Z10845	Z11016	Z11119	Z11150	Z11315	Z11440	Z11521	Z11611	Z11648
Z10811	Z10849	Z11018	Z11120	Z11160	Z11337	Z11445	Z11533	Z11613	
Z10812	Z10914	Z11020	Z11122	Z11204	Z11344	Z11446	Z11534	Z11614	
Z10817	Z10915	Z11022	Z11123	Z11216	Z11347	Z11501	Z11536	Z11617	
Z10818	Z10927	Z11031	Z11128	Z11217	Z11353	Z11503	Z11537	Z11623	
Z10821	Z10933	Z11043	Z11129	Z11219	Z11409	Z11506	Z11545	Z11626	
Z10825	Z10955	Z11044	Z11132	Z11222	Z11419	Z11507	Z11546	Z11635	
Z10827	Z10960	Z11047	Z11133	Z11227	Z11423	Z11508	Z11549	Z11636	
Z10828	Z10962	Z11102	Z11134	Z11231	Z11426	Z11511	Z11550	Z11640	

ANEJO IV

CONCEPTOS BÁSICOS PARA LA ELABORACIÓN DE MAPAS GENÓMICOS

VI.1.-LOD - SCORE (Log of the odds ratio).

La proximidad de dos genes se mide por la probabilidad de ser separados durante la meiosis, por el fenómeno del entrecruzamiento o recombinación. De aquí que las distancias genéticas se midan en función de la frecuencia de recombinación. Cuanto más lejos estén entre sí dos genes, mayor será la frecuencia con la que estos genes se intercambien, es decir, mayor será la frecuencia de recombinación.

$$\text{LOD} = \text{Log} [L(r_{\text{var}}) / L(r_0)] = \text{Log} [L(x) / L(0.5)]$$

L = Probabilidad de la existencia de ligamiento entre dos marcadores.

r_{var} = Frecuencia de recombinación de la variable estudiada.

$r_0 = 0.5$ Frecuencia de recombinación correspondiente a independencia, es decir, a ausencia de ligamiento.

La hipótesis nula supone el no ligamiento y equivale a la probabilidad $L(0.5)$. Con el valor LOD se compara la hipótesis alternativa, que es la existencia de ligamiento, representada por $L(x)$ y la hipótesis nula, ausencia de ligamiento. Normalmente se considera que el ligamiento existe cuando $\text{LOD} \geq 3$, ya que la probabilidad de que la hipótesis alternativa, es decir el ligamiento, sea cierta, es 1000 veces superior a la probabilidad de que no exista ligamiento.

$$\text{LOD} = \text{Log} [L(x) / L(0.5)] = 3; [L(x) / L(0.5)] = 1000$$

$$\text{Log}_{10} (1000) = 3$$

IV.2.- Funciones de mapa.

Las funciones de mapa transforman las frecuencias de recombinación entre dos genes en distancias genéticas (cM).

Existen dos tipos de funciones de mapa: Haldane y Kosambi.

• Haldane

Asume la ausencia de interferencia en los cruces durante la meiosis. Los cruces se producen siguiendo un proceso de Poisson.

$$x = -1/2 \log (1-2r) \quad \text{si } 0 \leq r < 0,5$$
$$x = \infty \quad \text{si } r = 0,5$$

Donde: x = Distancia genética en cM.

r = frecuencia de recombinación.

• Kosambi

La función de Kosambi asume cierto grado de interferencia en los cruces durante la meiosis.

$$x = 1/4 \log [1+2r/1-2r] \quad \text{si } 0 \leq r < 0,5$$
$$x = \infty \quad \text{si } r = 0,5$$

Donde: x = Distancia genética en cM.

r = frecuencia de recombinación

VI.3.- Estima de la longitud total del genoma.

Los marcadores moleculares permiten la construcción de una parte del genoma de una especie. A partir de este trozo de genoma se puede estimar su tamaño total. Esto permite a los mejoradores tener una idea del número de marcadores necesarios para saturar el mapa, facilitando así la búsqueda de marcadores moleculares ligados a genes de interés.

El método más utilizado para el cálculo del tamaño total del genoma es el método Hulbert (Hulbert y col. 1988):

$$G = 2 M X / K \text{ (Morgans)}$$

Donde: G = Estima del tamaño total del genoma.

X = Máxima distancia observada en el mapa entre pares de marcadores.

K = N° de pares de loci con LOD igual o superior a Z.

Z = LOD más bajo utilizado en la construcción de los grupos de ligamiento.

M = $n(n-1)/2$, Número de meiosis informativas, donde n = n° loci presentes en el mapa.

ANEJO V

MARCADORES TOTALES OBTENIDOS PARA LA ELABORACIÓN DE LOS MAPAS Y SU DISTRIBUCIÓN EN LOS MAPAS DE GOLDRICH Y DE VALENCIANO

Tabla V.1.- Marcadores que forman parte del mapa Goldrich y sus tipos de segregación.

GRUPO 1	C6-900	B19-200	AC-CTG4	AG-CTT2	AC-CCA1	AA-CCA6	AC-CAA8
	AA-CCA9	AA-CTT3	AA-CTT12				
GRUPO 2	R9-1300	B4-1000	R11-850	C8-1000	V13-650	AC-CTG2	AA-CAC8
	AG-CTT8	AA-CAA6	AC-CCC8	AA-CCC11	AA-CCA10	AA-CCA17	AA-CTT5
	AA-CTT10	AA-CTT13	Y8-700	Z17-750	R15-1300	AA-CCA11	AC-CTT3
	AG-CCA4	Z17-650	AC-CAA9	AA-CAC6	AC-CAA1		
GRUPO 3	C16-650	B17-1500	R3-1300	R3-800	R5-1800	B8-800	B20-900
	Y2-550	AA-CAC5	AA-CCC7	AA-CTT4	AA-CTT8	AA-CCC2	AA-CCA13
	AC-CAA10	AG-CAA8	R5-1200	AA-CAC9	AG-CAA7	AC-CAA3	AC-CAG3
GRUPO 4	Z11-750	B8-700	AC-CTG5	AC-CTG7	AG-CTT3	AA-CTT11	AC-CCC7
	AG-CCA2	AA-CAA4	AC-CCC6	AC-CCC3	AA-CAC1	AA-CAA1	AA-CCC3
	AC-CAA14	AA-CAA2	AC-CCC9	AA-CCA2	AG-CTT4		
GRUPO 5	C2-1300	Z6-650	Y14-1150	AG-CTT5	AC-CAG4	AG-CTT12	AA-CCA1
	AA-CCA16	AA-CAA5	AG-CAA5	AG-CAA11	AG-CAA2	R13-1100	R15-1000
GRUPO 6	V9-1300	AG-CTT6	AG-CAA13	AA-CAC7	AG-CTT17	AG-CCA1	AA-CTT7
	AG-CTT16	P12-1200	AA-CAA4	AA-CCC12	AA-CCA8		
	M19-750	M18-1600	M19-700	AA-CTT14			
GRUPO 7	AA-CAC3	AA-CCC5	AA-CCC6	AC-CCA5			
GRUPO 8	AA-CCA7	AA-CCA19	AC-CAA13	AG-CAA1	Z11-1100		

	Marcadores segregación 1:1 a LOD 5
	Marcadores segregación 1:1 a LOD 3
	Marcadores heterocigotos para Goldrich con segregación distorsionada
	Marcadores segregación 3:1
	Marcadores heterocigotos para ambos padres con segregación distorsionada

Tabla V.2.- Marcadores que forman parte del mapa Valenciano y sus tipos de segregación.

GRUPO 1	AG-CTT1	AA-CCA15					
GRUPO 2	AC-CCC1	AC-CCC2	AC-CCC4	AG-CAA11	AG-CAA10		
GRUPO 3	AA-CCA5	AC-CAA11	AG-CAA4	AC-CAG2	AG-CAA8	R5-1200	AC-CAA3
	AC-CAG3						
GRUPO 4	AC-CTT1	P1-1000	M15-600	AC-CCC9	AA-CAA1	AA-CAA2	
GRUPO 5	AG-CAA3	P10-1000					
GRUPO 6	AC-CTG6	AA-CAC4	AG-CTT9	AA-CCC4	AA-CCA14	AC-CTT2	AC-CTT6
	R8-800	C4-800	AA-CTT9	AA-CAA7	AA-CCC10	AC-CAA4	AA-CCA8
	M18-1600	M19-750	Z6-1300	Z11-1200	Y11-600	M19-700	AG-CAA1
	Z11-1100						
GRUPO 7	AA-CCA3	V5-550					
GRUPO 8	AG-CTT11	AG-CAA9	Y15-1000	V11-500	V11-1200	M17-900	V9-1100
	AA-CCC12	AG-CAA5	AC-CAA13	R13-1100	R15-1000	AA-CCA4	AA-CTT14
GRUPO 9	C14-800	AC-CAA7	V19-200				

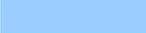
	Marcadores segregación 1:1 a LOD 5
	Marcadores segregación 1:1 a LOD 3
	Marcadores heterocigotos para Valenciano con segregación distorsionada
	Marcadores segregación 3:1
	Marcadores segregación 3:1 a LOD 2.5
	Marcadores heterocigotos para ambos padres con segregación distorsionada
	Marcadores heterocigotos para ambos padres con segregación distorsionada a LOD 2.5

Tabla V.3.- Total de marcadores RAPDs y AFLPs obtenidos para la elaboración de los mapas.

MAPA GOLDRICH					
TIPO A	AFLPs	RAPDs	TIPO C	AFLPs	RAPDs
CROM1	4	2	CROM1	0	0
CROM2	12	8	CROM2	2	1
CROM3	6	8	CROM3	4	1
CROM4	7	2	CROM4	6	0
CROM5	6	3	CROM5	3	0
CROM6	8	2	CROM6	3	2
CROM7	3	0	CROM7	1	0
CROM8	2	0	CROM8	3	3
TOTAL	48	25	TOTAL	22	7
TOTAL		73	TOTAL		29

MAPA VALENCIANO					
TIPO B	AFLPs	RAPDs	TIPO C	AFLPs	RAPDs
CROM1	2	0	CROM1	0	0
CROM2	3	0	CROM2	2	0
CROM3	3	0	CROM3	2	1
CROM4	1	2	CROM4	3	0
CROM5	1	1	CROM5	0	0
CROM6	9	2	CROM6	1	4
CROM7	1	1	CROM7	0	0
CROM8	2	4	CROM8	5	0
CROM9	1	2	CROM9	0	0
TOTAL	23	12	TOTAL	13	5
TOTAL		35	TOTAL		18

T. A SD	AFLPs	RAPDs	T. C MS	AFLPs	RAPDs
CROM1	1	0	CROM1	3	0
CROM2	1	0	CROM2	2	0
CROM3	1	0	CROM3	1	0
CROM4	0	0	CROM4	2	0
CROM5	0	0	CROM5	0	2
CROM6	0	0	CROM6	1	2
CROM7	0	0	CROM7	0	0
CROM8	0	0	CROM8	4	1
TOTAL	3	0	TOTAL	13	5
TOTAL		3	TOTAL		18

T. B SD	AFLPs	RAPDs	T. C MS	AFLPs	RAPDs
CROM1	0	0	CROM1	0	0
CROM2	0	0	CROM2	1	0
CROM3	1	0	CROM3	1	0
CROM4	0	0	CROM4	0	0
CROM5	0	0	CROM5	0	0
CROM6	2	0	CROM6	2	3
CROM7	0	0	CROM7	0	0
CROM8	0	1	CROM8	5	2
CROM9	0	0	CROM9	0	0
TOTAL	3	1	TOTAL	9	5
TOTAL		4	TOTAL		14

TIPO A	AFLPs	RAPDs	TIPO C	AFLPs	RAPDs
TOTAL	51	25	TOTAL	35	12
TOTAL		76	TOTAL		47
TOTAL MARCADORES MAPA GOLDRICH	123				

TIPO B	AFLPs	RAPDs	TIPO C	AFLPs	RAPDs
TOTAL	26	13	TOTAL	22	10
TOTAL		39	TOTAL		32
TOTAL MARCADORES MAPA VALENCIANO	71				

T. A NL	AFLPs	RAPDs	T. C NL	AFLPs	RAPDs
TOTAL	13	5	TOTAL	10	1
TOTAL		18	TOTAL		11

T. B NL	AFLPs	RAPDs	T. C NL	AFLPs	RAPDs
TOTAL	6	6	TOTAL	17	3
TOTAL		12	TOTAL		20

T.A SD	AFLPs	RAPDs	T.C SD	AFLPs	RAPDs
NO LIG	3	5	NO LIG	0	0
TOTAL		8	TOTAL		0
% NL TIPO A			18		
% NL TIPO B			24		
% NL TIPO C GOLD			35		
%NL TIPO C VAL			56		
TOTALES TIPO A (Segregación 1:1 GOLD)			102		
TOTALES TIPO B (Segregación 1:1 VAL)			54		
TOTALES TIPO C (Segregación 3:1)			58		
MARCADORES TOTALES			214		

T.B SD	AFLPs	RAPDs	T.C SD	AFLPs	RAPDs
NO LIG	3	0	NO LIG	6	0
TOTAL		3	TOTAL		6
T. A SD	6		% SD TIPO A		6
T. B SD	7		% SD TIPO B		13
T. C SD	19		% SD TIPO C		33
TOTAL	32		% SD TOTALES		16
SD Segregación distorsionada					
NL No Ligados					

ANEJO VI

SÍNTOMAS DE SHARKA Y DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL VIRUS EN HÍBRIDOS OBTENIDOS DEL CRUZAMIENTO LAS VARIETADES DE ALBARICOQUERO GOLDRICH X VALENCIANO

VI.1.-SÍNTOMAS DEL VIRUS DE LA SHARKA.

VI.1.1.- Ciruelo japonés.



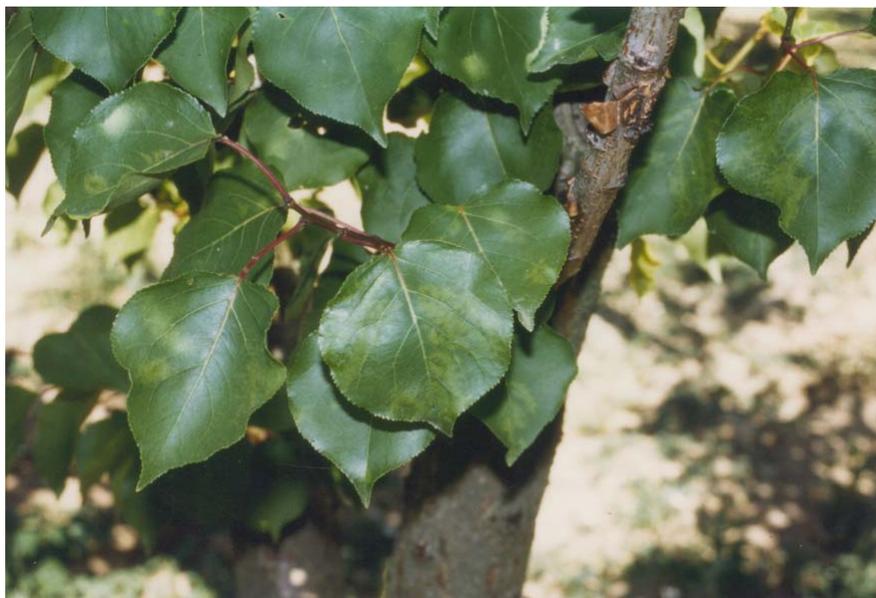
VI.1.2.- Ciruelo europeo.



VI.1.3.- Melocotonero.



VI.1.4.- Albaricoquero



VI.2.- DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL VIRUS EN HÍBRIDOS DE ALBARICOQUERO



Foto VI.1.- Vista general del invernadero. Plantas de melocotonero GF-305 utilizada como planta indicadora del virus de la Sharka.



Foto VI.2.- Injerto en chapa del híbrido sobre melocotonero GF-305.

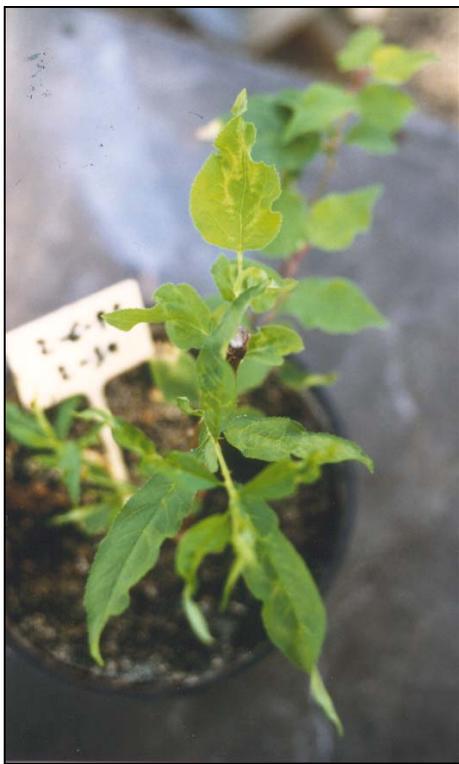


Foto VI.3.- Híbrido Goldrich x Valenciano mostrando síntomas en el patrón GF-305 y en la variedad. Los síntomas aparecen como bandas cloróticas en las nerviaciones de las hojas. La evaluación de los síntomas tiene lugar entre los 15 días a 2 meses después de pasado el ciclo de frío.



Foto VI.4.- Híbrido Goldrich x Valenciano mostrando síntomas de Sharka.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott A.G., S. Rajapakse, B. Sosinski, Z.X. Lu, K. Sossey-Alaoui, M. Gannavarapu, G. Reighard, R.E. Ballard, W.V. Baird, R. Scorza, A. Callahan. Construction of Saturated linkage maps of peacha crosses segregating for characters controlling fruit quality. Three architecture and pest resistance. Proc. Fourth Intern. Peach Symposium. Acta Hort. 465, ISHS 1998. Vol 1. Ed. R. Monet. 41-50.
- Arús P., Joobeur T., Jáuregui B., Truco M.J., De Vicente M.C. 1996. The European *Prunus* mapping project: update on molecular marker development in almond. In: Eucarpia Symp Fruit Breed Genet. Acta Hort. (en prensa).
- Arús P., R. Messegue, M. Viruel, K. Tobutt, E. Dirlewanger, F. Santi, R. Quarta. 1994. The European *Prunus* mapping project. Euphytica 77: 97-100.
- Aruselkar S, Parfitt DE, Bares WH, Hansche PE 1986. Genetics of malate dehydrogenase isozymes in peach (*Prunus persica* L. Batsch). J Hered (77): 49-51
- Asensio M. 1996. El virus de la sharka (plum pox virus): caracterización, diagnóstico y detección mediante anticuerpos monoclonales específicos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 193 pp.
- Audergon J.M. 1995. Variety and Breeding. Acta Hort., 384: 35-45.
- Audergon J.M., Dosba F., Karayiannis I., Dicenta F. 1994. Amélioration de l'abricotier pour la résistance à la sharka. Bulletin EPPO 24:3. 741-748.
- Audergon, J. M., Dicenta, F, Materazzi, A., Chastelliere, M.G., 1995 a. Preliminary studies on the mechanisms involved in Plum Pox Virus apricot resistance. Acta Horticulturae. 384: 553-557.
- Audergon, J.M., Morvan, G., Dicenta, F., Chastelliere, M.G., Karayiannis, I. 1995 b. A method to determine the susceptibility of apricot cultivars to Plum Pox Virus. Acta Horticulturae 384: 575-579.
- Avinent L., Hermoso de Mendoza A., Llácer G. 1993. Dispersión natural del virus de la sharka en plantaciones frutales de Valencia. Investigación Agraria, Ser. Prod. Prot. Veg. 8 (2): 251-263.
- Badenes M.L., Martínez-Calvo J., García-Carbonell S., Villarrubia D., Llácer G. 1997. Descripción de variedades autóctonas valencianas de albaricoquero. Publicaciones de

- la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Serie Divulgación Técnica, 41: 60 pp.
- Badenes ML, Asins MJ, Carbonell EA, Llácer G 1996. Genetic diversity in apricot (*Prunus armeniaca* L.) aimed at improving resistance to plum pox virus. *Plant Breeding*. 115, 133-139.
- Badenes ML, Martínez-Calvo J, Llácer G. 1998. Analysis of apricot germplasm from the European ecogeographical group. *Euphytica* 102: 93-99
- Bai, D., R. Reeleder, and J.E. Brandle. 1995. Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1184-1189.
- Bailey, C.H. and Hough L.F. 1975. Apricots. In: *Advances in fruit breeding* (eds. J. Janick and J.N. Moore) pp 367-383. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.
- Baird WV, Ballard RE, Rajapakse S, Abbott A.G. 1996. Progress in *Prunus* mapping and application of molecular markers to germplasm improvement. *HortScience* (31):1099-1106.
- Balan V., Stoian E. 1995. Susceptibility of certain apricot trees to the plum pox virus pathogenic action. *Acta Hort.*, 384: 565-569.
- Ballester J. 1998. Localització i anàlisi de caràcters d'interés agronòmic a l'ametler. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- Ballester, J., R. Boskovic, I Batlle, P. Arús, F. Vargas, and M.C. de Vicente. 1998. Location of the self-incompatibility gene on the almond linkage map. *Plant breeding* 117, 69-72.
- Bassi, D., Bellini, D., Guerriero, R. Monastra, F. and Pennone, F.. 1995. Apricot breeding in Italy. *Acta Horticulturae* 384: 47-54.
- Blaha, J., L. Luza, y J. Kalasek. 1966. Apricots (in Czech). In J. Blaha et al. *Peaches, apricots, almonds*. Prague: Czechoslovak Acad. Sci. p 227-414.
- Boivin K, Den M, Rami JF, Trouche G, Hanon P. 1999. Toward a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 98: 320-328
- Boskovic, R., and K.R. Tobutt. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.
- Boskovic, R., K.R. Tobutt, I. Batlle, and H. Duval. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica* 97: 167-176.

-
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, y R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Broothaerts, W., G.A. Janssens, P. Proost, and W.F. Broekaert. 1995. CDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol. Biol.* 27: 499-511.
- Burgos, L., C.A. Ledbetter, O. Pérez-Tornero, F. Ortíz-Parraga, and J. Egea 1997. Inheritance of sexual incompatibility in apricot. *Plant Breeding* 116: 383-386.
- Burgos, L., and C.A. Ledbetter. 1994. Observations on inheritance of male sterility in apricot. *HortScience* 29: 127.
- Burgos, L., O. Pérez-Tornero, J. Ballester and E. Olmos. 1998. Detection and inheritance of stylar ribonucleases associated with incompatibility alleles in apricot. *Sex plant Reprod* 11: 153-158.
- Byrne D.H, Littleton. T.G. 1989. Characterization of isozyme variability in apricots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 674-678.
- Byrne M, Murrell J.C., Allen B., Moran G.F. 1995. An integrated genetic linkage map for eucaliptus using RFLP, RAPD and isozymes markers. *Theor Appl Genet* 91: 869-875.
- CABI/EPPO 1992. Plum pox potyvirus. En: Smith, Mc Namara, Scott y Harris (eds.). Quarantine pests for Europe. Data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization: 922-927. C.A.B. International.
- Câmara Machado da A. Knapp E., Pühringer H., Seifert G., Hanzer V., Weiss H., Kättinger H. y Laimer da Câmara Machado, M. Approaches to pathogen-mediated resistance breeding against plum pox potyvirus in stone-fruit trees. *EPPO Bulletin* 24:697-704.
- Cambra M, Llácer G. 1994.El virus de la sharka en frutales. VII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Santiago de Chile. Actas del Congreso: 179-183.
- Candresse T., Rafia F., Dunez J., Cambra M., Asensio M, Navratil M., García J.A., Boscia D., Pasquini G. y Barba M. 1998. Characterization of plum pox virus coat protein epitopes using fusion proteins expressed in *E. Coli*. *Acta Hort.*, 472:461-468.

- Cause MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch S, Tanksley SD 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251-1274
- Cerezo M.R., Socias i Company y P. Arús. 1989. Identification of almond cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114 (1): 164-169.
- Cervera MT, Cabezas JA, Sancha JC, Martínez de Toda F, Martínez-Zapater JM 1998. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. Genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain).
- Chaparro JX, Werner DJ, O'Malley DO, Sederoff RR. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor Appl Genet* 87:805-815.
- Chevreau E., Y. Lespinasse y M. Gallet. 1985. Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theor. Appl. Genet.* 71: 268-277.
- Condit, R. y S.P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.
- Crescenzi A., d'Aquino L., Comes S., Nuzzaci M., Piazzola P. 1997. Characterization of sweet cherry isolate of plum pox potyvirus. *Plant Disease* 81: 711-714.
- Crossa-Raynaud P. 1961. L'abricot et le climat. *Journées Nationales de l'abricotier*. Perpignan: 55-57.
- De Vicente M.C., Ballester J., Jáuregui B., Joobeur T., Truco M.J., Arús P. 1996. Update on the search of molecular markers for important traits in almond. In: Tenth Coll GREMPA. *Cah Options Mediterr.* (en prensa).
- De Vicente MC, Truco MJ, Egea J, Burgos L, Arús P. 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Plant Breeding* 117(2): 153-158
- Dicenta F., Martínez-Gómez P., Abad E., García-Vidal S., Llácer G. 1998. Estado actual de la sharka de los frutales de hueso en las Comunidades de Murcia y Valencia. IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Salamanca: 245.
- Dielewanger E, Pronier V, Parvery C, Rothan C, Guye A, Monet R. 1998. A genetic linkage map of peach (*Prunus persica* L. Batsch) using morphological, RFLP, isozyme, RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 97: 888-895

-
- Dirlewanger E., A. Moing, C. Rothan, L. Svanella, V. Pronier, A. Guye, C. Plomion y R. Monet. 1999. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theor. Appl Genet.* 98: 18-31.
- Dosba F., Denise F., Maison P, Massonié G., Audergon JM. 1991. Plum Pox Virus resistance of apricot. *Acta Hort.*, 293: 569-579.
- Dosba F., Maison P., Lasac M., Audergon J.M., Massonié G. 1988. Recherche de geniteurs de résistance a la sharka (PPV) chez l'abricotier. En "Agriculture. L'abricotier". Ed. J.M. Audergon, INRA Monfavet. Avignon. 69-72.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. bul.* 19:11-15.
- Egea J., García J.E., Berenguer T. 1994. El albaricoquero, situación y perspectivas del cultivo. *Hortofruticultura*, Año V, Nº6: 53-62.
- Egea L., García J.E., Egea J., Berenguer T. 1988. Origen, situación y características de las variedades de albaricoquero en Murcia. *Anales de Edafología y Agrobiología* 47 (5-6): 999-1011.
- Egea, J., Burgos, L., Martínez-Gómez, P. and Dicenta, F. 1999. Apricot breeding for sharka resistance at CEBAS-CSIC, Murcia (Spain). *Acta Horticulturae* 488 (1): 153-157.
- Egea, L., T. Berenguer, J.Egea y J.E. García. 1987. Origin, situation et caractéristiques de variétés d'abricotier de Murcie. Réunion Constitutive du RANSA. Murcia, 4-6. Juin 1986. Programme de Recherche AGRIMED: 3-7.
- Eldredge 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* 27:160-163.
- Escalettes V., Dahouron F., Ravelonandro M y Dosba F. 1994. Utilisation de la transgénese pour l'obtention de pruniers et d'abricotiers expérimentant le gène de la protéine capsid du plum pox potyvirus. *EPPO Bulletin* 24:705-712.
- Escudero V., Rodriguez J., 1990. Situación actual del cultivo del albaricoquero. *Fruticultura profesional.* 30: 43-50.
- Esquinas, J. 1983. Los recursos Fitogenéticos como patrimonio de la humanidad. Acciones internacionales para su salvaguarda. En: Los recursos Fitogenéticos y las nuevas variedades vegetales. ITEA nº 2: 15-16.

- Eujayl I, Baum M, Powell W, Erskine W, Pehu E. 1998. A genetic linkage map of lentil (*lens sp*) based on RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 97: 83-89
- FAO QBS 1998. Vol.11, N°3/4: 118-119.
- Felipe A.J. 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Técnicas Europeas. Barcelona.
- Ferreira MR, Grattapaglia D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. EMBRAPA-Cenargen, Brasília.
- Foolad, M.R., S. Aruselkar, V. Becerra, and F. A. Bliss. 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91: 262-269.
- Frankel R. y Galun E. 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. No. 2. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg- New York.
- García J.A., Riechmann J.L., Laín S. Martín MT., Guo H., Simon L., Fernández A., Domínguez E., Cervera MT. 1994. Molecular characterization of plum pox potyvirus. *Bulletin EPPO* 24 (3): 543-554.
- Goor, A., y M. Nurock. 1968. The peach, the apricot, the plum and the pear. In *Fruits of the Holy Land*. Jerusalem: Israel Universities Press. p 202-227.
- Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucaliptus grandis* and *Eucaliptus urophylla* using a Psuedo-Testcross: Mapping Strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137
- Hallden, C., M. Hansen, N.O. Nilson, A. Hjerdin, and T. Sall. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1185-1192.
- Hauagge R., D.E. Kester y R.A. Asay 1987 b. Isozyme variation ampng California almond cultivars: I Inheritance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112 (4): 687-693.
- Hauagge R., D.E. Kester, S. Aruselkar, D.E. Parfitt y L. Lin. 1987 a. Isoenzyme variation among California almond cultivars. II Cultivar characterization and origins. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112 (4): 693-698.
- Hemmat M., Weeden NF., Manganaris A.G., Lawson D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. *J. Hered.* 85: 4-14.

-
- Hulbert S., Ilott T, Legg EJ, Lincoln S, Lander E, Michelmore R. 1998. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction length polymorphism. *Genetics* 120: 947-958.
- Hurtado MA, Badenes ML, Llácer G, Beck E, Westman A, Abbott A.G. 1999. Caracterización de variedades de albaricoquero por medio de marcadores moleculares tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Actas de Horticultura* 25 (2): 192-196
- Hurtado, M.A., Badenes, M.L. and Llácer, G. 1999. Random amplified polymorphic DNA as a tool for apricot cultivar identification. *Acta Horticulturae* 488 (1): 281-287.
- Jáuregui M.B. 1998. Localización de marcadores moleculares ligados a caracteres agronómicos en un cruzamiento interespecífico de almendro x melocotonero. Tesis doctoral Universidad de Barcelona.
- Joobeur, T., M.A. Viruel, M.C. de Vicente, B. Jáuregui, J. Ballester, M.T. Dettori, I. Verde, M.J. Truco, R. Messeguer, I. Batlle, R. Quarta, E. Dirlewanger, P. Arús. 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond x peach F2 progeny. *Theor Appl Genet.* 97: 1034-1041.
- Kalashyan Y., Bilkey ND., Verderevskaya TD., Rubina EV. 1994. Plum pox virus on sour cherry in Moldavia. *Bulletin EPPO* 24 (3): 645-649.
- Kan, Y.W., y A. M. Dozy. 1978. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by DNA analysis of amniotic fluid cells. *Lancet* 2: 910-912.
- Karayiannis I, Mainou A, Syrgianidis GD, Stylianidis DC. 1991. Apricot cultivars detected in Greece as having types of resistance to Plum Pox virus and used as genitors in crossing. 2^{ème} rencontre du groupe abricotier, Avignon, Mai 1991, 7.
- Karayiannis I. 1995. Reaction of apricot cultivars to plum pox virus infection. *Acta Hort.*, 384: 571-574.
- Karayiannis I. y Mainou A. 1994. Resistance to plum pox potyvirus in apricots. *EPPO Bulletin* 24:761-766.
- Karayiannis I., Mainou A., Tsaftaris A. 1999. Apricot breeding in Greece for fruit quality and resistance to Plum Pox Virus disease. *Acta Horticulturae.* 488 (1): 111-117.
-

- Karayiannis, I., A. Mainou, G.D. and Tsaftaris, A. 1999. Apricot breeding in Greece for fruit quality and resistance to plum pox virus disease.. *Acta Horticulturae* 488 (2):
- Kostina K.F. 1969. The use of varietal resources of apricots for breeding. *Trud. Nikit. Bot. Sad.* 40, 45-63.
- Kostina K.F. y I.N. Riabov, 1959. An experiment on distant hybridization of fruit trees (in Russian). *Trud. Nikit. Bot. Sad.* 29: 113-137.
- Kuang H, Richardson T, Carson S, Wilcox P, Borgarten A. 1999 Genetic analysis of inbreeding depression in plus tree 850-550f *Pinus radiata* D. Bn I. Genetic map with distorted markers . *Theor Appl Genet* 98: 697-703
- Labonne G., Lauriaut F., Yvon M. y Quiot J.B. 1994. Dissémination du plum pox potyvirus par les pucerons: analyse des vecteurs potentiels du virus dans un verger d'abricotiers. *EPPO Bulletin* 24:681-690.
- Laín S., Riechman J.L. García J.A. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox potyvirus. *Virus Research* 13: 157-172.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Layne, REC, Bailey CH and Hough LF. 1996. Apricots. In: *Fruit Breeding. Vol I: Tree and tropical Fruits.* Janick J. and Moore JN (eds). 79-113.
- Litt, M. y J. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Amer. J. Human Genet.* 44: 397-401.
- Llácer G, Cambra M. 1998. Thirteen years of sharka disease in Valencia, Spain *Acta Horticulturae* 472 (2):379-384
- Llácer G. 1987. La sharka: una grave amenaza para la producción de albaricoques en España. *Fruticultura Profesional*, 12: 41-47.
- Llácer G. 1995. Programa de lucha contra la sharka en la comunidad Valenciana. *El Agricultor cualificado*, 2: 51-56.
- Llácer G., Cambra M. 1986. Occurrence of plum pox virus in Spain in a new natural host, *Prunus salicina* Lindl. (Japanese plum). *Plant Disease*, 70 (2). Disease note.
- Llácer G., Cambra M., Laviña, A. 1985 a. Detection of plum pox virus in Spain. *EPPO Bulletin*, 15: 325-329.

-
- Llácer, G., Cambra, M. y Laviña, A. 1985 b. Detección y primeros estudios del virus de la Sharka en España. *Anales INIA, Serie Agricultura* 28 (3): 157-166
- Louro D., Corvo L.M. 1986. Occurrence of sharka in Portugal. *Acta Hort.*, 193: 183-186.
- Lu ZX, Sosinski A, Reighard GL, Baird WV, Abbott AG. 1998. Construction of a genetic linkage map and identification of aflu markers for resistance to root-not nematodes in peach rootstocks. *Genome* (41): 199-207
- Maiss E., Timpe U., Briske A., Jelkmann W., Casper R., Himmler G., Mattanovich D., Katinger H.W.D. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *J. Gen. Virology* 70: 513-524.
- Mantel NA. 1967. The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Res* (27):209-220.
- MAPA 1997. Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: 324-325.
- Marques CM, Araujo JA, Ferreira JG, Whetten R, O'Malley DM, Liu A-H, Sederoff R 1998. AFLP genetics maps of *Eucalyptus globulus* and *E.terricortis*. *Theor Appl Genet* 96: 727-737
- Martínez-Cutillas A., Gómez A. 1983. Colección, conservación y evaluación de recursos genéticos del albaricoquero en España. ITEA, Vol. Extra nº2: 253-259.
- Martínez-Gómez P. 1998. Resistencia del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) al virus de la Sharka (Plum pox potyvirus): Análisis de aspectos de interés para su aplicación en mejora. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Mc Cornick, S. 1998. Self-incompatibility and other pollen-pistil interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 18-25.
- Mehlenbacher, S.A., Cociu, V., Hough L.F. 1990. Apricots *Prunus*. *Acta Horticulturae* 290: 63-109.
- Messeguer R., P. Arús y M. Carrera. 1987. Identification of peach cultivars with pollen isozymes. *Scientia Horticulturae*, 31: 107-117.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genome regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
-

- Moustafa T.A. 1999. Resistencia frente al virus de la Sharka en híbridos intraespecíficos de albaricoquero. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Narváez VG, Martínez ME, Guerri J, Moreno P. 1998 La hibridación molecular con improntas de tejidos. Un método rápido para el estudio de la variabilidad del virus de la tristeza de los cítricos en campo. 9th Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Salamanca, Spain. pp 63.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat* 106: 283-292.
- Nei, M. and Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc.Natl. Acad.Soc. USA* 76:5269-5273.
- Németh M. 1994. History and importance of plum pox in stone-fruit production. *EPPO Bulletin* 24:525-536.
- Newbiggin, E., A.A. Anderson, and A.E. Clarke. 1993. Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *The Plant Cell*, 5: 1315-1324.
- O'Malley D.M., Grattapaglia D., Chaparro J.X., Wilcox P.L., Amerson H.V., Liu B-H, Wetten R, McKeand S, Kuhlman E.G., Mc Cords, Crane B., Sederoff R. 1996. Molecular markers, forest genetics and tree breeding. *Genomes of Plant and Animals: 21 st. Stradler Genetics Symposium*. 87-102.
- OEPP/EPPO 1974. Progrès réalisés dans la connaissance de la sharka. *Bulletin OEPP*, 4 (1): 125 pp.
- Paran, I. and R.W. Michelmore. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 895-903.
- Polak J. 1994. Breeding for resistance to plum pox potyvirus in the Czech Republic. *EPPO Bulletin* 24:781-782.
- Polák J., Chod J., Oukropec I., Krska B., Pivalová J., Jansta Z. 1995. Virological programme in breeding of apricots for resistance to Plum pox virus in the Czech Republic. *Acta Hort.*, 384: 581-584.
- Polák J., Oukropec I., Komirek P., Krska B., Bittóová M. 1997. Detection and evaluation of resistance of apricots and peach to Plum Pox Virus. *J. Plant Dis. Prot.* 104: 466-473.
- Pomper, K.W., A.N. Azarenko, N. Bassil, J.W. Davis, and S.A. Mehlenbacher. 1998. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for self-incompatibility alleles in *Corylus avellana* L. *Theor. Appl. Genet.* 97: 479-487.

-
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238
- Quarta R., M.T. Dettori, I. Verde, A. Gentile, Z. Broda. 1998. Genetic analysis of agronomic traits and genetic linkage mapping in a BC1 peach population using RFLPs and RAPDs. *Acta Horticulturae* 465 (1): 51-60.
- Rafalski, J.A., Tingey S.V. 1993. Genetic diagnostics in plants breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*. 9: 275-280.
- Rajapakse S., Belthoff L.E., He G. Estager A.E., Scorza R., Verde I., Ballard R.E., Baird V.W., Callahan A., Monet R., Abbott A.G. 1995. Genetic mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet*. 90:503-510.
- Rangwen, R. M.S. Akkaya, A.A. Bhagwar, U. Lavi, y P.B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers of soybean genotype identifications. *Theor Appl Genet*. 90: 43-48.
- Ravelonandro M., Dunez J., Scorza R. y Labonne G. 1998. Challenging transgenic plums expressing potyvirus coat protein genes with viruliferous aphids. *Acta Hort.*, 472: 413-420.
- Ravelonandro M., scorza R., Callahan A., Cordts J., Monsion M., Fuchs M., Delbios R., Bachelier J., Gonsalves D. y Dunez J. 1994. Production of plants of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica* transgenic for plum pox potyvirus coat protein, and demonstration of PPV resistance in transformed *N. benthamiana*. *EPPO Bulletin* 24:713-720.
- Remington DL, Whetten RW, Liu A-H, O'Malley DM. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus tadea*. *Theor Appl Genet* 98: 1272-1278
- Riechman J.L., Laín S., García J.A. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virology* 73: 1-16.
- Rohlf F.J. 1993 NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Publications Setauket. New York
- Rosales M., Hinrichsen y Herrera G. 1998. Molecular characterization of plum pox virus isolated from apricots, plums and peaches in Chile. *Acta Hort.*, 472:401-406.
- Roy A.S. y Smith I.M. 1994. Plum pox situation in Europa. *EPPO Bulletin* 24:515-524.

- Royo J.B., Miranda S., González J., Laquidain M.J., Navarro A. 1993. Evaluación de la estabilidad de perfiles isoenzimáticos en variedades de vid cultivadas en Navarra. Actas del II Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. SECH y APH. Zaragoza, 29-30 Abril 1993. 10: 835-840.
- Sassa H., Hirano H., Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility related Rnases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd). Plant Cell Physiol 33: 811-814.
- Sauer Jonathan D. *Historical Geography of Crop Plants: A Select Roster*. CRC Press 1993.
- Scorza R., Callhan A.M., Levy L., Damsteegt V. and Ravelonandro M. 1998. Transferring potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce plum pox virus resistant plums (*Prunus domestica* L.). Acta Hort., 472:421-428.
- Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A.M., Cordts J.M., Fuchs M., Dunez J., Gonsalves D. 1994. Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. Plant Cell Reports 14: 18-22.
- Scorza, R., and W.B. Sherman. 1996. Peaches. In : Advances in Fruit Breeding
- Sharma SK, Knox MR, Ellis THN. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theor Appl Genet 93: 751-758.
- Smith JJ, Scott-Craig JS, Leadbetter JR, Bush GL, Roberts DL, Fulbright DW. 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products from *Xantomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. Mol Phylo Evol 3:135-145
- Sneath PHA, Sokal RR. 1973 The principles and practice of numerical classification WH Freeman. San Francisco.
- Sosinski B., K. Sossey-Alaoui, S. Rajapakse, K. Glassmoyer, R. E. Ballard, A.G. Abbott, Z.X. Lu, W.V. Baird, G. Reighard, A. Tabb, R. Scorza. 1998. Use of AFLP and RFLP markers to create a combined linkage map in peach [*Prunus persica*] for use in marker assisted selection. Acta Horticulturae 465 (1): 61-68.
- Spade A, Caporali E, Marziani G, Portaluppi P, Restivo FM, Fasi F, Falavigna A. 1998 A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. Theor Appl Genet 1083-1098

-
- Spooner DM, Tivang J, Nienhuis J, Miller JT, Douches DS, Contreras-M A. 1996. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Etuberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor Appl Genet* 92: 532-540.
- Stam P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JOINMAP. *Plant J* 3:739-744
- Stockinger, E.J., C.A. Mulinix, C.M. Long, T.S. Bretin, A.F. Iezzoni. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus-culture population. *J. Hered* 87:214-218.
- Strauss, S.H., Laude R., y Namkoong, G. 1992. Limitations of molecular marker aided selection in forest tree breeding. *Can. J. For. Res.* 22: 1050-1061.
- Syrgiannidis G. D. 1980. Selection of two apricot varieties resistant to Sharka virus. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae.* 15, 85-87.
- Syrgiannidis G. Mainou, A. 1991. Two new apricot varieties resistant to sharka (Plum Pox) disease created by crossing. 2ème Rencontre sur l'Abricotier. Avignon, Mayo de 1991: 136.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology* 7: 257-264
- Tao, R., H. Yamane, H. Sassa, H. Mori, T.M. Gradziel, A.M. Dandekar, A. Sigiura. 1997. Identification of stylar Rnases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol* 38: 304-311
- Teycheney P.Y., Tavert G., Delbos R., Ravelonandro M., Dunez J. 1989. The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA (strain D). *Nucleic Acids Research*, 17: 10115-10116.
- Thomas CM, Vos P, Zabeau M, Jones DA, Norcott KA, Chadwick BP, Jones JDG. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8(5): 785-794
- Thormann CE, Ferreira ME, LEA Camargo, JG Tivang, TC Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet* (88): 973-980.

- Vavilov N.I. 1951. Phylogeographic basics of plant breeding. In K. S. Chester (trans). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica* 13 (1/6) p. 13-54.
- Verhaegen D, Plomion C. 1996. Genetic mapping in *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis* using RAPD markers. *Genome* 39: 1051-1061
- Veyrat, P. 1983. La erosión genética frente a la protección de variedades. En: Los recursos Fitogenéticos y las nuevas variedades vegetales. ITEA n° 2: 410-450.
- Viruel M.A., Madur D., Dirlewanger E., Pascal T., Kervella J. 1998. Mapping quantitative trait loci controlling peach leaf curl resistance. *Acta Hort* 465: 79-84.
- Viruel MA, Messeguer R, de Vicente MC, García-Más J, Puigdomènech P, Vargas FJ, Arús P. 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theor Appl Genet* (91):964-971
- Vogel JM, Rafalski A, Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Tingey SV. 1996. Application of genetic diagnostics to plant genome analysis and plant breeding. *HortScience* 31(7): 1107-1118.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. And Zabeau, M. 1995. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407-4414.
- Vowden CJ, Ridout MS, Tobutt KR. 1995. LINKEM: a program for genetic linkage analysis. *J Hered* 86: 249-250
- Wang D, Karle R, Brettin TS, Iezzoni AF. 1998. Genetic linkage map in sour cherry using RFLP markers. *Theor Appl Genet* 98: 1217-1224
- Warburton, M.L., V.L. Becerra-Velázquez, J.C. Goffreda and F.A. Bliss. 1996. Utility of RAPD markers in identifying genetic linkages to genes of economic interest in peach. *Theor. Appl. Genet.* 93: 920-925.
- Weber, J.L. y P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Amer. J. Human Genet.* 44: 388-396.
- Weeden N.F. y R. C. Lamb. 1987. Genetics and linkage analysis of 19 isozymes loci in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 865-872.
- Weeden N.F. y R.C. Lamb. 1985. Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 509-515.

-
- Weeden N.F., Timmerman G.M., Hemmat M., Kneen B.E., Lodhi M.A. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. In: Hoisington D, McNab A (eds) Proc Symp Appl RAPD Technol Plant Breed, Crop Sci Soc Am. Minneapolis, pp 12-17.
- Welsh J., y M. McClelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*: 18: 7213-7218.
- Westwood N.H. *La fruticultura de las zonas templadas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid 1982.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, A. Rafalsky and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*. 18:6531-6535.
- Wyman, A. y R. L., White. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77: 6754-6758.
- Xu, H., Bakalinsky, A.T. 1996. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *HortScience*, 31: 267-268.
- Yang, H.Y, and J. Kruger. 1994. Identification of an RAPD marker linked to the Vf gene for scab resistance in apples. *Plant breeding* 112: 323-329.
- Yang, H.Y, S.S. Korban, J. Kruger, and H. Schmidt. 1997. A randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker tightly linked to the scab-resistance gene Vf in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122(1): 47-52
- Zhu J, Gale MD, Quarrie S, Jackson M T, Bryan GJ. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor. Appl. Genet.* 96: 602-611.
- Zohary D. and Maria Hopf. *Domestication of Plants in the Old World. The origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe, and the Nile Valley*. Second Edition. Claredon Press. Oxford. 1993.