

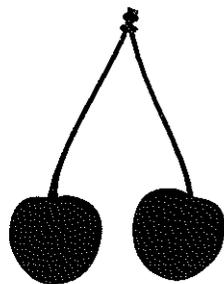
TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
EN CEREZO (*Prunus avium* L.).
IDENTIFICACIÓN VARIETAL,
RELACIONES DE SIMILITUD
E INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO.**

Ana Wünsch Blanco

Departamento de Producción Agraria

Universidad Pública de Navarra



Caracterización molecular en cerezo (*Prunus avium* L.). Identificación varietal, relaciones de similitud e incompatibilidad polen-pistilo.



Ana Wunsch Blanco
Departamento de Producción Agraria
Universidad Pública de Navarra

A mis padres

Agradecimientos

Al Dr. Iñaki Hormaza por su labor, esfuerzo y por todo su apoyo durante la dirección de este trabajo.

A la Dra. Lucía Ramírez su labor como tutora.

A la Dra. Maria Herrero por su apoyo a lo largo de la elaboración de esta tesis, sus sugerencias y su ayuda en la parte que concierne a la incompatibilidad en cerezo.

Al Dr. Juan Negueroles por su colaboración y la cesión de material vegetal.

A todo el departamento de Fruticultura del SIA le agradezco su acogida y su ayuda en un aspecto u otro, especialmente a Teresa Bespín por su ayuda y su contribución en este trabajo.

A mis amigos y a mi familia os agradezco el apoyo y el cariño durante estos años.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
El Cerezo	3
Taxonomía.....	3
Características botánicas.....	4
Origen del cultivo.....	4
Material vegetal.....	5
Situación actual del cultivo de cerezo.....	6
Los marcadores moleculares en la identificación varietal de especies frutales	7
Identificación varietal de especies frutales.....	7
Marcadores moleculares de ADN.....	8
Uso de los marcadores moleculares en la identificación varietal y estudios de similitud genética en <i>Prunus</i>	11
Incompatibilidad polen-pistilo	13
Incompatibilidad gametofítica.....	13
Modelos de interacción polen-pistilo en la incompatibilidad gametofítica.....	14
La incompatibilidad polen-pistilo en la mejora de cerezo.....	16
Objetivos	17
2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CEREZO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE SSRs DESARROLLADOS EN MELOCOTONERO	
Introducción	19
Materiales y Métodos	20
Material vegetal y extracción de ADN genómico.....	20
Amplificación de SSRs mediante PCR y electroforesis.....	23
Análisis de resultados.....	23
Resultados	24
Discusión	28

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PATRONES DE CEREZO MEDIANTE MICROSATÉLITES

Introducción	35
Materiales y Métodos	36
Resultados y Discusión	37

4. IDENTIFICACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS *S* DE VARIEDADES DE CEREZO MEDIANTE PCR

Introducción	41
Materiales y Métodos	43
Material vegetal	43
Extracción de ADN genómico y amplificación de alelos <i>S</i> mediante PCR	43
Resultados y Discusión	44

5. EVALUACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE LA COMPOSICIÓN ALÉLICA *S* DE VARIEDADES LOCALES DE CEREZO ESPAÑOLAS

Introducción	53
Materiales y Métodos	54
Resultados y Discusión	56
Caracterización de genotipos con SSRs y similitud genética	56
Identificación de alelos <i>S</i>	58

6. CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS DE CUATRO ALELOS DE INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO EN CEREZO

Introducción	61
Materiales y Métodos	62
Material vegetal y extracción de ADN genómico	62
Amplificación de alelos <i>S</i> mediante PCR	63
Clonado y secuenciación del ADN genómico	63
Resultados y Discusión	64
Identificación de alelos <i>S</i> mediante análisis de PCR	64
Clonado y secuenciación del ADN genómico de las ribonucleasas <i>S</i> ₁₂ , <i>S</i> ₂₃ , <i>S</i> ₂₄ , y <i>S</i> ₂₅	66
Comparación de las ribonucleasas <i>S</i> ₁₂ , <i>S</i> ₂₃ , <i>S</i> ₂₄ , y <i>S</i> ₂₅ con otras ribonucleasas <i>S</i> del genero <i>Prunus</i>	70

7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL CARÁCTER DE AUTOCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO EN LA VARIEDAD DE CEREZO ‘CRISTOBALINA’

Introducción	75
Materiales y Métodos	79
Material vegetal	79
Extracción de ADN genómico e identificación de alelos <i>S</i> en las descendencias	79
Clonado y secuenciación del ADN genómico de las ribonucleasas <i>S</i> ₃ y <i>S</i> ₆ de la variedad Cristobalina	80
Cruzamientos y observación microscópica de tubos polínicos	80
Resultados	87
Relaciones de incompatibilidad polen-pistilo entre ‘Cristobalina’ y otras variedades	87
Caracterización molecular de las ribonucleasas <i>S</i> ₃ y <i>S</i> ₆ de ‘Cristobalina’	88
Análisis genético de la mutación de autocompatibilidad de ‘Cristobalina’	89
Estudio de la transmisión del carácter de autocompatibilidad	92
Discusión	93
Caracterización de la mutación de autocompatibilidad	93
Análisis genético de la autocompatibilidad en ‘Cristobalina’	95
Mutantes del polen y modelos de interacción polen-pistilo	97

8. DISCUSIÓN GENERAL	101
Identificación molecular y relaciones similitud en variedades y patrones de cerezo	101
Caracterización molecular de genotipos <i>S</i> , nuevos alelos de incompatibilidad y autocompatibilidad en cerezo	102
9. CONCLUSIONES	107
10. BIBLIOGRAFÍA	111
11. ANEXOS	125
Anexos 1-4. Protocolos	125
Anexos 5-8. Acciones del GenBank	133
Anexos 9-11. Publicaciones	141

RESUMEN

La caracterización varietal de especies frutales se ha visto complementada en los últimos años con la aparición de marcadores moleculares de ADN que permiten una exploración del genoma de cada variedad independientemente del estado de desarrollo y del estado fenológico del árbol sin estar influenciado por el ambiente. El cerezo es una de las especies de frutales de hueso de mayor importancia económica y España se encuentra entre los principales productores mundiales de esta fruta. Sin embargo, esa importancia no se ha visto reflejada en estudios exhaustivos de la identificación de los genotipos de las distintas variedades de esta especie. Así, en este trabajo se ha desarrollado un método eficaz y de aplicación sencilla para la identificación de variedades de cerezo basado en marcadores moleculares tipo microsatélite. El uso de secuencias de microsatélites desarrolladas en melocotonero para la identificación de variedades de cerezo, ha demostrado que estas secuencias se encuentran suficientemente conservadas entre especies relacionadas como para poder detectar variabilidad intraespecífica en otras especies del género *Prunus*. El método desarrollado ha sido utilizado para identificar las colecciones de variedades de cerezo del Servicio de Investigación Agroalimentaria (SIA, Zaragoza) con 76 genotipos y de la Junta de Extremadura en Barrado (Caceres) con 28 genotipos, y la colección de patrones de cerezo del SIA de Zaragoza con 17 genotipos. El trabajo ha permitido establecer los perfiles de los genotipos de las diferentes variedades y patrones de estas colecciones y estudiar la similitud genética entre ellas. Así, se ha observado que las variedades de cerezo más antiguas y las variedades utilizadas como parentales en programas de mejora se agrupan por su similitud genética en dos grupos que se corresponden con su origen geográfico: variedades originarias del sur de Europa y variedades originarias de Centroeuropa y Norteamérica. Estos resultados concuerdan con el modo en que las variedades han sido seleccionadas localmente y con el movimiento del material vegetal de esta especie ya que fueron principalmente las variedades centroeuropeas las que fueron llevadas a Norteamérica. Las variedades tradicionales del Valle del Jerte analizadas son también genéticamente más similares entre ellas que a otras variedades introducidas en el Valle con posterioridad lo que indicaría que existe un grupo de variedades locales autóctonas que pueden diferenciarse del resto de variedades cultivadas y que han sido seleccionadas de manera empírica por los agricultores de la zona durante siglos. El conocimiento y la identificación de ese germoplasma va a ser de utilidad para su futura conservación.

El carácter de autoincompatibilidad en cerezo presenta numerosos problemas de cara a la producción en las plantaciones frutales. Así, las variedades de cerezo autoincompatibles necesitan la presencia de árboles polinizadores, donantes de polen compatible para la producción y, por lo tanto, el carácter de autocompatibilidad y la obtención de variedades autocompatibles es un importante objetivo de mejora en esta especie. En este trabajo se ha abordado el estudio del carácter de autocompatibilidad desde dos objetivos diferentes: el establecimiento de una metodología rápida y eficaz para la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad mediante PCR y el estudio genético y molecular del mutante natural autocompatible ‘Cristobalina’. Para el primer objetivo se ha desarrollado un método de identificación de alelos *S* basado en PCR con cebadores obtenidos a partir de las zonas conservadas de las ribonucleasas estilares *S*. Utilizando esta metodología se han identificado los alelos y grupos de incompatibilidad de las colecciones de cerezo antes mencionadas que incluyen 26 variedades cuyo genotipo *S* no había sido descrito previamente. Además se han identificado seis posibles nuevos alelos de incompatibilidad y para tres de ellos se ha confirmado su identidad mediante la clonación y secuenciación de las bandas amplificadas, comprobándose que corresponden a ribonucleasas *S*. El estudio de la variedad autocompatible ‘Cristobalina’ indica la presencia de una mutación que afecta a la funcionalidad de ambos alelos del factor *S* del polen. Esta situación implica que esta variedad es una herramienta muy útil para el estudio de la reacción de incompatibilidad en las Rosáceas y de la función de factor *S* del polen.

SUMMARY

Cultivar identification in fruit tree species has been complemented in recent years by the availability of molecular DNA markers. These markers allow to carry out a genome exploration of each cultivar independently of the age of the tree or the stage of development without environmental influences. Sweet cherry is one of the economically most valuable stone fruit tree species and Spain is one of the major sweet cherry producing countries, although this importance has not been reflected in deep studies regarding the characterization of the genotypes of the different cultivars of this species. Thus, in this work, an efficient and simple method to identify sweet cherry varieties using microsatellite markers has been developed. The use of microsatellite sequences developed in peach for the identification of sweet cherry cultivars has demonstrated that these sequences are sufficiently conserved among related species, to detect intraspecific variability in other species of the genus *Prunus*. The method developed has been used to characterize the sweet cherry collections of the 'Servicio de Investigación Agroalimentaria' (SIA, Zaragoza) with 76 genotypes, and of the 'Junta de Extremadura' in Barrado (Caceres) with 28 genotypes, plus the sweet cherry rootstock collection of SIA in Zaragoza with 17 genotypes. This work has allowed to establish the genotype patterns of the different cultivars and rootstocks analysed, and to study the genetic similarity among them. It has been observed that the most ancient varieties, as well as the parental cultivars of sweet cherry breeding programmes, are grouped by their genetic similarity, according to their geographic origin, in two groups: varieties originated in Southern Europe, and varieties originated in Central Europe and North America. These results agree with the way in which sweet cherries have been selected locally and with the movement of the plant material of this species, since mainly cultivars from Central Europe were taken to North America. The traditional varieties analysed from the 'Jerte' valley are also genetically closer among themselves, than to other varieties introduced recently in the valley. This indicates that there is a group of local autochthonous varieties that can be differentiated from the rest of cultivated varieties and that have been empirically selected by local farmers during centuries. The knowledge and characterization of this germplasm will be of great use for its future conservation.

Self-incompatibility is a main problem for fruit production in sweet cherry orchards. Self-incompatible cultivars need to be planted in combination with pollinator trees to ensure the availability of compatible pollen, and, thus, self-compatibility and the introduction of self-compatible cultivars is an important breeding objective in this species. In this work, the study of self-incompatibility has been carried out following two different approaches: the establishment of a fast and efficient methodology for the identification of self-incompatibility alleles by PCR analysis and the genetic and molecular study of a natural self-compatible sweet cherry mutant 'Cristobalina'. For the first objective, an efficient method of sweet cherry *S* allele identification, based in the use of PCR primers obtained from the conserved sequences of *S*-RNases, has been developed. By the use of this methodology it has been possible to identify the *S* alleles and incompatibility groups of the sweet cherry varieties belonging to the collections studied, including 26 varieties which *S*-allele genotype had not been described previously. Furthermore, six putative new *S* alleles have been identified and three of them have been confirmed to correspond to *S*-RNases, by cloning and sequencing their corresponding PCR bands. The study of the self-compatible mutant 'Cristobalina', indicates, that in this cultivar, there is a mutation that affects the pollen function of both *S* alleles. This situation implies that this cultivar is a very useful tool to study the self-incompatibility system in Rosaceae and the function of the pollen *S* factor.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

EL CEREZO

Taxonomía

El cerezo (*Prunus avium* L., $2n=16$) pertenece a la familia de las Rosáceas, género *Prunus*, subgénero *Cerasus* y es normalmente diploide aunque se han encontrado individuos triploides o tetraploides (Fogle, 1975). El género *Prunus* está compuesto por más de 200 especies, todas ellas con un número básico de cromosomas de $x=8$ y en el que se encuentran especies diploides, tetraploides y hexaploides. El género *Prunus* es el más amplio de la subfamilia de las Prunoideas (Amygdaloideas) que también incluye los géneros *Exochorda*, *Maddenia*, *Oemleria*, *Prinsepia* y *Pygeum* (Takhtajan, 1997). Históricamente, el género *Prunus* se ha clasificado en 5 subgéneros divididos en dos clades principales (Bortiri *et al.*, 2002). Uno estaría formado por los subgéneros *Amygdalus* y *Prunophora* y otro por los subgéneros *Cerasus*, *Laurocerasus* y *Padus*. Dentro del género *Prunus* se encuentran otras especies frutales de importancia económica como son el almendro (*Prunus dulcis* D.A. Webb; $2n=16$) y el melocotonero [*Prunus persica* (L.) Bastch., $2n=16$] dentro del subgénero *Amygdalus*, o el albaricoquero (*Prunus armeniaca* L., $2n=16$) y el ciruelo Europeo (*Prunus domestica* L., $2n=6x=48$) dentro del subgénero *Prunophora* (Watkins, 1976). Dentro del subgénero *Cerasus*, además del cerezo, otras especies de importancia económica son el guindo (*Prunus cerasus* L., $2n=4x=32$) que es tetraploide, el cerezo Santa Lucía (*Prunus mahaleb* L., $2n=16$) que ha sido ampliamente utilizado como patrón de cerezo y *Prunus fruticosa* Pall. ($2n=4x=32$) que es cultivado principalmente en Rusia y se considera el ascendente tanto del cerezo (Fogle, 1975) como del guindo por hibridación con el cerezo (Brettin *et al.*, 2000). Otras especies que se han utilizado en la mejora del cerezo son *Prunus tomentosa* Thunb. ($2n=16$) que proviene de China y *Prunus besseyi* Bailey ($2n=16$) originario de Norteamérica (Brown *et al.*, 1996).

Características botánicas

El cerezo es un árbol caducifolio de gran vigor cultivado principalmente por sus frutos comestibles. Se caracteriza por unas hojas grandes, de 7 a 13 cms. de longitud y de la mitad de anchura, simples, de forma entre ovalo-lanceolada y elíptica, y con el margen serrado. El pecíolo es largo (2-5 cms) y presenta unas glándulas rojas en la zona cercana a la lámina de la hoja que es algo rugosa. Sus flores son blancas de aproximadamente 2,5 cms de diámetro y aparecen en grupos, como umbelas, rodeando una yema vegetativa en madera de más de dos años. Cada yema floral contiene de 2 a 6 flores, con 5 sépalos, 5 pétalos, numerosos estambres y pistilo lampiño. El fruto es una drupa glabra globosa o con forma de corazón y tanto el color de la piel como de la pulpa puede variar de amarillo a rojo profundo o casi negro. El hueso es también globoso y casi liso.

Origen del cultivo

Se cree que el cerezo es originario de la zona que se encuentra alrededor del Mar Caspio y del Mar Negro y, actualmente, se encuentra de forma silvestre en Europa, zonas de Asia Occidental y el Cáucaso (Iezzoni *et al.*, 1990). La primera referencia escrita del cultivo del cerezo se remonta al año 300 a.C. por Theoprastus (Hedrick, 1915), pero se cree que la cereza era recolectada por los habitantes europeos con mucha anterioridad a su cultivo (Zohary y Hopf, 1988), ya que restos de huesos de cereza han sido encontrados en cuevas que datan de los años 4000-5000 a.C. (Brown *et al.*, 1996). Probablemente, el cerezo fue cultivado en primer lugar en Grecia tanto por su fruta como por su madera (Hedrick, 1915). El cultivo se extendió después por Europa con el Imperio Romano y ya en el siglo I d.C. el escritor romano Varro en su 'De Agricultura' describió técnicas de injerto en cerezo y Plinio el Viejo en su 'Historia Natural' hizo referencia a ocho cultivares de esta especie. Posteriormente, se produjo una disminución en el cultivo durante la Edad Media y un resurgimiento a partir del siglo XVI fundamentalmente en Alemania (Watkins, 1976). La extensión del cultivo del cerezo a través de Europa Occidental se basó probablemente en la domesticación de individuos silvestres que estaban bien adaptados a cada área de cultivo. Un número limitado de estas variedades fue llevado y extendido por Norteamérica

por los Europeos. Sin embargo, el cerezo no fue explotado comercialmente hasta hace aproximadamente 100 años (Hedrick *et al.*, 1915) y, por ello, la mayoría de las variedades de cerezo que se cultivan hoy en día son descendientes, separados por unas pocas generaciones, de estas antiguas variedades (Iezzoni *et al.*, 1990).

Material vegetal

Los objetivos actuales de la mejora del cerezo han impulsado una obtención constante de genotipos mejorados genéticamente (Brown *et al.*, 1996; Iezzoni *et al.*, 1990). Entre los objetivos de mejora más importantes se encuentran la mejora de la calidad del fruto, la precocidad, la extensión de la época de recolección, la autocompatibilidad, la resistencia al agrietamiento o la resistencia a las principales enfermedades (Iezzoni *et al.*, 1990). Dada la importancia de la autocompatibilidad de cara a la producción de cereza en una plantación, dentro de las variedades más utilizadas podemos distinguir entre autoincompatibles y autocompatibles. Dentro de las primeras existen variedades como ‘Van’, ‘Bing’, ‘Burlat’ o ‘Rainier’ que se cultivan en la mayoría de países productores siendo posiblemente las variedades más utilizadas. Dentro de cada país existen además variedades locales que se cultivan en zonas exclusivas como son ‘0900 Ziraat’ en Turquía, ‘Duroni’ en Italia o ‘Ambrunés’ en España (Webster y Looney, 1996). Entre las variedades autocompatibles más utilizadas se encuentran ‘Stella’, ‘Sunburst’ or ‘Sweetheart’. Para otros caracteres de interés se pueden destacar variedades como ‘Van’ por precocidad, ‘Burlat C1’ por el tamaño reducido del árbol, ‘Vittoria’ para la cosecha mecanizada o ‘Schmidt’ por su resistencia al agrietado (Iezzoni *et al.*, 1990). En España las variedades más utilizadas son ‘Burlat’, ‘Garnet’, ‘Marvin 4-70’, ‘Stella’, ‘Summit’, ‘Sunburst’ y ‘Sweetheart’, aunque, junto con estas, se cultivan variedades locales como ‘Ambrunés’, ‘Pico Colorado’ y ‘Pico Negro’ y todavía existen plantaciones de variedades tradicionales como ‘Hedelfingen’ y ‘Napoleon’ (J.L. Espada, comunicación personal).

Entre los patrones de cerezo más utilizados se encuentran el ‘F12/1’ o ‘Colt’ dentro de los patrones francos, los patrones de cerezo de Santa Lucía como ‘Santa Lucía 64’ o las selecciones ‘CAB’ dentro de los patrones de *Prunus cerasus*. En España el patrón más

utilizado es ‘Santa Lucía 64’, aunque en la zona de Extremadura también se utilizan patrones francos locales o ‘reboldos’. En la mejora de patrones de cerezo se buscan diferentes objetivos dependiendo de las condiciones de cultivo de cada zona. Entre estos objetivos está la uniformidad en las plantaciones, la reducción del tamaño del árbol, la precocidad, la resistencia al frío o a algunas enfermedades (Iezzoni *et al.*, 1990).

Situación actual del cultivo de cerezo

La producción total de cerezo en el mundo alcanza cerca de dos millones de toneladas métricas, lo que sitúa al cerezo en el cuarto lugar entre los frutales de hueso por detrás del melocotonero, el ciruelo y el albaricoquero (Faostat, 2002). La producción mundial de cereza está liderada por Turquía, Irán y Estados Unidos con más de 200.000 toneladas cada uno en el año 2000, seguidos por Italia, España y Alemania que producen algo más de 100.000 toneladas al año cada uno (Faostat, 2002). Estos seis países concentran así el 50% de la producción mundial de cereza, siendo España uno de los grandes productores de cereza del mundo.

En España, mientras la superficie dedicada a este cultivo se ha mantenido estable en los últimos cinco años variando entre las 27.000 y cerca de las 29.000 Hectáreas, la producción se ha duplicado en estos años pasando de 60.000 toneladas producidas en el año 1998 a 105.900 en el año 2002. Esto se refleja en un aumento del rendimiento que ha pasado de 2.200 Kg/Ha en 1998 a 3.850 Kg/Ha en el 2002 (Faostat, 2002), debido principalmente al incremento de los regadíos en la superficie dedicada a este cultivo. Dentro de España las principales zonas productoras de cereza son Extremadura, Aragón y Cataluña, que comprenden más del 50% de la producción nacional, siendo las provincias de Cáceres y Zaragoza las de mayor producción con más de 17.000 y 11.000 toneladas respectivamente (MAPA, 2000).

LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN VARIETAL DE ESPECIES FRUTALES¹

Identificación varietal de especies frutales

Tradicionalmente la identificación varietal se ha basado en la observación del fenotipo, lo que implica que sea un proceso lento y costoso que necesita de una infraestructura vegetal sólida y estable para poder llevarse a cabo. Esta identificación fenotípica presenta inconvenientes que se acentúan en el caso de árboles frutales. Debido al largo periodo de juvenilidad de estas especies, la observación de muchos de los caracteres necesarios para la identificación sólo es posible después de un número determinado de años. Además, la expresión de estos caracteres está influenciada por el ambiente lo que puede implicar una evaluación imprecisa, derivando en equívocos como sinonimias (genotipos iguales que figuren con distintos nombres) u homonimias (genotipos diferentes que comparten el mismo nombre). Cabe añadir que el gran tamaño de los individuos de las especies frutales dificulta la evaluación de los caracteres en el campo y limita la extensión de terreno de la que se puede disponer para su mantenimiento.

La disponibilidad actual de marcadores moleculares de ADN permite caracterizar con precisión los genotipos de las plantas. La caracterización genotípica complementa a la caracterización morfológica permitiendo la identificación en ausencia de rasgos fenotípicos, en un estado temprano del desarrollo y en cualquier fase fenológica del árbol. El establecimiento de un sistema de identificación varietal en frutales basado en marcadores moleculares de ADN que además sea fácilmente reproducible presenta indudables ventajas. Por un lado, permite facilitar el control de identidad del material propagado tanto de una colección de plantas madres a los viveristas como de éstos al agricultor; por otro lado, va a facilitar la gestión de las colecciones de germoplasma al determinar la presencia de homonimias y sinonimias.

¹Esta sección constituye parte de la publicación:

Wünsch A, Hormaza JI. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125:59-67 (Anexo 11).

Por último, el beneficio para los mejoradores es considerable ya que no solamente se pueden proteger sus derechos de forma más eficiente al poderse comparar las nuevas variedades con las ya existentes sino que el estudio detallado de la similitud genética de las distintas variedades partiendo de los datos moleculares, va a permitir una mayor eficiencia a la hora de diseñar cruzamientos en un programa de mejora.

Marcadores moleculares de ADN

Durante los últimos años hemos asistido a avances muy importantes en los métodos disponibles para analizar y utilizar los ácidos nucleicos tanto en plantas como en animales. Estos estudios han dado lugar al desarrollo de diferentes tipos de marcadores de ADN que han podido ser aplicados con éxito en la mejora de plantas y árboles frutales. Entre otras aplicaciones, los marcadores de ADN pueden ser utilizados para la introgresión de genes cuando están ligados a genes de interés (Hormaza *et al.*, 1994a; Durman y Korban, 1994), para la construcción de mapas genéticos (Rajapakse *et al.*, 1995) o para la identificación de genotipos y estudios de similitud genética entre ellos (Duneman, 1994).

Los diferentes marcadores moleculares desarrollados tienen ventajas y desventajas y, dependiendo del objetivo a alcanzar, las características de cada uno de ellos han de ser tenidas en cuenta. Así los primeros marcadores de ADN desarrollados fueron los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Estos se obtienen a partir de fragmentos del ADN digerido y después identificados mediante una hibridación con una sonda de ADN determinada, resultando en un patrón específico que depende del ADN genómico utilizado, de la enzima de restricción y de la sonda. Después de su uso inicial en estudios del genoma humano (Botstein *et al.*, 1980), los RFLPs han sido ampliamente utilizados en la mejora y la caracterización de plantas y árboles frutales (Tanksley *et al.*, 1989; De Vicente *et al.*, 1998). Aunque los RFLPs son una herramienta muy robusta para muchas aplicaciones en la mejora de plantas, como puede ser la identificación de los alelos *S* de incompatibilidad (Hauck *et al.*, 2001), su mayor limitación en la identificación de genotipos radica en que el polimorfismo que revelan es pequeño en comparación con la complejidad de su uso.

Los RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA) son fragmentos de ADN amplificados mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando cebadores de 10 nucleótidos de secuencia aleatoria, donde el polimorfismo depende de la presencia o ausencia de amplificación. El uso de los RAPD en diferentes organismos empezó a finales de la década de los 80 (Williams *et al.*, 1990) y debido a su simplicidad y rapidez pronto se convirtieron en una herramienta muy valiosa para la identificación de variedades y estudios de similitud genética en plantas (Duneman, 1994, Hormaza *et al.*, 1994b). Los numerosos estudios realizados con RAPDs en la década de los 90 con fines de identificación de genotipos demostraron la utilidad de estos marcadores; sin embargo, su naturaleza aleatoria implica que los resultados obtenidos pueden variar entre laboratorios para el mismo material analizado (Jones *et al.*, 1997), lo que supone un impedimento importante a la hora de establecer sistemas estandarizados de identificación varietal. Una alternativa para obtener marcadores más reproducibles a partir de un análisis de RAPD puede ser el uso de marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions; Paran y Michelmore, 1993). Estos marcadores se obtienen de una reacción de PCR utilizando cebadores más largos, diseñados a partir de la secuenciación de fragmentos RAPD seleccionados. Este ensayo es mucho más restrictivo y robusto y ha sido utilizado con éxito en mejora asistida por marcadores; sin embargo, posiblemente debido a la necesidad de secuenciación, su utilización con fines de identificación varietal ha sido exitosa pero escasa (Bautista *et al.*, 2002; Parent y Pagé, 1998; Xu y Bakalinsky, 1996).

Otro tipo de marcadores moleculares de ADN usados en menor medida en la identificación varietal de árboles frutales son los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms; Vos *et al.*, 1995). Estos marcadores combinan las técnicas de RFLP y PCR ya que son fragmentos específicos amplificados por PCR a partir de digestiones de restricción. Su uso es más complejo que el de RAPDs o SSRs ya que hay que llevar a cabo varios procesos además de la reacción de PCR y el análisis de los marcadores. Se requiere una digestión genómica, una ligación de adaptadores a los fragmentos de la restricción y el uso de cebadores diseñados para amplificar estos fragmentos. Los AFLP son marcadores dominantes, revelan mucho polimorfismo y un gran número de marcadores por ensayo, lo que resulta en un alto grado de discriminación entre genotipos y, por lo tanto, son de gran

utilidad en el análisis de germoplasma. Sin embargo, aunque se han empleado frecuentemente para la identificación de plantas anuales, su uso en la identificación de árboles frutales ha sido escaso (Angliolillo *et al.*, 1999; Goulao *et al.*, 2001; Hagen *et al.*, 2002; Hurtado *et al.*, 2002; Monte-Corvo *et al.*, 2000; Sensi *et al.*, 2003), debido probablemente a la disponibilidad de otros marcadores de más fácil aplicación como los microsatélites.

Los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats; Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989) son secuencias de ADN repetitivo que se encuentran en los genomas de los organismos eucariotas y que pueden ser amplificadas utilizando las secuencias adyacentes a estas como cebadores en una reacción de PCR. El polimorfismo que se revela depende del número de repeticiones en cada genotipo. Para los organismos de los que no existen suficientes secuencias de ADN disponibles en las bases de datos públicas de secuencias o de ESTs, el proceso de aislamiento de los microsatélites implica el clonado y secuenciación de secuencias repetitivas. Este proceso es complicado y requiere normalmente la construcción y el cribado de librerías genómicas de la especie a analizar. No obstante, las secuencias flanqueantes de los microsatélites están a menudo conservadas entre especies y géneros lo cual permite transferir los marcadores entre una especie y otra (Cipriani *et al.*, 1999; Dirlewanger *et al.*, 2002; Hormaza, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001), eliminando la necesidad de aislar las secuencias de microsatélites en cada especie. Los microsatélites son actualmente los marcadores preferidos para la identificación molecular de las diferentes especies de plantas (Gupta y Varshney, 2000) debido a la relativa sencillez de su aplicación, su gran polimorfismo, codominancia y reproducibilidad.

Una variación de los SSR, son los ISSR (Inter Simple Sequence Repeats; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Este método también utiliza las ventajas de los microsatélites, aprovechando su abundancia, sin necesidad de tener un conocimiento preliminar de las secuencias de estos para diseñar cebadores de PCR. Los ISSRs se obtienen a partir de la amplificación del ADN que se encuentra entre microsatélites utilizando cebadores que contienen una secuencia repetitiva aleatoria y unos nucleótidos degenerados o arbitrarios que hacen que la amplificación sea selectiva. Como resultado, el número de fragmentos

amplificados es muy grande y su uso para la identificación de genotipos puede ser muy útil (Goulao *et al.*, 2001).

Uso de los marcadores moleculares en la identificación varietal y estudios de similitud genética en *Prunus*

En los últimos 10 años, los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados con fines de identificación varietal y para estudios de diversidad genética en especies frutales (Wünsch y Hormaza, 2002a). El desarrollo de estos marcadores para su uso como "huellas dactilares" de los cultivares y patrones frutales más interesantes permite complementar la observación fenotípica, solventando los principales inconvenientes que esta presenta. Los marcadores moleculares de ADN permiten una exploración directa del genoma de cada variedad, lo que implica ventajas para la caracterización. El número de marcadores que se pueden obtener es ilimitado y la identificación no depende del estado de desarrollo de la planta, ni de las condiciones ambientales, lo que permite una identificación más precisa y en cualquier momento del ciclo fenológico del árbol. Dentro de los marcadores moleculares de ADN y debido a su rápida y fácil aplicación, los marcadores RAPD y los microsatélites han sido los más utilizados para este tipo de estudios mientras que otros marcadores como los RFLP, AFLP o ISSR han sido utilizados en menor medida. Dentro de las especies frutales de hueso una gran parte de estos trabajos han sido llevados a cabo en melocotonero, mientras que el resto de especies como el almendro, el ciruelo, el albaricoquero o el cerezo todavía no han sido analizadas tan exhaustivamente.

Los RAPDs fueron utilizados para la identificación de genotipos de variedades frutales principalmente en la década de los 90. En melocotonero destacan los trabajos llevados a cabo por Warburton y Bliss (1996) y Lu *et al.* (1996) que, además de identificar un gran número de variedades y patrones de melocotonero respectivamente, realizaron estudios de similitud genética de los genotipos estudiados a partir de los datos obtenidos de los marcadores moleculares. Otros estudios similares fueron los llevados a cabo por Bartolozzi *et al.* (1998) en almendro, Ortiz *et al.* (1997) en ciruelo, Takeda *et al.* (1998) en albaricoquero y Gerlach y Stosser (1997) en cerezo.

Más recientemente la mayoría de trabajos realizados para la caracterización de variedades frutales de hueso han sido realizados utilizando microsatélites. Así los primeros marcadores basados en los microsatélites desarrollados en el género *Prunus* fueron identificados en melocotonero por Cipriani *et al.* (1999) y, posteriormente, un gran número de microsatélites han sido desarrollados en esta especie (Aranzana *et al.*, 2002; Dirlewanger *et al.*, 2002; Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000), mientras que un número muy escaso de microsatélites han sido desarrollados en el resto de especies del género (Cantini *et al.*, 2001). Estos microsatélites han sido utilizados con éxito no solamente para la identificación de variedades de melocotonero (Aranzana *et al.*, 2003a) sino que también han podido ser transferidos para su utilización en la caracterización varietal de otras especies del género *Prunus* como el albaricoquero (Hormaza 2002), el cerezo (Dirlewanger *et al.*, 2002), el guindo (Cantini *et al.*, 2001) o especies adicionales e híbridos interespecíficos utilizados como patrones (Serrano *et al.*, 2002; Struss *et al.*, 2002).

Los diferentes trabajos realizados en la identificación varietal en especies frutales han permitido distinguir genotipos, clarificar sinonimias, identificar variedades mal clasificadas y establecer la similitud genética entre genotipos y su origen geográfico. De hecho la utilización de marcadores moleculares de ADN para la identificación varietal es de gran utilidad en especies frutales ya que estas se caracterizan por un gran polimorfismo entre variedades y ningún polimorfismo entre individuos de una misma variedad debido a su reproducción vegetativa. Esta aplicación de los marcadores moleculares puede ser incluso de mayor interés para la identificación de patrones frutales, ya que estos presentan muy pocas diferencias morfológicas una vez que han sido injertados.

El establecimiento de los perfiles moleculares tipos con microsatélites es una herramienta muy útil que puede ser utilizada para una diversidad de aplicaciones adicionales: estudios de paternidad (Buteler *et al.*, 2002), estudios poblacionales (Perera *et al.*, 2000), de dispersión de polen o semillas (Godoy y Jordano, 2001), mejora genética asistida por marcadores (Aranzana *et al.*, 2003b) o estudios filogenéticos (Chen *et al.*, 2002).

INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO

Incompatibilidad gametofítica

Los sistemas de incompatibilidad están basados en la capacidad de la flor para rechazar su propio polen. La mayor parte de estos sistemas se pueden clasificar en dos tipos, incompatibilidad esporofítica o gametofítica (De Nettancourt, 2001). En la incompatibilidad esporofítica, el fenotipo de incompatibilidad del polen está determinado por el genotipo de la planta productora del polen, y es característico de la familia de las Brassicaceae. En la incompatibilidad gametofítica el genotipo del grano de polen es el que determina su fenotipo. El cerezo, como otras especies de la familia de las Rosáceas, Solanáceas y Escrofulariáceas exhibe incompatibilidad estilar gametofítica monofactorial con múltiples alelos (GSI) (de Nettancourt, 2001). La reacción de incompatibilidad en este sistema está determinada por un locus (S) con múltiples alelos (S_1, S_2, \dots, S_n), y la fecundación sólo ocurre cuando el alelo S del genoma haploide del grano de polen es diferente de los dos alelos S en el tejido diploide del pistilo (Crane y Lawrence, 1929). Diferentes trabajos han confirmado que la respuesta de incompatibilidad gametofítica en el polen y en el estilo de las Rosáceas y Solanáceas, está determinada por genes diferentes del mismo locus S (McCubbin y Kao, 2000). Entre estos, destacan los trabajos en los cuales se describen mutaciones del locus S que afectan a la función del polen pero no del estilo o viceversa (Sassa *et al.*, 1997; Lewis y Crowe, 1954). Así el término haplotipo se utiliza para describir variantes del locus S y el término alelo se utiliza para indicar las variantes de un gen polimórfico en el locus S (McCubbin y Kao, 2000).

En los años 80 se observó que el locus S en el estilo, codifica una ribonucleasa específica para cada alelo S (S -RNasa) (McClure *et al.*, 1989) y que esta proteína es responsable del rechazo en el estilo de polen que tiene el mismo alelo S (Huang *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Estudios llevados a cabo posteriormente en especies de la familia de las Rosáceas, como el almendro (Tao *et al.*, 1997; Ushijima *et al.*, 1998a), el manzano (*Malus x domestica* Borkh.) (Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1994), el peral Europeo (*Pyrus communis*) (Zuccherelli *et al.*, 2002), el albaricoquero Japonés (*Prunus mume*) (Yaegaki *et al.*, 2001), el peral Japonés (*Pyrus serotina*) (Sassa *et*

al., 1992, 1993; Ishimizu *et al.*, 1998), el guindo (Yamane *et al.*, 2001) y el cerezo (Tao *et al.*, 1999a), han demostrado que ribonucleasas estilares similares a las de las Solanáceas están involucradas en la respuesta de incompatibilidad en estas especies y que, por lo tanto, un mecanismo similar al descrito en las Solanáceas tiene lugar en las Rosáceas para controlar la incompatibilidad polen-pistilo. De hecho, tanto las Solanáceas y Escrofulariáceas, que pertenecen a la subclase Asteridae, como las Rosáceas, que pertenecen a la subclase Rosidae, presentan el mecanismo de reconocimiento y rechazo de polen basado en la ribonucleasa T2 y estudios filogenéticos demuestran que la utilización de una ribonucleasa ancestral para la reacción de incompatibilidad ocurrió antes de la divergencia de estas tres familias (Igic y Kohn, 2001)

Así, en la incompatibilidad gametofítica que opera en las Rosáceas, la reacción de incompatibilidad está determinada por una ribonucleasa alelo-específica que establece el fenotipo de incompatibilidad en el estilo y un factor *S* expresado en el polen que establece el fenotipo de incompatibilidad de este, pero cuya identidad todavía no ha sido confirmada. Partiendo de lo que hoy se conoce de este sistema de incompatibilidad se cree que el factor *S* del polen debe tener las siguientes características: su gen debe estar ligado al gen de las ribonucleasas *S*, debe presentar diversidad alélica y debe interaccionar con la ribonucleasa *S* correspondiente de una manera alelo-específica (McCubbin y Kao, 2000). Recientemente, un gen del locus *S*, que se expresa específicamente en el polen y que presenta diversidad alélica, ha sido identificado en Escrofulariáceas (Lai *et al.*, 2002) y en Rosáceas (Ushijima *et al.*, 2003). El producto de este gen, denominado *AhSLF* en *Antirrhinum* (Escrofulariáceas) y *SFB* en almendro (Rosáceas), contiene un dominio caja F y es un sólido candidato a factor *S* del polen (Sp). La presencia en este gen de un dominio caja F en su extremo amino terminal sugiere que esta proteína puede tener la función de dirigir la degradación de un substrato específico a través de una ruta de degradación de proteínas mediado por ubiquitinas.

Modelos de interacción polen-pistilo en la incompatibilidad gametofítica

Aunque es sabido que la actividad ribonucleasa de las ribonucleasas *S* es esencial para su función en la reacción de incompatibilidad, todavía no se conoce con exactitud la

manera precisa en que se inhibe el crecimiento de los tubos polínicos que tienen el mismo alelo. Dos posibles modelos se han descrito para explicar la interacción entre los factores *S* del polen y del estilo para dar lugar a la reacción de incompatibilidad (McCubbin y Kao, 2000); el modelo “receptor” y el modelo “inhibidor”. En el primero, el producto *S* del polen sería una molécula receptora ligada a la pared del tubo polínico que actuaría como un ‘guardián’ permitiendo la entrada solamente de ribonucleasas *S* con el mismo alelo *S*. La ribonucleasa *S* entraría en el citoplasma del tubo polínico degradando el ARN y cesando el crecimiento de este. En el modelo inhibidor, el producto *S* del polen sería un inhibidor de las ribonucleasas *S*, de forma que todas las ribonucleasas *S* entrarían en el citoplasma del tubo polínico y el producto *S* del polen inhibiría la actividad de todas las que no tengan su mismo alelo. Así la ribonucleasa con el mismo alelo no desactivada degradaría el ARN del tubo polínico cesando así su crecimiento. Aunque ambos modelos son consistentes con lo que se conoce del locus *S* (De Nettancourt, 2001), estudios recientes han demostrado de forma experimental que las ribonucleasas *S* se acumulan en el citoplasma de los tubos polínicos independientemente del haplotipo de ambos factores, aportando así evidencia que apoya el modelo inhibidor (Luu *et al.*, 2000).

Si las proteínas caja F identificadas en *Antirrhinum* y almendro (Lai *et al.*, 2002; Ushijima *et al.*, 2003) son el factor *S* del polen, la función de estas puede ser explicada de acuerdo con el modelo inhibidor. La proteína caja F dirigiría la degradación de las ribonucleasas *S* con alelos diferentes al suyo propio dejando activas las ribonucleasas *S* con el mismo alelo *S*. La pregunta por contestar es como las proteínas F-box diferencian e interaccionan de una forma u otra con las ribonucleasas *S* con su mismo alelo o con alelos diferentes. Lai *et al.* (2002) y Ushijima *et al.* (2003) proponen dos modelos diferentes; el primero sugiere que la proteína caja F tiene una mayor afinidad por las ribonucleasas *S* con alelos diferentes y una menor afinidad por las ribonucleasas *S* con el mismo alelo, lo que implicaría que todas las ribonucleasas serían degradadas, pero que los tubos polínicos que no tienen ningún alelo en común con el tejido estilar crecen más rápido. Ushijima *et al.* (2003) sugieren que las ribonucleasas *S* pueden ser identificadas por un dominio de especificidad en el extremo carboxy terminal de la proteína con caja F con el mismo alelo, mediante el cual se unirían a esta en forma de un pseudo-substrato que no estaría destinado hacia la degradación. No obstante, este es un campo en ebullición en el que se están

produciendo avances significativos a gran velocidad y la existencia de distintos sistemas experimentales va a permitir la comprobación de las distintas hipótesis en especies diferentes.

La incompatibilidad polen-pistilo en la mejora de cerezo

La incorporación de la autocompatibilidad en las variedades de cerezo se ha convertido en uno de los principales objetivos de mejora de esta especie (Brown *et al.*, 1996). En cerezo y otras especies frutales en las que también opera la autoincompatibilidad floral, no se produce cuajado en ausencia de polen compatible y, como consecuencia, los árboles de una plantación deben ir acompañados de árboles polinizadores que aseguren la presencia de polen compatible. Esta situación implica problemas de manejo para el agricultor, que incluyen la dedicación de espacio y recursos adicionales para los polinizadores que además deben solapar con los árboles destinados a la producción en la época de floración, y una producción de frutos desigual debido a la presencia de estos árboles polinizadores cuyo fruto normalmente no es tan deseable como el de los árboles dedicados a la producción. La producción frutal con árboles autoincompatibles puede ser además errática y depende de las condiciones climáticas antes y durante la floración, y de la cantidad de polen producida cada año (Free, 1960). Muchos de esos inconvenientes pueden ser eliminados mediante el uso de variedades autocompatibles (Tehrani y Brown, 1992).

En cerezo, la aparición de la variedad Stella y otras variedades autocompatibles descendientes de esta han permitido el establecimiento de plantaciones monovarietales reduciendo considerablemente los inconvenientes que presenta la necesidad de variedades polinizadoras. Sin embargo, el creciente interés por las variedades autocompatibles y el origen común de las variedades autocompatibles actualmente utilizadas, hace necesario incorporar nuevas fuentes de incompatibilidad en los programas de mejora. El estudio de otras variedades autocompatibles de cerezo como son la variedad Cristobalina o la variedad italiana Bonnanaro (G. Nieddu, comunicación personal), puede dar respuesta a esta necesidad.

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es la aplicación de tecnologías moleculares en identificación y mejora de cerezo. Así, se pretende aplicar tecnologías de caracterización molecular, que permitan acelerar y optimizar los métodos actuales de caracterización varietal en cerezo. Al mismo tiempo, se pretende estudiar el carácter de incompatibilidad polen-pistilo en cerezo, mediante el desarrollo de técnicas moleculares que permitan establecer un sistema de identificación de grupos de incompatibilidad en esta especie y la caracterización de un mutante autocompatible que pueda ser usado en programas mejora. Así, la aplicación de marcadores moleculares en la caracterización de genotipos e incompatibilidad polen-pistilo en cerezo, permitirá agilizar y mejorar el establecimiento de protocolos de identificación y selección precoz de la autocompatibilidad y su posterior transferencia al sector productivo.

Objetivo 1. Identificación molecular de variedades y patrones de cerezo

Establecimiento de un sistema de identificación de variedades y patrones de cerezo mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN. Utilización de este método para la identificación los genotipos de las variedades y patrones de las colecciones de cerezo situadas en el SIA (Zaragoza) y en Barrado (Cáceres), así como para estudiar la similitud genética entre ellas.

Objetivo 2. Identificación de alelos de incompatibilidad polen-pistilo

Establecimiento de un método de identificación de alelos de incompatibilidad polen-pistilo en cerezo mediante la técnica de PCR. Identificación de los genotipos *S* de las variedades de las colecciones de cerezo situadas en el SIA (Zaragoza) y en Barrado (Cáceres). Caracterización molecular de nuevos alelos de incompatibilidad.

Objetivo 3. Caracterización de mutante autocompatible

Caracterización del origen de la mutación que otorga el carácter de autocompatibilidad a la variedad 'Cristobalina' para su uso posterior en programas de mejora y para profundizar en el conocimiento de la interacción polen-pistilo en especies con autoincompatibilidad gametofítica.

Este trabajo está dividido en dos partes principales; por un lado, identificación varietal y estudios de similitud genética, y por otro, incompatibilidad polen-pistilo. En la primera parte se ha estudiado el desarrollo y la aplicación de marcadores moleculares tipo microsatélite para la identificación y el estudio de la similitud genética de variedades (Capítulo 2) y patrones de cerezo (Capítulo 3) de las colecciones del SIA de Zaragoza. En la segunda parte se ha estudiado la incompatibilidad polen-pistilo, estableciéndose un método de identificación de alelos S en variedades de cerezo mediante PCR (Capítulo 4) y ambas metodologías han sido aplicadas para estudiar las variedades de cerezo del Valle del Jerte (Capítulo 5). Los nuevos alelos de incompatibilidad identificados en las variedades de cerezo analizadas en los Capítulos 4 y 5 han sido caracterizados mediante técnicas moleculares para corroborar su identidad (Capítulo 6). Finalmente, para completar el estudio de la incompatibilidad polen-pistilo en cerezo se ha llevado a cabo el estudio de un mutante autocompatible (la variedad Cristobalina) con el objetivo de caracterizar el origen de la mutación que le otorga el carácter de autocompatibilidad (Capítulo 7).

2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE CEREZO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE SSRs DESARROLLADOS EN MELOCOTONERO¹

INTRODUCCIÓN

La identificación de variedades ha estado basada tradicionalmente en la observación de los caracteres morfológicos. Sin embargo los marcadores moleculares permiten una identificación más precisa de los genotipos vegetales y son de gran interés para la caracterización de árboles frutales. Los trabajos relacionados con el uso de marcadores moleculares para la identificación de variedades de cerezo son escasos y limitados al empleo de isoenzimas (Granger *et al.*, 1993; Beaver *et al.*, 1995) y de RAPDs (Gerlach y Stösser, 1997). Sin embargo, los microsatélites (SSRs; Litt y Luly, 1989; Tautz, 1989) se están convirtiendo en los marcadores más utilizados con fines de identificación de genotipos debido al gran polimorfismo que revelan y a su buena reproducibilidad (Gupta y Varshney, 2000; Wünsch y Hormaza, 2002a). Entre los frutales de clima templado la mayoría de las secuencias que flanquean los microsatélites han sido clonadas y secuenciadas en melocotonero (Aranzana *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 1999; Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000) y manzano (Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998), especies en las cuales estas secuencias han sido usadas para la identificación de genotipos y para el estudio de la similitud genética. El principal inconveniente que plantea el empleo de microsatélites es la dificultad que implica su identificación. Sin embargo, se ha comprobado que las secuencias que flanquean los microsatélites frecuentemente están conservadas entre géneros y especies (Dirlewanger *et al.*, 2002; Downey y Iezzoni, 2000; Hormaza, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001). No obstante, los estudios de transportabilidad de microsatélites entre especies frutales de clima templado hasta ahora han incluido un número limitado de genotipos por lo que son necesarios trabajos a mayor escala que permitan validar su uso en las distintas especies.

¹Wünsch A, Hormaza JI. 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89:56-63. (Anexo 9)

Por lo tanto, en este capítulo se describe el análisis de 34 pares de cebadores desarrollados en melocotonero para caracterizar y estudiar la similitud genética entre 76 genotipos de cerezo que incluyen variedades antiguas de diversos orígenes geográficos y nuevos genotipos obtenidos en diferentes programas de mejora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído de 76 genotipos de cerezo (Tabla 2.1), que se encuentran en el Servicio de Investigación Agroalimentaria en Zaragoza, utilizando una versión modificada (Hormaza, 2002) del protocolo de extracción de ADN descrito por Doyle y Doyle (1987). Debido a la baja calidad del ADN extraído de hojas recogidas en otoño y a que las hojas frescas sólo están disponibles en primavera, el ADN genómico se extrajo de yemas en reposo recogidas entre noviembre y diciembre. El ADN de hojas recogidas en primavera se comparó con el obtenido de yemas en reposo para 10 genotipos. Así, para cada muestra se utilizaron de 8 a 10 yemas en reposo o 50 mg de hojas jóvenes que fueron trituradas en 400 µl tampón de extracción (100mM Tris HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 0.1% bisulfito de sodio) y mezcladas posteriormente con 0,4 µl de 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas durante 25 minutos a 65°C y posteriormente se mezclaron con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos. El sobrenadante fue separado después de la centrifugación y los ácidos nucleicos se precipitaron añadiendo 240 µl de isopropanol frío. El precipitado fue recuperado mediante un centrifugado a 13.000 g durante 5 minutos, lavado en 400 µl de tampón de lavado (10mM acetato de amonio en etanol al 76%), secado durante una noche y resuspendido en tampón MTE (10mM Tris HCl, 0,1mM EDTA). El ADN extraído fue cuantificado con un espectrofotómetro y diluido a una concentración de 10 ng/µl antes de su amplificación mediante PCR.

Tabla 2.1. Variedades de cerezo incluidas en el estudio con los genotipos de microsatélites obtenidos después de la amplificación con 9 pares de cebadores (detalles de los cebadores en Tabla 2.3).

Variedad	Origen*	pchgms1	pchcms3	pchcms5	UDP96- -005	UDP98- -409	UPD98- -021	UPD98- -022	UPD97- -402	UPD98- -412
Ambrunés	U, E	140	180/160	290	150/125	160/130	110/100	110/90	125	130
Arcina	BP, F	140	180	260	150/130	130	110/100	100/90	140/125	130
Belge	U, CE	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/90	130	130
Bing	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/90	130	130
Blanca de Provenza	U	140	180/160	290/260	120	130	100	105/90	145/125	130/100
Brooks	BP, US	140	180	290	150/120	130	110/100	90	135/125	130
Burlat	U, F	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130
Burlat C-1	BP, I	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130
Celeste (Sumpaca)	BP, C	140	180	290	150/130	130	110/100	100	135/125	130
Chinook	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110	145/130	130
Compact Stella	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	145/125	130
Coralise (Gardel)	BP, F	140	180	260	150/130	130	110/100	100/90	135/125	130
Corum	BP, US	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	140/130
Cristalina (Sumnue)	BP, C	190/140	180/160	260	150/120	130	110	110/100	135/125	130
Cristobalina	U, E	190/140	180	290/260	150/115	130	110/100	110/90	135/125	130
Duroni 3 (Cheleat)	U, I	140	180	290/260	150/115	130	110/100	100/90	125	130
Earlise (Riverdel)	BP, F	140	180	290/260	150/130	130	100	90	130/120	130
Earlystar	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	100	100/90	145/125	130
Early Van Compact	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Ferrovía	U, I	140	180	290/260	150/120	130	110	100	145/130	140/130
Garnet (Magar)	BP, US	140	180	260	120	130	110/100	110/90	130	130
Gil Peck	BP, US	190/140	180/160	260	150/120	130	110	110	145/130	130
Giorgia	BP, I	140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	125	130/120
Hartland	BP, US	140	180	260	150/120	130	110	100/90	140/130	130
Hedelfinger	U, CE	140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130/100
Lambert	BP, US	190/140	180/160	290/260	150/120	130	110/100	110	125	130
Lamida	BP, US	140	180	260	150/120	130	110	110	145/125	130
Lapins	BP, C	190/140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130
Larian	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110	110/100	145/130	130
Marmotte	U, F	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130/100
Marvin (Niram)	BP, US	140	180	290/260	120	130	110/100	100/90	130/125	130
Moreau	U, F	140	180	290/260	150/115	130	100	100/90	145/125	130
Napoleon	U, CE	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
Newstar	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	100	135/125	130/120
Pico Colorado	U, E	140	180/160	290/260	150/130	160/130	110/100	110	140/125	130
Pico Negro	U, E	140	180/160	290/260	150/115	160/130	100	110/90	140/120	130
Precoce Bernard	U, F	140	180	290/260	150/130	130	100	100/90	145/130	130
Rainier	BP, US	190/140	180	290/260	120	130	110/100	90	130	130

(continúa)

Variedad	Origen*	pchgms1	pchcms3	pchcms5	UDP96- -005	UDP98- -409	UPD98- -021	UPD98- -022	UPD97- -402	UPD98- -412
Ramon Oliva	U, F	140	180/160	290	150/130	130	100	90	120	130
Reverchon	U, I	140	180	290/260	150/115	130	110/100	100	125	130
Royalton	BP, US	190/140	180	260	150/130	130	100	110/100	135/125	130
Ruby	BP, US	190/140	180	260	120	130	110/100	110/90	130	130
Sam	BP, C	140	180/160	290/260	150/120	130	100	110/100	145/125	130
Samba (Sumste)	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/90	135/130	130
Santina	BP,C	190/140	180/160	290/260	150/130	130	100	110/100	135/125	130
Skeena	BP, C	190	180	290/260	150/120	130	100	90	145/125	130
Somerset	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	100	135/125	130/120
Sonata (Sumleta)	BP, C	190	180	290	150/120	130	100	100/90	145/125	130/120
Spalding	BP, US	190/140	180	260	150/130	130	110/100	110/100	135/125	140/130
Star	BP, C	190/140	180/160	260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
Stark. Hardy Giant	BP, US	140	180	260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130
Sue	BP, C	140	180/160	260	150/120	130	110	110/100	135/125	140/130
Sumesi (12S.8.33)	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	145/130	130
Summit	BP, C	140	180/160	290/260	150/120	130	110/100	100	125	130
Sunburst	BP, C	140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	145/130	130/120
Sweetheart	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130/120
Sylvia	BP, C	140	180/160	290	150/120	130	110/100	100	145/125	130
Taleguera Brillante	U, E	140	180/160	290/260	150/115	130	100	100/90	135	130
Tigre	U, F	140	180	290	150/115	130	110	110/90	120	130
Van	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Van spur	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Vega	BP, C	190/140	180	260	150/130	130	110	100/90	135/125	140/130
Vic	BP, C	140	180	260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	140/130
Vignola (Duron 2)	U, I	140	180	260	150/130	130	110	100	140/125	130
Vittoria	U, I	140	180	290/260	150/130	130	110	100/90	145/130	130/120
13N.7.19	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130/120
13S.17.20	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/90	130	130
13S.18.10	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
13S.18.15	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/100	135/125	130/120
13S.21.7	BP, C	140	180	290	150/130	130	110/100	100	135/125	130
13S.27.17	BP, C	140	180	260	150/120	130	110	100/90	135/125	140/130
13S.3.13	BP, C	190/140	180	290	150/120	130	100	110/100	145/130	130
44W.11.8	BP, C	190/140	180	260	150/120	130	110	110/100	145/130	130
83703007	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	100	100	145/120	130
84703002	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	130/120	130
84704006	BP, I	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130

* U: Pedigrí desconocido, BP: Programa de mejora, C: Canadá, CE: Centroeuropa, F: Francia, I: Italia, E: España, US: EEUU.

Amplificación mediante PCR y electroforesis

El ADN extraído fue amplificado mediante PCR utilizando 34 pares de cebadores de microsatélites desarrollados en melocotonero (Tablas 2.2 y 2.3). Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen de 20 μ l que contiene 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada cebador, 40 ng de ADN genómico, 0,45 unidades de ADN *Taq* polimerasa (Invitrogen) y una gota de aceite mineral. Las reacciones se hicieron en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.), usando el siguiente perfil: un ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C, y un ciclo final de 5 minutos a 72°C. Para los cebadores pchms1 y pchms3, la temperatura de anillamiento se redujo hasta 40°C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en geles al 3% de agarosa "Metaphor" (FMC Bioproducts) en tampón 1X TBE a 5 V/cm, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta. La estimación del tamaño de las bandas se llevó a cabo utilizando una marcador de tamaño de 10 pb (Invitrogen). Para confirmar los resultados, los microsatélites amplificados que presentaban diferencias menores de 5 pares de bases fueron además separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, 'Poly Acrilamide Gel Electrophoresis') al 10% en tampón 1X TBE, a una corriente constante de 40 mA, tinción con bromuro de etidio y visualización con luz ultravioleta.

Análisis de resultados

La heterocigosidad observada para cada locus fue calculada como el número de individuos heterocigotos del número total de individuos analizados para cada locus. Dicho valor fue dividido por el número de loci analizados para calcular la media. La relación genética entre los genotipos fue calculada mediante un análisis de agrupamiento utilizando el método UPGMA ('Unweighted Pairwise Group Method') a partir de la matriz de similitud obtenida de la proporción de fragmentos comunes (Nei y Li, 1979). Los coeficientes cofenéticos de los dendogramas fueron calculados a partir de una matriz cofenética. Todos estos calculos se efectuaron con el programa NTSYS-pc 2.02 (Exeter

Software). La solidez de cada dendograma obtenido a partir del análisis de agrupamiento UPGMA fue estimada mediante un análisis de 'bootstrap', realizando 2000 repeticiones con el programa WinBoot (Yap y Nelson, 1996).

RESULTADOS

De los 34 pares de microsatélites utilizados, 24 (70%) de ellos dieron lugar a amplificaciones en cerezo, de los cuales, 13 (38%) fueron polimórficos y nueve fueron seleccionados para la identificación de los 76 genotipos de cerezo (Tabla 2.2 y 2.3). Un ejemplo de la amplificación obtenida en tres loci con los cebadores de melocotonero utilizados, se encuentra en la Figura 2.1. No se detectaron diferencias entre los patrones de amplificación obtenidos entre las muestras de material fresco recogidas en primavera y las de yemas en reposo. La electroforesis con geles de poliacrilamida no desnaturizante confirmó los resultados obtenidos con agarosa 'Metaphor', pero no reveló bandas adicionales. De hecho, la electroforesis con poliacrilamida revela un mayor número de artefactos y bandas escalonadas, lo cual dificulta la identificación de los alelos de microsatélites comparado con la electroforesis en geles de agarosa.

De los 24 pares de cebadores que amplificaron loci poli- o monomórficos, 11 (45%) de ellos amplificaron alelos en el mismo rango de tamaño que los descritos en melocotonero para los mismos pares de cebadores (Tablas 2.2 y 2.3). Cuatro de los 13 loci polimórficos fueron desechados (pchms1, UPD98-024, UPD98-410) porque las diferencias entre las bandas eran demasiado pequeñas para diferenciarlas con precisión mediante electroforesis en geles de agarosa, o porque los patrones de bandas eran demasiado complejos (UPD98-411) para identificar un único locus. Tres pares de cebadores (pchms3, UPD98-409, UPD98-412) amplificaron alelos comunes para todos los genotipos analizados. El número de alelos por locus osciló entre 2 y 7, en un rango de 90 a 290 pb. La heterocigosidad osciló entre 0,04 y 0,94 para los locus UPD98-409 y UPD98-005 respectivamente, mientras que la heterocigosidad media fue de 0,49. La heterocigosidad para las 23 variedades más antiguas o de pedigrí desconocido fue de 0,49, mientras que la heterocigosidad para los restantes 53 genotipos fue de 0,47.

Tabla 2.2. Microsatélites que no amplificaron loci polimórficos o puntuables en los genotipos de cerezo.

<i>Locus</i>	<i>Referencia</i>	Estructura de la repetición en melocotonero	Rango de tamaños* (pb.)
pchcms1	Sosinski <i>et al.</i> (2000)	(CA) ₉ (TA) ₁₄ (GA) ₁₃	130-190
UPD98-024	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(GT) ₁₉ TC(TG) ₇	70-80
UPD98-411	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(TC) ₁₆	150-190
UPD98-410	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(AG) ₂₃	130-160
pchgms2	Sosinski <i>et al.</i> (2000)	(CT) ₂₄	135 n.p.
pchgms3	Sosinski <i>et al.</i> (2000)	(CT) ₁₄	190 n.p.
pchgms4	Sosinski <i>et al.</i> (2000)	(CT) ₂₁	150 n.p.
Pchcms2	Sosinski <i>et al.</i> (2000)	(CA) ₈	90 n.p.
UDP96-003	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(CT) ₁₁ (CA) ₂₈	85 n.p.
UDP96-008	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(CA) ₂₃	135-155 n.p.
UDP96-018	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(AC) ₂₁	265 n.p.
UDP96-019	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(TG) ₁₈ (AG) ₇	320 n.p.
UDP98-405	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(AG) ₉	105 n.p.
UDP98-406	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(AG) ₁₅	395 n.p.
UPD98-025	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(CA) ₁₉	70-95 n.p.
UPD98-407	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(GA) ₂₉	n.a.
UPD98-416	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(AG) ₁₈	n.a.
UDP96-001	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(CA) ₁₇	n.a.
UDP97-403	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(AG) ₂₂	n.a.
UPD96-010	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(GT) ₂₁ (GAGT) ₄ (GA) ₁₈	n.a.
UPD96-013	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(AG) ₂₂ (TG) ₈ TT(TG) ₁₀	n.a.
UPD96-015	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(CA) ₃₁	n.a.
UPD97-401	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(GA) ₁₉	n.a.
UPD98-408	Cipriani <i>et al.</i> (1999)	(CT) ₁₄	n.a.
UPD98-414	Testolin <i>et al.</i> (2000)	(TC) ₂₄	n.a.

* n.p.: no hubo polimorfismo; n.a.: no hubo amplificación

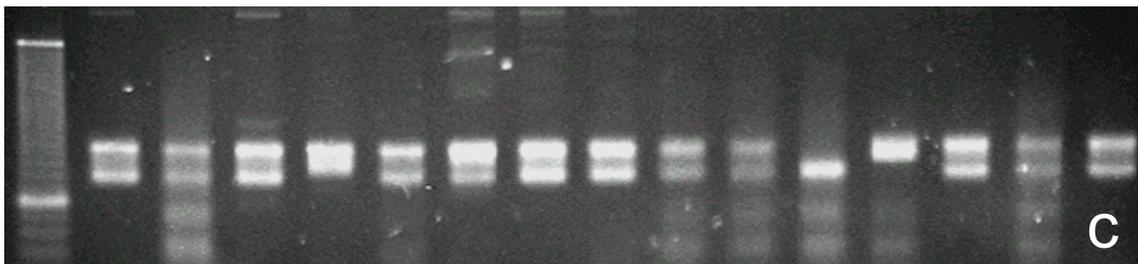
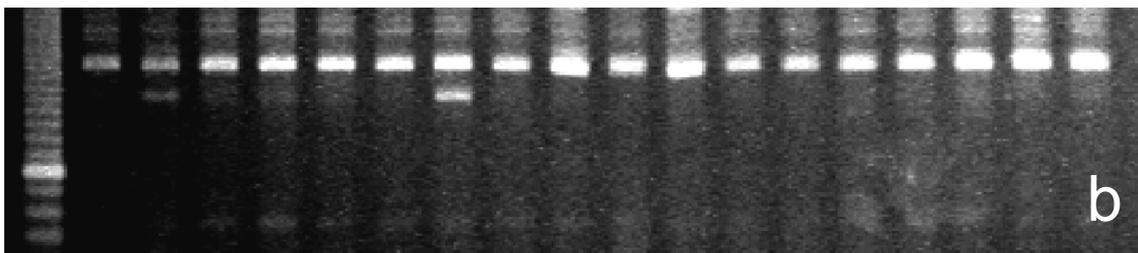
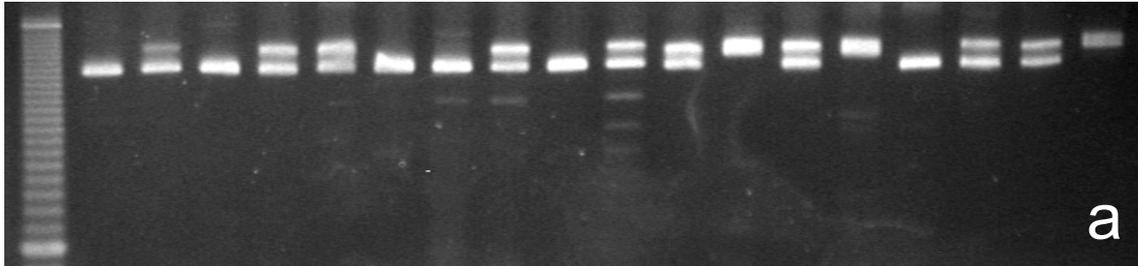
Tabla 2.3. Microsatélites utilizados para la identificación de los genotipos de cerezo.

<i>Locus</i>	Estructura de la repetición en melocotonero	Tamaño del producto en melocot. (pb.)	Tamaño del producto en cerezo. (pb.)	Nr. de alelos en melocot.	Nr. de alelos en cerezo	H
pchgms1 ^a	(AC) ₁₂ (AT) ₆	194	140-190	4	2	0.43
pchcms3 ^a	(CT) ₁₉	220	160-180	2	2	0.21
pchcms5 ^a	(CA) ₉ (TA) ₈	246	260-290	3	2	0.47
UDP96-005 ^b	(AC) ₁₆ TG(CT) ₂	155	120-150	4	5	0.94
UDP98-409 ^b	CA(CT) ₁₁ (AG) ₁₉	129	130-160	5	2	0.04
UPD98-021 ^c	(GA) ₂₂ (CA) ₁₁	145	100-110	2	2	0.52
UPD98-022 ^c	(TG) ₁₂ (AG) ₂₄	139	90-110	5	4	0.75
UPD97-402 ^b	(AG) ₁₇	136	120-150	3	7	0.81
UPD98-412 ^c	(AG) ₂₈	129	100-140	5	4	0.25

^a Sosinski *et al.* (2000). ^b Cipriani *et al.* (1999). ^c Testolin *et al.* (2000).

Los genotipos para los cuales se amplificó un único fragmento fueron considerados homocigotos para ese locus (Callen *et al.*, 1993). La herencia de los microsatélites fue revisada para los genotipos cuyo pedigrí es conocido y cuyos genotipos parentales estaban presentes en nuestra colección. En todos los casos las bandas presentes en la descendencia estaban presentes en al menos uno de los genotipos parentales. Con los pares de cebadores UPD98-409, UPD98-412, UPD97-402 y UPD98-022 se amplificaron alelos únicos para alguna variedad. Así todos los genotipos analizados presentan un alelo de 130 pb con el par de cebadores UPD98-409 y sólo ‘Ambrunés’, ‘Pico Negro’ y ‘Pico Colorado’ presentan una segunda banda de 160 pb. Asimismo, las variedades ‘Marmotte’, ‘Hedelfingen’ y ‘Blanca de Provenza’ comparten un alelo distinto del resto con el par de cebadores UPD98-412. Generalmente las variedades más antiguas como ‘Burlat’, ‘Marmotte’ o ‘Hedelfinger’, y las variedades locales españolas fueron las que contribuyeron en mayor medida a la presencia de alelos poco frecuentes.

Figura 2.1. Fragmentos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores de los loci de microsatélites de melcotonero ‘pchcms5’ (a), ‘pchcms3’ (b) y UPD96-005 (c), en 18 (a,b) y 15 (c) variedades de cerezo analizadas.



La combinación de los nueve cebadores seleccionados y de los 27 alelos polimórficos resultantes permitieron distinguir inequívocamente 72 (94%) genotipos. El análisis de agrupamiento reveló varios dendogramas posibles, de los cuales el de mayor correlación cofenética (0,66) se muestra en la Figura 2.2. Como era esperado los genotipos derivados de mutaciones no se pudieron distinguir de los genotipos originales ('Van Spur' y 'Early Van Compact' de 'Van', y 'Burlat C1' de 'Burlat'). Los otros genotipos que no se pudieron distinguir son dos pares de genotipos que tienen un pedigrí muy similar ('Celeste' y '13S.21.7', y 'Burlat' y '84704006'). La mayoría de los genotipos obtenidos en el mismo programa de mejora y/o que comparten parentales se agruparon juntos en el dendograma (Figura 2.2).

Debido a que la mayoría de los genotipos introducidos recientemente como resultado de distintos programas de mejora comparten genotipos parentales, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento con los 23 genotipos que no proceden de recientes programas de mejora. Estos genotipos incluyen las variedades antiguas de origen desconocido y los parentales de mejora que proceden directamente de otras variedades antiguas. En este análisis se obtuvo un único dendograma con una correlación cofenética de 0,70 (Figura 2.3). En este dendograma las 23 variedades se agruparon en dos grupos principales, que separan los genotipos originados en el norte de Europa y Norteamérica de aquellos que son originarios del sur de Europa.

DISCUSIÓN

En este capítulo se describe la caracterización genotípica de 72 variedades de cerezo utilizando los 27 marcadores tipo SSR obtenidos a partir de nueve pares de cebadores desarrollados en melocotonero. Los resultados confirman la eficacia de los marcadores tipo microsatélite con fines de identificación varietal. Además, los resultados también demuestran que los microsatélites están muy conservados entre melocotonero y cerezo, lo cual permite utilizar los mismos cebadores de SSR para detectar variación intra-específica en especies relacionadas, aunque la capacidad para amplificar loci y detectar polimorfismo de los mismos cebadores, normalmente decrece cuando la distancia genética

aumenta (Steinkellner *et al.*, 1997; White y Powell, 1997; Maguire *et al.*, 2000; Roa *et al.*, 2000).

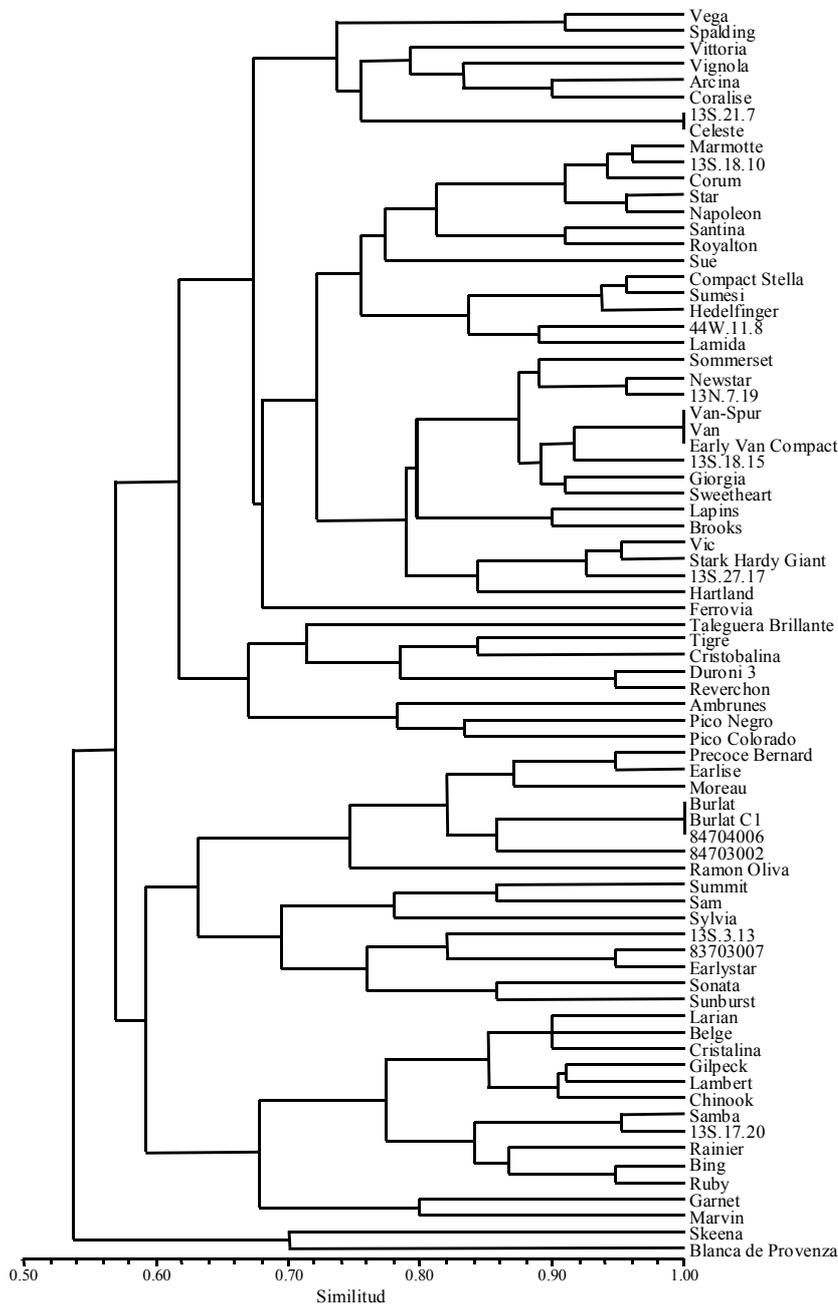
El hecho de que ambas fuentes de ADN, tanto las hojas como las yemas en reposo, producen ADN de suficiente calidad para la amplificación de microsatélites, permite llevar a cabo la caracterización de material vegetal en cualquier momento del año. La detección de los SSR mediante electroforesis en geles de poliacrilamida complica la identificación de los alelos principalmente por la presencia de los patrones de bandas escalonadas ('stutter') sin mejorar significativamente la resolución que se obtiene con agarosa de alta resolución. Además la utilización de PAGE consume más tiempo y es más tóxica que la electroforesis en geles de agarosa. Aunque un sistema automático de detección sería capaz de resolver la variación alélica con más precisión y, como consecuencia, el número de alelos detectados sería mayor que el descrito en este trabajo, para el análisis rutinario de genotipos utilizando SSR, la electroforesis con geles de agarosa es un método conveniente (Morgante *et al.*, 2001).

En este trabajo se ha obtenido amplificación en cerezo con 24 de los 34 (73%) microsatélites de melocotonero analizados, de los que 13 (38%) fueron polimórficos. Esta eficiencia es menor que la descrita recientemente para albaricoquero, donde el 88% de los microsatélites de melocotonero amplificaron loci, mientras que el 54% de ellos fueron polimórficos (Hormaza, 2002). Una probable explicación de estas diferencias puede deberse a las distintas posiciones del albaricoquero y del cerezo respecto al melocotonero en la filogenia del género *Prunus*. Así, estudios morfológicos (Westwood, 1993) apoyados también por estudios de la variación del ADN de cloroplastos (cpDNA) (Badenes y Parfitt, 1995) y de proteínas (Bortiri *et al.*, 2002) clasifican a las especies del género *Prunus* en cinco subgéneros (*Prunophora*, *Amygdalus*, *Cerasus*, *Padus* y *Laurocerasus*). Las principales especies cultivadas de *Prunus* pertenecen a tres de ellos: *Amygdalus* (melocotonero y almendro), *Prunophora* (ciruelo y albaricoquero) y *Cerasus* (guindos y cerezos). Los estudios del ADN de cloroplastos (Badenes y Parfitt, 1995) confirman la hipótesis (Watkins, 1976) de que los cerezos son genéticamente más distantes del melocotonero que el albaricoquero, dado que las especies del actual subgénero *Cerasus* se separaron antes que los otros dos subgéneros de las especies ancestrales de *Prunus*.

La heterocigosidad observada media de los loci polimórficos para el grupo de genotipos de cerezo analizado es 0,49, y varía entre 0,04 y 0,94. Aunque el cerezo es una especie alógama, la heterocigosidad descrita es similar a la descrita para otras especies de *Prunus* incluido el melocotonero (0,45, Sosinski *et al.*, 2000; 0,47, Testolin *et al.*, 2000) y el albaricoquero (0,51, Hormaza, 2002) utilizando marcadores SSR. Un bajo polimorfismo ha sido también detectado en cerezo por Stockinger *et al.* (1996) y Gerlach y Stösser (1997), usando marcadores RAPD, y por Boskovic y Tobutt (1998) y Beaver *et al.* (1995) con isoenzimas, lo cual probablemente refleja una estrecha base genética del germoplasma de cerezo.

Ni la variedad 'Burlat C1', una mutación de 'Burlat', ni 'Van Spur' o 'Early Van Compact', ambas mutaciones de 'Van', pudieron ser diferenciadas de 'Burlat' o 'Van', respectivamente. La imposibilidad de diferenciar mutantes que difieren del genotipo original en uno o unos pocos genes era de esperar dada la naturaleza de los SSR, ya que es altamente improbable que los microsatélites amplificados correspondan a la zona de ADN mutada, cuando han sido aislados aleatoriamente de todo el genoma. El caso de los otros de pares de genotipos que no se pudieron distinguir, 'Celeste' y '13S.21.7', y '84704006' y 'Burlat', se puede explicar con la información disponible que describe su pedigrí. 'Celeste' y '13S.21.7' se originaron del cruce de 'Van' y 'Newstar', y '84704006' descende del cruce de 'Burlat' y 'Sunburst'. En el primer caso, los dos genotipos parece que han heredado los mismos alelos para los loci analizados, y en el segundo, la segregación de los alelos ha resultado en el mismo perfil de bandas que el parental 'Burlat'. El uso de un mayor número de SSR recientemente desarrollados en *Prunus* (Aranzana *et al.*, 2002, Cantini *et al.*, 2001; Downey y Iezzoni, 2000; Dirlewanger *et al.*, 2002) puede permitir discriminar entre los genotipos más relacionados genéticamente.

Figura 2.2. Dendograma de 76 variedades de cerezo incluidas en el estudio basado en un análisis de agrupamiento UPGMA utilizando la matriz de similitud generada con el coeficiente de Nei y Li después de la amplificación con 9 pares de microsatélites.



El hecho de que varios de los genotipos analizados tengan parentales o antepasados comunes da lugar a la generación de distintos dendogramas posibles, por lo que estos se

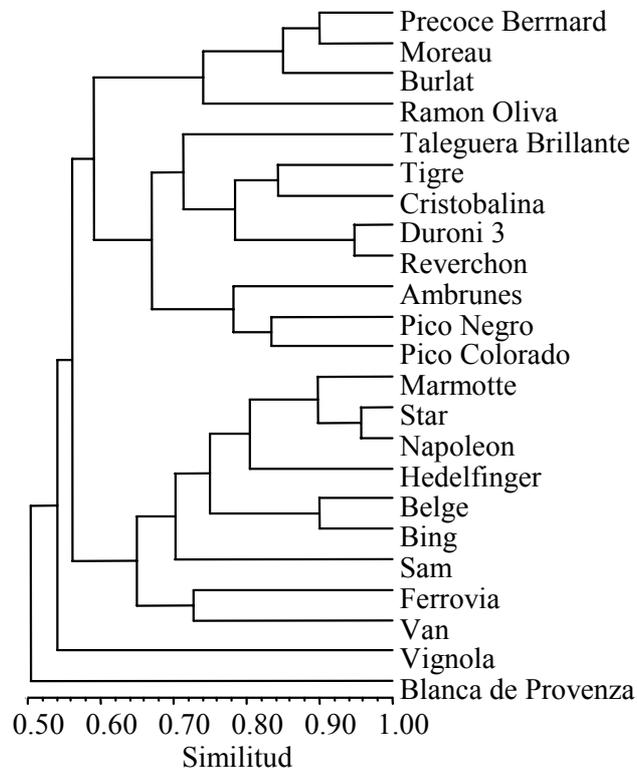
clasificaron de acuerdo con su coeficiente de correlación cofenética. El dendograma que presenta un mayor valor de dicho coeficiente ilustra la identificación de los genotipos estudiados y los agrupa de acuerdo con su pedigrí (Figura 2.2). Sin embargo, una mejor representación de las relaciones de similitud se obtiene cuando el análisis se realiza únicamente con los 23 genotipos que incluyen las variedades más antiguas de origen desconocido y los parentales de mejora que derivan directamente de otros cultivares antiguos (Figura 2.3). En este caso, sólo se obtiene un dendograma posible mediante el análisis UPGMA aunque la escasez de marcadores disponibles resulte en un bajo valor cofenético y de análisis de 'bootstrap'. Es de preveer que esta situación cambiará probablemente cuando otros SSR desarrollados en *Prunus* sean analizados en cerezo.

Este dendograma agrupa las 23 variedades en dos grupos principales de acuerdo con su área geográfica de origen y su área de cultivo, lo que probablemente refleja la selección local de los mejores genotipos. Un grupo contiene genotipos del Sur de Europa y el otro contiene variedades que principalmente se originaron en el Norte y Centro de Europa o en Norteamérica pero que derivan de antiguos genotipos del Norte de Europa. La variedad 'Blanca de Provenza', que es la única de la colección estudiada que produce cerezas con la pulpa y piel de color crema-amarillo, aparece separada de los dos grupos junto con la variedad italiana 'Vignola'. Es interesante resaltar que dentro del grupo que comprende las variedades del Sur de Europa, las variedades analizadas originarias de la región Española de Extremadura ('Ambrunés', 'Pico Negro' y 'Pico Colorado'), se agrupan juntas. Otro subgrupo está formado por algunas variedades francesas ('Precoce Bernard', 'Moreau', y 'Burlat'), que se obtuvieron en la región francesa del Ródano entre finales del siglo XIX y principios del XX (Hedrick *et al.*, 1915; Societé Pomologique de France, 1927, 1947). La variedad 'Ramon Oliva', que se agrupa cercana a las tres variedades francesas, aunque a veces se ha descrito que es de origen español (Bargioni, 1996), parece que proviene de la región de Angers en Francia (Hedrick *et al.*, 1915). 'Duroni 3' y 'Reverchon', que se agrupan cercanas entre sí, fueron ambas llevadas a Francia desde Italia (Ctifl, 1990; Bargioni, 1996), mientras que 'Taleguera Brillante', 'Cristobalina' y 'Tigre' tienen un origen incierto. Se cree que 'Tigre' procede también de Francia (Societé Pomologique de France, 1927), mientras que 'Cristobalina', originaria del Este de España, es morfológicamente diferente y geográficamente separada del resto de las

variedades españolas analizadas. De hecho es una variedad autocompatible (Hugard, 1978) y la que presenta la floración más temprana de todas las estudiadas.

El segundo grupo principal incluye las variedades del norte y centro de Europa como ‘Marmotte’ (Norte de Francia), ‘Napoleon’ (Centro Europa) y ‘Hedelfinger’ (Centro de Europa, probablemente de Alemania) y otras variedades más recientes originadas en el norte de América o Europa pero derivadas de variedades del norte de Europa: ‘Star’ de la polinización libre de ‘Deacon’, ‘Sam’ de la polinización abierta de una semilla de ‘Windsor’ (encontrado en Ontario, Canada), ‘Bing’ de una semilla de ‘Republican’ (a su vez, probablemente una semilla de Napoleon) y ‘Van’ de polinización libre de ‘Empress Eugenie’ (Norte de Francia) (Hedrick *et al.*, 1915; Societé Pomologique de France, 1924; Ctifl, 1990; Bargioni, 1996; Brooks y Olmo, 1952, 1997). Una variedad del sur de Europa, ‘Ferrovia’, concretamente de la región italiana de Bari, también se encuentra en este subgrupo.

Figura 2.3. Dendograma de 23 variedades de cerezo antiguas o derivadas directamente de variedades tradicionales basado en un análisis de agrupamiento UPGMA utilizando la matriz de similitud generada con el coeficiente de Nei y Li después de la amplificación con 9 pares de microsatélites.



3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PATRONES DE CEREZO MEDIANTE MICROSATÉLITES

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente los patrones frutales han sido obtenidos a partir de semillas de la misma especie que la variedad, pero actualmente la pomología moderna demanda un desarrollo continuo de nuevos patrones clonales para poder satisfacer las necesidades de uniformidad y control del tamaño de los árboles. Como consecuencia, la disponibilidad de métodos de identificación fiables es cada vez más necesaria. Sin embargo, el proceso de identificación de los patrones utilizando los métodos de caracterización tradicionales es aún más complicado que el de las variedades debido a la ausencia de caracteres fenotípicos descriptivos una vez que el patrón ha sido injertado. Aunque el uso de marcadores de ADN puede optimizar en gran medida este proceso, hay escasos ejemplos de la aplicación de marcadores moleculares para la identificación de patrones frutales y la mayoría de ellos han sido llevados a cabo con marcadores RAPD (revisado en Serrano *et al.*, 2002). Por ello, en este capítulo se describe la posibilidad de utilizar marcadores microsatélites para la identificación molecular de patrones de cerezo.

La mayoría de los patrones de cerezo comerciales disponibles actualmente pertenecen o son cruces interespecíficos de tres especies de *Prunus*: *P. avium*, *P. mahaleb* y *P. cerasus*. Con el objetivo de encontrar loci de microsatélites que estén conservados en las especies usadas como patrones de cerezo, en este trabajo se ha utilizado un grupo de nueve cebadores de SSR seleccionados para identificar 17 genotipos representativos de la diversidad actual de patrones para esta especie que comprenden varias especies e híbridos interespecíficos. Los genotipos estudiados incluyen las especies *P. avium*, *P. cerasifera*, *P. cerasus*, *P. mahaleb*, y los híbridos interespecíficos *P. mahaleb x P. avium*, *P. avium x P. pseudocerasus*, and *P. cerasus x P. canescens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ADN de 17 patrones de cerezo (Tabla 3.1) que se encuentran en las fincas del Servicio de Investigación Agroalimentaria en Zaragoza se extrajo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando nueve cebadores de microsatélite seleccionados (Tabla 3.2) y desarrollados en melocotonero (Aranzana *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 1999; Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000). La amplificación mediante PCR, la electroforesis en geles de agarosa y los estudios de similitud genética se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el capítulo anterior (Wünsch y Hormaza, 2002b).

Tabla 3.1. Patrones de cerezo incluidos en el estudio.

Patrón	Especie	Origen
Santa Lucía 64	<i>P. mahaleb</i>	INRA, Burdeos (Francia)
Santa Lucía 405	<i>P. mahaleb</i>	INRA, Burdeos (Francia)
Colt	<i>P. avium x P.pseudocerasus</i>	East Malling, (Reino Unido)
Pontaris	<i>P. avium</i>	INRA, Burdeos (Francia)
Pontavium	<i>P. avium</i>	INRA, Burdeos (Francia)
Masto Montañana	<i>P. cerasus</i>	SIA, Zaragoza (España)
F12/1	<i>P. avium</i>	East Malling (Reino Unido)
Masto San Juan	<i>P. cerasus</i>	SIA, Zaragoza (España)
Masto Villamayor	<i>P. cerasus</i>	SIA, Zaragoza (España)
Cab 6P	<i>P. cerasus</i>	Bolonia (Italia)
Cab 11E	<i>P. cerasus</i>	Bolonia (Italia)
San Adrian 5	<i>P. cerasifera</i>	SIA, Zaragoza (España)
San Adrian 4	<i>P. cerasifera</i>	SIA, Zaragoza (España)
Maxma 14	<i>P. mahaleb x P. avium</i>	Oregon (EEUU)
Maxma 97	<i>P. mahaleb x P. avium</i>	Oregon (EEUU)
Stockton Morello	<i>P. cerasus</i>	Illinois (EEUU)
Gisela 6	<i>P. cerasus x P. canescens</i>	Giessen (Alemania)

Tabla 3.2. Microsatélites utilizados para la identificación de los genotipos.

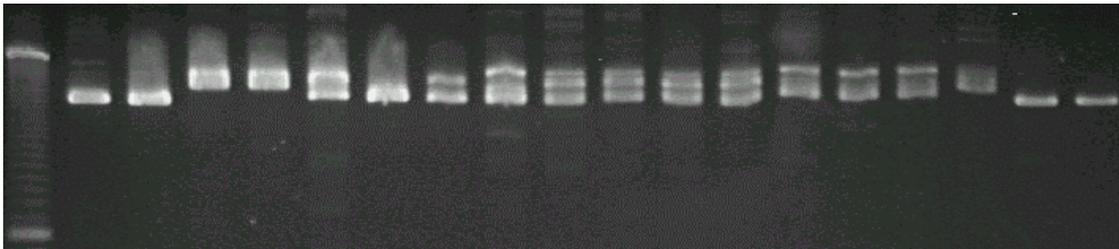
<i>Locus</i>	Nr. alelos	Rango (pb.)	Referencia
pchgms1	10	130-200	Sosinski <i>et al.</i> 2000
pchcms5	5	240-290	Sosinski <i>et al.</i> 2000
UDP96-005	7	110-150	Cipriani <i>et al.</i> 1999
UPD97-402	5	120-160	Cipriani <i>et al.</i> 1999
UPD98-021	4	100-120	Testolin <i>et al.</i> 2000
UPD98-022	8	80-170	Testolin <i>et al.</i> 2000
UDP98-409	9	120-165	Cipriani <i>et al.</i> 1999
UPD98-412	8	90-140	Testolin <i>et al.</i> 2000
CPPCT-6	6	180-210	Aranzana <i>et al.</i> 2002

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los nueve loci microsatelite utilizados en este estudio fueron seleccionados debido a su polimorfismo entre variedades de cerezo (ver Capítulo 2; Wünsch y Hormaza, 2002b), y todos ellos amplificaron loci polimórficos entre las especies e híbridos interespecíficos analizados. Un ejemplo de la amplificación y resolución obtenida con el cebador ‘pchcms5’, después de la electroforesis en un gel de agarosa se puede ver en la Figura 3.1.

Los nueve pares de cebadores amplificaron un total de 62 alelos (Tabla 3.2) que han permitido identificar 15 genotipos únicos de los 17 genotipos analizados. No fue posible diferenciar los dos genotipos de la serie ‘M x M’, Maxma Delbard 14 (Brokforest) y Maxma Delbard 97 (Brokgrove), y dos selecciones de *P. cerasus* (Masto de Montaña y Masto de San Juan). Estos resultados no son inesperados puesto que los dos genotipos ‘Maxma’, proceden de semillas de la polinización libre de *P. mahaleb*, por lo que son genéticamente muy próximos, y los otros dos genotipos de *P. cerasus* fueron recolectados en la misma localidad. El análisis de agrupamiento (Figura 3.2), agrupó a los genotipos de acuerdo a su clasificación taxonómica, con un grupo principal que incluye todos los genotipos de *P. avium* o *P. cerasus*, separado de otros dos grupos menores que contienen los genotipos de *P. mahaleb* y *P. cerasifera*.

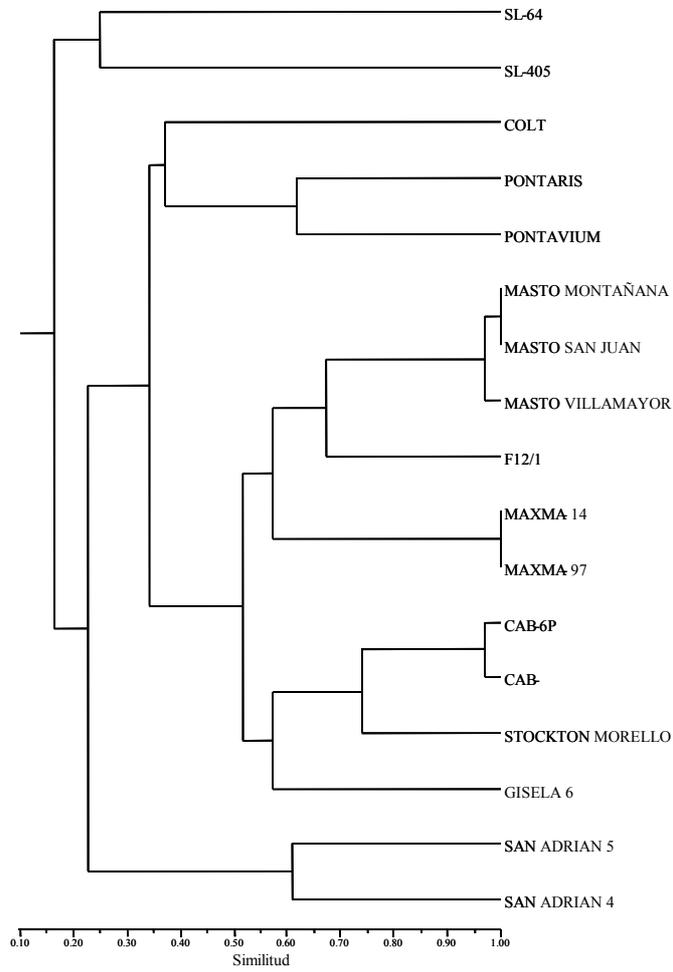
Figura 3.1. Fragmentos de amplificación obtenidos con el locus de melocotonero pchcms5 en 18 patrones de cerezo.



Los resultados confirman la eficacia de los SSR para la identificación de genotipos y demuestran la posibilidad transportar secuencias de microsatélites en el género *Prunus*, lo cual probablemente indica que la distancia genética entre la mayoría de las especies del género es pequeña (Serrano *et al.*, 2002). Ello permite el uso de los microsatélites de *Prunus* actualmente disponibles, principalmente de melocotonero, para la identificación molecular de genotipos que pertenecen a otras especies del género, eliminando la necesidad de desarrollar microsatélites para cada especie.

La posibilidad de discriminar entre los diferentes patrones analizados tiene consecuencias prácticas importantes para un control eficiente de la propagación de patrones, puesto que actualmente es prácticamente imposible distinguir entre los patrones una vez han sido injertados debido a la ausencia de caracteres fenotípicos. Ya que los patrones se propagan vegetativamente, el uso de marcadores moleculares como los SSR pueden ser incorporados en los procesos de propagación, para asegurar la identidad correcta del material. Es más, la aplicación de estos marcadores para estudios de similitud genética será de gran utilidad para los mejoradores de patrones para maximizar la diversidad a la hora de elegir parentales para realizar los cruzamientos.

Figura 3.2. Dendrograma de 17 patrones de cerezo incluidos en el estudio basado en un agrupamiento UPGMA de los datos de similitud.



4. IDENTIFICACIÓN DE LA CONSTITUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS *S* DE VARIEDADES DE CEREZO MEDIANTE PCR

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las variedades de cerezo son autoincompatibles y muchas de ellas son también interincompatibles (Crane y Lawrence, 1929). El mecanismo de incompatibilidad polen-pistilo en cerezo y otras especies frutales en las que opera la incompatibilidad gametofítica implica que el cuajado dependa de la disponibilidad de polen compatible. Como consecuencia, el conocimiento de la constitución alélica *S* y la asignación de las variedades a los distintos grupos de incompatibilidad es esencial para el establecimiento de plantaciones productivas de cerezo y para desarrollar de manera eficiente programas de mejora en esta especie.

Tradicionalmente, las relaciones de compatibilidad entre variedades y la asignación de estas a los distintos grupos de incompatibilidad se ha llevado a cabo mediante ensayos de polinización y la observación de tubos polínicos con el microscopio (Linskens y Esser, 1975). Sin embargo, a partir del aislamiento y caracterización de las ribonucleasas *S* de almendro (Tao *et al.*, 1997), manzano (Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1994), peral Japonés (Sassa *et al.*, 1993; Ishimizu *et al.*, 1998) y cerezo (Tao *et al.*, 1999a), se han desarrollado métodos moleculares y bioquímicos para llevar a cabo la identificación de los alelos *S* y la asignación en grupos de incompatibilidad de las diferentes variedades de estas especies frutales. Así, en manzano, la identificación de alelos *S* se ha llevado a cabo utilizando análisis de proteínas (Bösković y Tobutt, 1999) y mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada alelo en combinación con digestiones de restricción (Janssens *et al.*, 1995). En almendro otro método de identificación de alelos *S* está basado en análisis mediante PCR con cebadores alelo-específicos (Tamura *et al.*, 2000), mientras que en peral Japonés se ha utilizado PCR pero con cebadores diseñados en las zonas conservadas de las ribonucleasas, combinado con digestiones de restricción (Ishimizu *et al.*, 1999).

En cerezo se han identificado hasta el momento 20 alelos *S* y 22 grupos de incompatibilidad utilizando diferentes métodos (Tobutt *et al.*, 2001). Como en otras especies que presentan GSI, inicialmente la asignación de las variedades de cerezo a los grupos de incompatibilidad se realizó mediante ensayos de cruzamientos (Crane y Brown, 1937; Matthews y Dow, 1969; Tehrani y Brown, 1992). Posteriormente, la identificación de alelos *S* se ha llevado a cabo mediante la separación de extractos de proteínas estilares utilizando isoelectroenfoque y tinción para actividad ribonucleasa (Bösković y Tobutt, 1996, 2001). El reciente aislamiento de las secuencias de cDNA de varias ribonucleasas *S* de cerezo (Sonneveld *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 1999a; Wiersma *et al.*, 2001) ha permitido identificar los alelos *S* mediante PCR, ya sea utilizando cebadores de zonas conservadas (Tao *et al.*, 1999a; Wiersma *et al.*, 2001) o cebadores específicos para cada alelo (Sonneveld *et al.*, 2001), mediante PCR-RFLPs (Yamane *et al.*, 2000) o mediante RFLPs (Hauck *et al.*, 2001). Por otra parte, el aislamiento del ADN genómico de varias ribonucleasas *S* de cerezo (Tao *et al.*, 1999b; Wiersma *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2000) ha revelado que los dos intrones que se encuentran en la secuencia de cada ribonucleasa de cerezo tienen un tamaño diferente para cada alelo. Esta variabilidad en el tamaño de los intrones es la base para la identificación de alelos *S* de cerezo mediante PCR utilizando cebadores conservados, ya que estos cebadores abarcan el primer o el segundo intrón o ambos amplificando así fragmentos de diferente tamaño para cada alelo (Tao *et al.*, 1999a; Wiersma *et al.*, 2001).

En este capítulo se describe la utilización de la técnica de PCR combinando diferentes cebadores de las zonas conservadas de las ribonucleasas de cerezo para identificar los alelos *S* de 71 variedades de cerezo que incluyen 26 variedades cuyo genotipo *S* no ha sido descrito previamente y para compilar las bases de un sistema de identificación de alelos *S* en cerezo mediante PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las variedades de cerezo ‘Summit’ (S_1S_2), ‘Bing’ (S_3S_4), ‘Hedelfingen’ (S_3S_5), ‘Hartland’ (S_3S_6), ‘Burlat’ (S_3S_9), ‘Charger’ (S_7S_7), ‘Orleans 171’ ($S_{10}S_{11}$), ‘Schneiders’ (S_3S_{12}) y ‘Noble’ (S_6S_{13}) cuyo genotipo S es conocido, fueron seleccionadas como variedades control para establecer el tamaño amplificado mediante PCR para cada una de sus correspondientes ribonucleasas S . Estas variedades pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad que han sido confirmados en diferentes trabajos (Bošković y Tobutt 1996, 2001; Matthews y Dow, 1969; Sonneveld *et al.*, 2001; Tehrani y Brown, 1992; Wiersma *et al.*, 2001) y su constitución alélica S contiene los diferentes alelos que han sido descritos en cerezo. Utilizando los mismos cebadores de PCR se analizó el genotipo S de otras 62 variedades de cerezo (Tabla 4.1). El material vegetal analizado fue recogido de los campos experimentales del Servicio de Investigación Agroalimentaria, de la Diputación General de Aragón en Zaragoza. Cuatro variedades que fueron utilizadas como variedades de referencia (‘Charger’, ‘Orleans 171’, ‘Schneiders’ y ‘Noble’) fueron cedidas por K. Tobutt (HRI, East Malling). La nomenclatura S utilizada en este trabajo es la definida por Tobutt *et al.* (2001).

Extracción de ADN genómico y amplificación de alelos S mediante PCR

El ADN genómico de cada variedad fue extraído siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2 utilizando hojas jóvenes o yemas en reposo como material de partida. Los alelos S de cada variedad fueron identificados mediante PCR utilizando los pares de cebadores PruT2-PruC4R, PruC2-PruC4R (Tao *et al.*, 1999a) y SI31-SI32, SI19-SI20 (Wiersma *et al.*, 2001), y las combinaciones adicionales SI31-SI20, PruC2-SI20, SI19-PruC4R y PruT2-SI32. Además se utilizó otro cebador nuevo (C5Rev; 5' a 3': TACCACTTCATGTAACAA) diseñado en la zona conservada C5 de las ribonucleasas S de cerezo, a partir de la alineación de las secuencias de ADN de 10 ribonucleasas (ver Capítulo 6). Un cebador similar fue diseñado por Tao *et al.* (1999a) a partir del dominio C5

de las ribonucleasas de Solanáceas. El cebador C5Rev se utilizó en combinación con el cebador PruC2 (Tabla 4.2).

La amplificación mediante PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l constituido por 20 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada cebador, 40 ng ADN genómico y 0,45 unidades de ADN *Taq* polimerasa (Invitrogen), utilizando el siguiente programa de temperaturas: un ciclo inicial de 94°C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C y 2 minutos a 72°C, y un último ciclo de 7 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1,7% con TBE, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta utilizando el marcador de tamaño 1Kb (Invitrogen). Debido al menor tamaño de los productos de amplificación obtenidos con el par de cebadores PruT2-SI32, el análisis de estos se llevó a cabo utilizando el protocolo anterior pero la electroforesis se realizó en agarosa de alta resolución (Metaphor, Bioproducts) al 2%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describe la utilización de la técnica de PCR con cebadores derivados de las zonas conservadas de las ribonucleasas *S* de cerezo para identificar el genotipo *S* de distintas variedades de esta especie. Los tamaños de los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos utilizando las diferentes combinaciones de pares de cebadores en las variedades de referencia (Tabla 4.2) fueron empleados como control para identificar el genotipo *S* del resto de variedades analizadas. Utilizando este método ha sido posible identificar los alelos *S* y sus correspondientes grupos de incompatibilidad de 26 variedades cuyo genotipo *S* no había sido descrito previamente y confirmar la constitución alélica *S* de otras 36 variedades adicionales (Tabla 4.1). Además ha sido posible identificar 4 posibles nuevos alelos de incompatibilidad en cerezo.

La amplificación de los diferentes alelos utilizando las combinaciones de los cuatro cebadores ‘forward’ (PruT2, PruC2, SI19, SI31) y los cuatro cebadores ‘reverse’ (PruC4R,

SI-20, SI-32, C5Rev) reveló que las combinaciones más útiles para la identificación de los alelos S de cerezo utilizando las condiciones de PCR descritas son PruT2-SI32, PruC2-PruC4R, PruT2-PruC4R, SI19-SI20 y PruC2-C5Rev (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3). Asimismo se observó que, aunque PruT2 y SI31 corresponden a la misma secuencia, la amplificación fue más eficiente utilizando PruT2 que utilizando SI31, ya fuera en combinación con SI20 o con SI32, probablemente debido a que SI31 es un cebador degenerado. También se observó que el par más útil es PruT2-SI32 ya que es el único par de cebadores que amplifica todos los alelos S (Tabla 4.2). Sin embargo, aunque se obtiene una buena resolución utilizando geles de agarosa estándar al 2%, debido al tamaño de los fragmentos que varían aproximadamente entre 400 y 550 pares de bases, se obtiene una mejor resolución utilizando geles de agarosa de alta resolución a la misma concentración (Figura 4.2). Este par de cebadores, PruT2-SI32, es también de gran utilidad para la identificación de alelos de gran tamaño, como S_2 , que, normalmente, son más difíciles de amplificar con otras combinaciones de pares como PruT2-PruC4R (2498 pb) o SI19-SI20 (2154 pb).

Aunque en la mayoría de las variedades estudiadas fue posible identificar los dos alelos S , en la variedad Vignola sólo se pudo identificar uno (Tabla 4.1). Además, algunos alelos (S_5 , S_7 , S_{11} , S_{13} y S_{24}) sólo pudieron ser amplificados con las combinaciones PruT2-SI32 o PruC2-C5Rev, pero no pudieron ser amplificados con el resto de pares de cebadores. Esta falta de amplificación o la imposibilidad de visualizar un alelo puede estar causada por varias razones. 1) La presencia de discordancias entre la secuencia de ADN del cebador y la del alelo que se pretende amplificar puede dar lugar a un anillamiento ineficiente en la reacción de PCR y, como consecuencia, la amplificación será deficiente o inexistente. Un ejemplo de esta situación es el alelo S_{24} ; la secuenciación de este alelo (ver Capítulo 6) ha revelado la presencia de 5 discordancias en el sitio de anillamiento del cebador SI-19 y, por tanto, este alelo no ha podido ser amplificado utilizando este cebador aunque sí ha podido ser amplificado utilizando cebadores alternativos. 2) Cuando dos alelos tienen un tamaño muy similar, los fragmentos obtenidos mediante PCR pueden ser difíciles de distinguir utilizando el protocolo normal de resolución mediante electroforesis. Este es el caso de los alelos S_6 y S_{24} que difieren en 20 pb y que, por lo tanto, no pueden ser diferenciados mediante la amplificación con PruT2-PruC4R y PruC2-PruC4R. Sin embargo, estos dos alelos se pueden diferenciar amplificándolos con los cebadores PruT2-

SI32 o SI31-SI32. 3) En algunos casos se puede producir una amplificación preferencial de un alelo frente a otro (Brace *et al.*, 1993). Así, una diferencia significativa del contenido de GC de los dos alelos que se pretenden amplificar o de la secuencia de ADN adyacente a estos, puede producir una desnaturalización ineficiente de las hebras de ADN de uno de los alelos (Walsh *et al.*, 1992). Este podría ser el caso del alelo S_{24} que no se puede amplificar con los cebadores PruT2-PruC4R o PruC2-PruC4R, en combinación con el alelo S_3 en la variedad ‘Garrafal’ (ver Capítulo 5; Wünsch y Hormaza, 2003), cuando la secuenciación del alelo S_{24} ha confirmado la conservación de las secuencias de ADN en las zonas complementarias a estos cebadores (ver Capítulo 6).

Tabla 4.1. Grupos de incompatibilidad polen-pistilo identificados mediante PCR en las variedades de cerezo analizadas. En negrita las variedades y grupos cuya composición alélica no ha sido descrita previamente. Nomenclatura según Tobutt *et al.* (2001). SC: Variedad autocompatible, O: Donante Universal

Grupo de incomp.	Genotipo	Variedad
I	S_1S_2	Summit, Starking Hardy Giant
II	S_1S_3	Cristalina, Gil-Peck, Lamida, Samba, Van, Van Spur, Early Van Compact, Ruby, Tigré
III	S_3S_4	Bing, Lambert, Napoleon, Sommerset, Star, Belge, Marmotte
IV	S_2S_3	Sue, Vega, Coralise
VI	S_3S_6	Hartland, Ambrunés, Duroni 3 , Pico Negro
VII	S_3S_5	Hedelfingen
IX	S_1S_4	Chinook, Rainier, Sylvia, Garnet , Viscount
X	S_6S_9	Ramon Oliva
XII	S_6S_{13}	Noble
XIII	S_2S_4	Sam, Vic, Spalding, Corum , Royalton
XVI	S_3S_9	Burlat, Burlat C-1 , Moreau, Precoce Bernard
XVII	S_4S_6	Larian
XVIII	S_1S_9	Brooks, Marvin 4-70, Earlise
XIX	S_3S_{13}	Reverchon
XXII	S_3S_{12}	Ferrovia , Schneiders
XXIII	S_2S_6	Arcina
SC	S_3S_6	Cristobalina, Temprana de Sot
SC/O	S_3S_4	Newstar, Sonata, Compact Stella, Sunburst, Sweetheart
SC/O	S_1S_4	Celeste, Lapins, Santina
O	S_1S_7	Charger
O	$S_{10}S_{11}$	Orleans 171
O	S_6S_{24}	Pico Colorado
O	S_3S_{23}	Vittoria
O	$S_{TB}S_{25}$	Taleguera Brillante
O	S_1S_{BP}	Blanca de Provenza
-	S_6	Vignola

Figura 4.1. Amplificación de alelos de incompatibilidad de las variedades Summit (S_1S_2), Gilpeck (S_1S_3), Chinook (S_1S_4), Sue (S_2S_3), Sam (S_2S_4), Royalton (S_2S_4), Lambert (S_3S_4), Burlat (S_3S_9), Hartland (S_3S_6), Ramon Oliva (S_5S_6), Cristobalina (S_3S_6) y Brooks (S_1S_9) con los cebadores PruC2-PruC4R. El alelo S_2 no es visible.

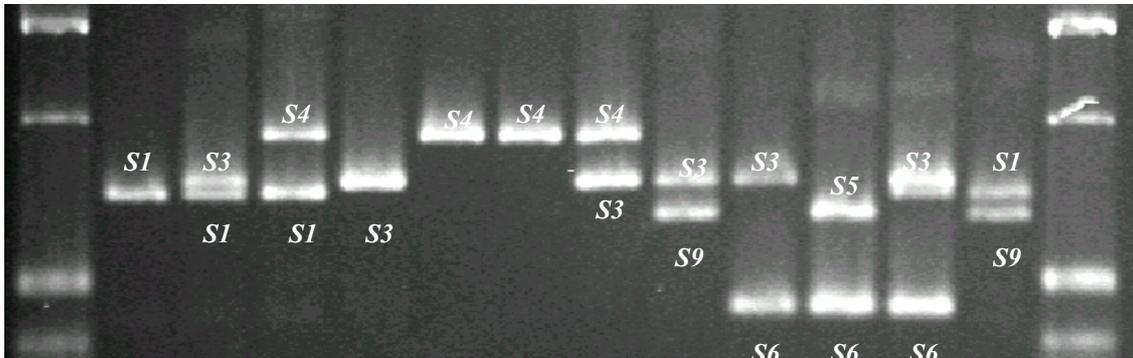


Figura 4.2. Amplificación de alelos de incompatibilidad de las variedades Summit (S_1S_2), Bing (S_3S_4), Hedelfingen (S_3S_5), Hartland (S_3S_6), Charger (S_1S_7), Burlat (S_3S_9), Orleans 171 ($S_{10}S_{11}$), Schneiders' (S_3S_{12}), Noble (S_6S_{13}), Vittoria (S_3S_{23}), Pico Colorado (S_6S_{24}) y Talaguera Brillante ($S_{TB}S_{25}$) con los cebadores PruT2-SI32. Electroforesis en agarosa Metaphor al 2%.

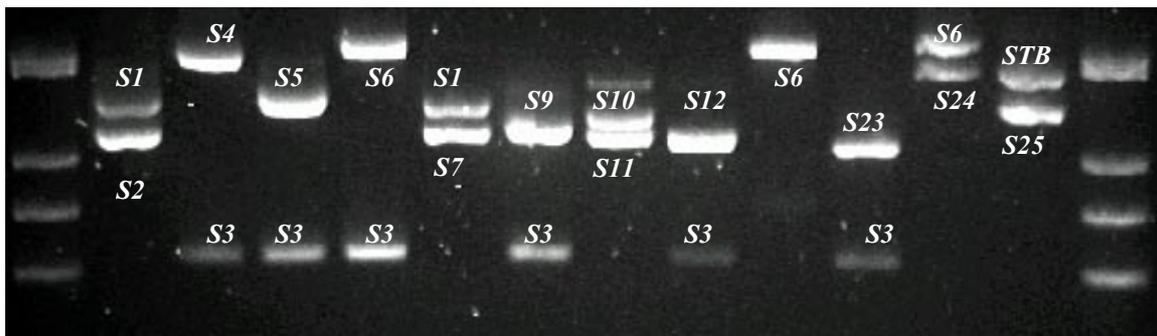
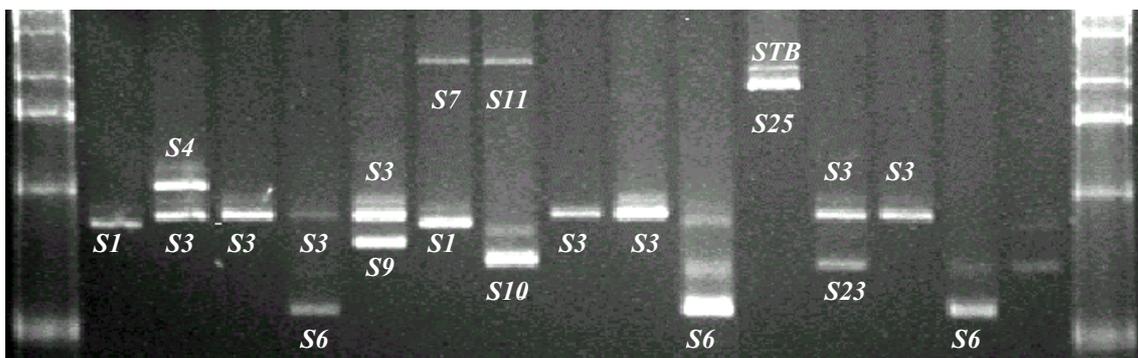


Figure 4.3. Amplificación de alelos de incompatibilidad de las variedades Summit (S_1S_2), Bing (S_3S_4), Hedelfingen (S_3S_5), Hartland (S_3S_6), Burlat (S_3S_9), Charger (S_1S_7), Orleans 171 ($S_{10}S_{11}$), Schneiders, (S_3S_{12}), Ferrovia (S_3S_{12}), Noble (S_6S_{13}), Talaguera Brillante ($S_{TB}S_{25}$), Vittoria (S_3S_{23}), Reverchon (S_3S_{13}) y Pico Colorado (S_6S_{24}) con los cebadores PruC2-C5Rev.



Utilizando la metodología descrita en este capítulo ha sido posible, además, amplificar los fragmentos que corresponden a los alelos S_7 ('Charger'), S_{10} y S_{11} ('Orleans 171') con diferentes pares de cebadores (Tabla 4.2). Estos alelos habían sido identificados mediante el análisis de proteínas estilares (Bösković y Tobutt 1996, 1997) y mediante RFLPs (Hauck *et al.*, 2001) y solamente un fragmento de 425 pb había sido amplificado con anterioridad mediante PCR para el alelo S_7 (Hauck *et al.*, 2001). Los alelos identificados mediante el análisis de ribonucleasas en la variedad Orleans 171 fueron denominados S_{10} y S_{11} (Bösković y Tobutt 1997) y no han sido identificados en ningún otro cultivar. El análisis de la variedad Orleans 171 con marcadores RFLP (Hauck *et al.*, 2001) ha revelado diferentes fragmentos con diferentes enzimas de restricción, aunque no ha sido posible discriminar entre los fragmentos que pertenecen a un alelo y a otro. Por otra parte, los intentos para amplificar estos alelos mediante cebadores alelo-específicos (Sonneveld *et al.*, 2001) han sido infructuosos. En nuestro análisis de 'Orleans 171' con PCR, se amplificaron dos fragmentos con los cebadores PruT2-SI32 y PruC2-C5Rev, mientras que se amplificó un único fragmento con el resto de pares de cebadores (Tabla 4.2). Por otra parte, al analizar la variedad Charger (S_1S_7) se confirmó la amplificación del alelo S_1 con todos los pares de cebadores, mientras que el alelo S_7 sólo pudo ser amplificado con los cebadores PruT2-SI32 y PruC2-C5Rev (Tabla 4.2). Los fragmentos amplificados con los cebadores PruT2-SI32 y PruC2-C5Rev y que corresponden al alelo S_7 son del mismo tamaño que los amplificados para uno de los alelos de 'Orleans 171' y, como consecuencia, uno de los alelos de 'Orleans 171' podría ser S_7 . Una indicación de que la hipótesis puede ser correcta es que los fragmentos de los RFLP que corresponden a S_7 se encuentran también en el patrón de bandas de RFLP de $S_{10}S_{11}$ (Hauck *et al.*, 2001). De hecho, en los zimogramas de las ribonucleasas de los alelos S_7 y S_{11} (Boskovic y Tobutt, 1997) hay una diferencia pequeña entre los valores del punto isoeléctrico de estos dos alelos. En este sentido, se han identificado ribonucleasas S de idéntica secuencia de aminoácidos y que, sin embargo, presentan pequeñas diferencias entre las bandas correspondientes al electroisoeñoque, lo que se cree que puede estar causado por diferencias entre los potenciales de las ribonucleasas debido a las cadenas de glicanos (Van Nerum *et al.*, 2001). Esta evidencia sugiere que el alelo S_7 podría ser S_{11} . Sin embargo, la comprobación final de esta hipótesis requeriría el aislamiento y secuenciación de las ribonucleasas correspondientes.

La utilización de los cebadores conservados ha permitido, además, la identificación de posibles nuevos alelos S , ya que se han amplificado fragmentos, cuyo tamaño difiere del encontrado en las variedades de referencia, en variedades cuyo genotipo S no había sido descrito previamente. En la variedad Taleguera Brillante se observaron dos bandas de tamaño desconocido con todos los pares de cebadores; una de ellas produce tamaños muy parecidos a los del alelo S_2 excepto con el par PruT2-SI32. En la variedad Vittoria se observaron una banda de tamaño conocido, que corresponde a S_3 , y otra banda de tamaño no descrito previamente con todos los pares de cebadores. De forma similar, en la variedad Pico Colorado se obtuvo un fragmento correspondiente al alelo S_6 y otro fragmento que únicamente fue amplificado con la combinación de cebadores PruT2-SI32 (Tabla 4.1, Tabla 4.2). De estos posibles alelos, tres de ellos, denominados S_{23} , S_{24} y S_{25} , han sido clonados y secuenciados, comprobándose que efectivamente corresponden a secuencias de ribonucleasas S (ver Capítulo 6). Otro posible alelo S fue identificado en la variedad ‘Blanca de Provenza’, al obtener un fragmento de 504 pb (S_{BP}) con los cebadores PruT2-SI32 (Tabla 4.1, Tabla 4.2), pero su identidad todavía no ha sido confirmada.

También se ha confirmado el grupo de incompatibilidad de la variedad ‘Ramon Oliva’ sobre la cual existen contradicciones en diferentes estudios; así Wiersma et al., (2001) indican que su composición es S_9S_{new} mientras que Bošković y Tobutt (2001) indican que es S_6S_9 . En nuestro caso, el clon analizado es también S_6S_9 y, por lo tanto, ‘Ramon Oliva’ pertenecería al grupo X de incompatibilidad. La variedad Ferrovia presenta la composición S_3S_{12} , y, por lo tanto, junto con ‘Schneiders’ pertenecería al grupo XXII. De hecho, se ha comprobado que ambas variedades no se pueden distinguir utilizando marcadores SSR (ver protocolo Capítulo 2), corroborando así que ambas pueden, en realidad, corresponder a la misma variedad como sugiere Balmer (2001). Además se ha identificado un nuevo grupo de incompatibilidad ya que la variedad Arcina (S_2S_6) junto con ‘Knuffs Riesenwoud’ (Tobutt *et al.* 2001) constituirían el grupo XXIII de incompatibilidad.

Tabla 4.2 Tamaño de los fragmentos en pares de bases de cada alelo S , amplificados mediante PCR con los diferentes pares de cebadores. Nomenclatura según Tobutt *et al.* (2001).

Alelo S	Variedad de referencia	PruT2-PruC4R	PruC2-PruC4R	SI19-SI20	PruT2-SI32	PruC2-C5Rev
S_1	Summit ($S_1 S_2$)	1199	747	820	458	862
S_2	Summit ($S_1 S_2$)	2500	2081	2154	422	2285
S_3	Bing ($S_3 S_4$)	1062	759	832	306	892
S_4	Bing ($S_3 S_4$)	1461	943	1018	524	1120
S_5	Hedelfingen ($S_3 S_5$)	n.a.	n.a.	n.a.	465	n.a.
S_6	Hartland ($S_3 S_6$)	972	456	529	521	671
S_7	Charger ($S_1 S_7$)	n.a.	n.a.	n.a.	418	2335
S_9	Burlat ($S_3 S_9$)	1101	678	745	431	809
S_{10}	Orleans 171	1060	614	646	446	730
	($S_{10}S_{11}$)					
S_{11}	Orleans 171	n.a.	n.a.	n.a.	418	2335
	($S_{10}S_{11}$)1					
S_{12}	Schneiders (S_3S_{12})	2065	1647	1719	423	n.a.
S_{13}	Noble (S_6S_{13})	n.a.	n.a.	n.a.	526	n.a.
S_{23}		1003	599	671	409	710
S_{24}		n.a.	n.a.	n.a.	497	n.a.
S_{25}		2315	1834	1906	453	1988
S_{TB}		2534	2097	2150	489	2158
S_{BP}		n.a.	n.a.	n.a.	504	n.a.

n.a.: no hubo amplificación

Finalmente, se han identificado los genotipos S de las variedades Cristobalina y Temprana de Sot. La variedad Cristobalina es un mutante de ‘Temprana de Sot’ (Herrero, 1964) y ambas son autocompatibles. La constitución alélica S de ambas es S_3S_6 (Tabla 4.1) y se ha llevado a cabo un estudio molecular y genético para establecer las causas de la autocompatibilidad en estas variedades (ver Capítulo 7). La autocompatibilidad en cerezo es un fenómeno natural raro (Tehrani y Brown, 1992) y, aunque existen algunas variedades autocompatibles, todas ellas derivan de cruces obtenidos de polen irradiado (Lewis, 1949; Lewis y Crowe, 1954).

Cabe destacar que, además de los cruzamientos controlados entre las diferentes variedades, el método más preciso para establecer la composición alélica de cada variedad sería la comparación de secuencias de ADN. Actualmente existen 10 secuencias de alelos de cerezo disponibles ($S_1, S_2, S_3, S_4, S_6, S_9, S_{12}, S_{23}, S_{24}$ y S_{25} ; Tao *et al.*, 1999a,b; Sonneveld *et al.*, 2001; Capítulo 6). Por lo tanto, aunque el número de secuencias de ribonucleasas S

de cerezo está aumentando y la numeración adjudicada a los nuevos alelos debe ser tomada con precaución hasta que las secuencias estén disponibles, diferentes métodos moleculares están siendo utilizados para identificar los alelos *S* de cerezo. El análisis de proteínas y los marcadores RFLP pueden ser de gran utilidad si algunos alelos no pueden ser detectados mediante PCR y las digestiones de restricción pueden ayudar a diferenciar alelos que pueden ser difíciles de discriminar con PCR. Con la metodología utilizada en este trabajo unas pocas reacciones de PCR permiten diferenciar entre un gran número de alelos *S*, y el uso de cebadores conservados permite identificar nuevos alelos. La optimización del protocolo requiere la utilización de variedades estándar para establecer los tamaños de los fragmentos de los alelos conocidos y usar una combinación de cebadores diferentes que permita distinguir alelos del mismo tamaño. Dado el gran tamaño de algunos alelos, los productos de PCR de los cebadores PruT2-PruC4R y SI31-SI20 pueden ser difíciles de amplificar y la secuencia de SI-19 no está bien conservada. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de los cebadores PruT2-SI32 y PruC2-PruC4R sería el método más eficiente de identificar los alelos *S* de cerezo debido al polimorfismo que revelan, a que están muy conservados y a la fácil resolución de los productos de PCR. Sin embargo, al incrementarse el número de alelos puede ser que dos pares de cebadores no sean suficientes para diferenciar algunos alelos y, por lo tanto, la identificación deba ser complementada con los pares de cebadores PruT2-PruC4R, SI19-SI20 o PruC2-C5Rev. Es más, dada la gran fiabilidad obtenida mediante el análisis de PCR de los alelos *S*, esta técnica puede ser utilizada para análisis de paternidad y para complementar otros métodos de identificación de variedades de cerezo como se describe en el siguiente capítulo.

5. EVALUACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE LA COMPOSICIÓN ALÉLICA S DE VARIEDADES LOCALES DE CEREZO ESPAÑOLAS¹

INTRODUCCIÓN

En España casi el 30% de la producción de cereza en fresco está concentrada en el Valle del Jerte. En este valle, situado al norte de la región de Extremadura, la tradición del cultivo del cerezo data del siglo XIV aunque se cree que fue introducido con anterioridad (Flores del Manzano, 1985). La importancia del cerezo en esta zona se incrementó en gran medida a comienzos del siglo XX cuando la roya destruyó el otro cultivo importante del valle, la producción de castaña (Flores del Manzano, 1985). Las características especiales de las cerezas cultivadas en el valle del Jerte junto con las prácticas de agricultura tradicional que se llevan a cabo en la zona, hacen de estas cerezas un producto muy apreciado tanto en el mercado extranjero como en el nacional.

El valle del Jerte es profundo y estrecho y las cerezas se cultivan principalmente en terrazas a diferentes altitudes que varían entre los 700 y los 1200 metros. La combinación de diferentes variedades plantadas a diferentes alturas tiene como resultado una larga temporada de recolección. Por lo tanto, aunque las cerezas tempranas y de media estación suponen un porcentaje importante de la producción anual, más del 60% de la producción proviene de un grupo de variedades tardías como ‘Ambrunés’, ‘Pico Colorado’, ‘Pico Limón Negro’ o ‘Pico Negro’, denominadas “Picotas” y que no se recolectan hasta mediados de Julio (Alonso-Gavilán, 1967) por lo que constituyen unas de las variedades de cerezo cultivadas más tardías. Otras características destacables de este grupo de variedades son el sabor, que combina un alto contenido en azúcar con una cierta acidez, la firmeza de la pulpa y el hecho de que el pedúnculo se separa del fruto durante la recolección.

¹Wünsch A, Hormaza JI. 2003. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of Spanish local sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. Genetic Resources and Crop Evolution, (en prensa). (Anexo 10).

Junto con estas variedades autóctonas, en el valle del Jerte también se cultivan otras variedades tradicionales como ‘Ramon Oliva’ o ‘Burlat’ y otras de más reciente introducción como ‘Lapins’ o ‘Sunburst’.

El método de agricultura tradicional en el Valle estaba constituido por pequeñas huertas pertenecientes a diferentes agricultores, lo que ha permitido que se mantenga la diversidad del germoplasma local y, además, ha evitado problemas de cuajado derivados de la autoincompatibilidad del cerezo. Sin embargo, la presión de las técnicas de la agricultura moderna que potencia la plantación de las variedades más productivas, ya sean tradicionales o introducidas, conduce a una reducción en la diversidad tradicional del germoplasma local. Como consecuencia, es necesario hacer un esfuerzo por mantener y caracterizar el germoplasma autóctono de cerezo que se encuentra en el Valle del Jerte para conservar la variabilidad que se ha mantenido en esta zona, y hacerla así disponible para su uso en los programas de mejora de cerezo. Además, las relaciones de incompatibilidad entre las variedades que se cultivan en el valle deben ser estudiadas para poder recomendar las combinaciones de variedades compatibles más interesantes.

En este capítulo se describe la utilización de doce secuencias de microsatélites desarrolladas en melocotonero para identificar el genotipo de 28 variedades locales de cerezo que se cultivan en el Valle del Jerte. Además, con el objetivo de optimizar el manejo y la eficiencia de las plantaciones y para complementar la caracterización genotípica, se ha investigado la composición de los alelos *S* de cada variedad utilizando los cebadores de PCR recientemente desarrollados a partir de las secuencias del ADN complementario de las ribonucleasas *S* de cerezo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las 28 variedades de cerezo analizadas (Tabla 5.1) fueron obtenidas del banco de germoplasma de cerezo situado en Barrado (Caceres), (Moreno *et al.*, 2001). La extracción del ADN, amplificación de los SSR, visualización de los geles y el estudio de similitud genética se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el Capítulo 2 (Wünsch y

Hormaza, 2002b), utilizando 12 pares cebadores de *Prunus* previamente seleccionados (Tabla 5.2). Los alelos *S* de cada variedad fueron identificados mediante PCR utilizando los pares de cebadores T2-C4R, C2-C4R (Tao *et al.*, 1999a) y SI31-SI32, SI19-SI20 (Wiersma *et al.*, 2001) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 4.

Tabla 5.1. Lista de las 28 variedades de cerezo analizadas y su constitución alélica *S* analizada mediante PCR. Nomenclatura de alelos *S* de acuerdo con Tobutt *et al.* (2001).

Variedad	Alelos <i>S</i>	Grupo de incompatibilidad
Pedro Merino	S_1-S_3	II
Ambrunés	S_3-S_6	VI
Coloradilla	S_3-S_6	VI
De la Casa	S_3-S_6	VI
Del Gordo	S_3-S_6	VI
Jarandilla	S_3-S_6	VI
Mollar	S_3-S_6	VI
Pico Limón Colorado	S_3-S_6	VI
Pico Limón Negro	S_3-S_6	VI
Pico Negro	S_3-S_6	VI
Pico Negro Barrado	S_3-S_6	VI
Pretera	S_3-S_6	VI
Venancio	S_3-S_6	VI
Del Pollo	S_6-S_9	X
Navalinda	S_3-S_9	XVI
Temprana Negra	S_1-S_6	XX
Garrafal	S_3-S_{24}	-
Del Cardito	S_3-S_{24}	-
Lucinio	S_3-S_L	-
Pico Colorado	S_6-S_{24}	-
Pico Colorado Cirino	S_6-S_{24}	-
Virgo Juliana	S_6-S_{24}	-
Cubeto	S_3	-
Especial	S_3	-
Nabuca	S_3	-
Veterinaria	S_3	-
Noelia	S_4	-
Ramón Rachilla	S_{23}	-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de genotipos con SSRs y similitud genética

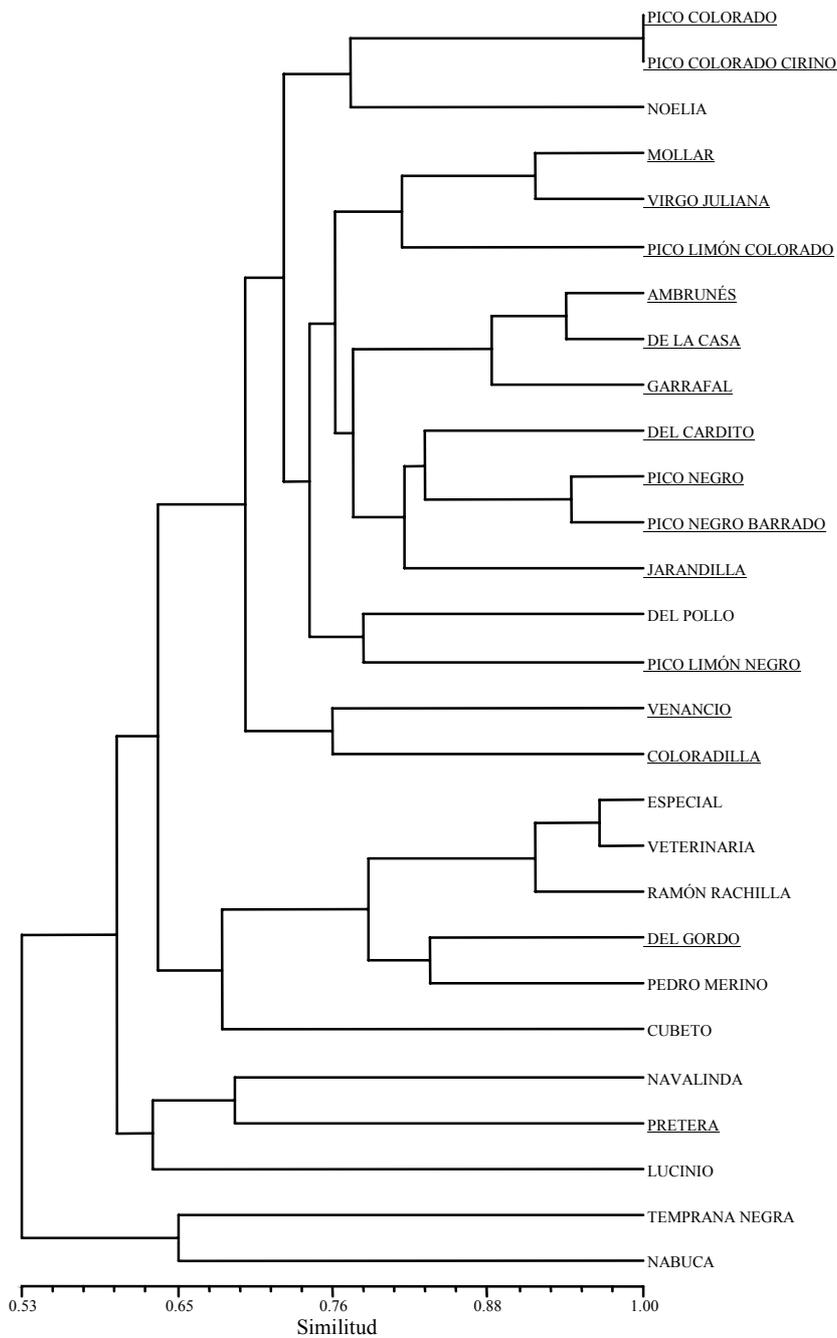
Los 42 alelos resultantes de la amplificación de los 12 microsatélites de *Prunus* seleccionados (Tabla 5.2) fueron utilizados para caracterizar los genotipos de 28 variedades de cerezo (Tabla 5.1). Todos los genotipos analizados, con la excepción de dos, se pudieron diferenciar inequívocamente con los microsatélites utilizados. Las dos variedades que no se pudieron distinguir son ‘Pico Colorado’ y ‘Pico Colorado Cirino’. Estas dos variedades son muy parecidas morfológicamente aunque presentan algunos rasgos que las diferencian (M. Manzano, comunicación personal) lo que sugiere que, aunque distintas, están muy relacionadas genéticamente.

Tabla 5.2. Microsatélites utilizados para la identificación de genotipos.

SSR	Referencia	Nr alelos	Rango (pb)
pchgms1	Sosinski <i>et al.</i> 2000	2	140-190
pchcms3	Sosinski <i>et al.</i> 2000	2	160-180
pchcms5	Sosinski <i>et al.</i> 2000	2	260-290
UDP96-005	Cipriani <i>et al.</i> 1999	5	120-150
UDP98-409	Cipriani <i>et al.</i> 1999	2	130-160
UPD98-021	Testolin <i>et al.</i> 2000	2	100-110
UPD98-022	Testolin <i>et al.</i> 2000	3	90-110
UPD98-412	Testolin <i>et al.</i> 2000	4	100-140
UPD97-402	Cipriani <i>et al.</i> 1999	8	120-150
CPPCT6	Aranzana <i>et al.</i> 2002	2	190-220
PS12A02	Downey y Iezzoni, 2000	10	160-200

Los datos de similitud agruparon los genotipos en cuatro grupos principales que revelan el carácter autóctono de la mayoría de las variedades cultivadas en la zona. (Figura 5.1).

Figura 5.1. Dendograma de 28 variedades de cerezo incluidas en el estudio basado en un análisis de agrupamiento UPGMA utilizando la matriz de similitud generada con el coeficiente de Nei y Li (1979) después de la amplificación con 12 pares de microsatélites. Las variedades tradicionales del Valle del Jerte están subrayadas.



Así, es posible diferenciar un grupo principal que contiene variedades como ‘Ambrunés’, ‘Pico Colorado’, ‘Pico Negro’ o ‘Pico Limón Negro’. Estas variedades conforman el grupo de variedades tardías denominadas ‘picotas’. Los demás genotipos que se incluyen en este grupo son también variedades tardías cultivadas en el valle aunque en menor medida, a excepción de ‘Del Pollo’ y ‘Noelia’ que se cree fueron introducidas más recientemente (M. Manzano, comunicación personal). Un agrupamiento similar entre variedades locales y foráneas ha sido obtenido utilizando RAPDs (Moreno y Trujillo, 2001).

Los otros tres grupos incluyen un grupo más heterogéneo de variedades, de las que sólo ‘Pretera’ y ‘Del Gordo’ se sabe con seguridad que son antiguas variedades locales. El resto corresponde a material foráneo, ya sea introducido directamente como ‘Especial’ y ‘Pedro Merino’, e identificado con otro nombre (Alonso-Gavilán, 1967; Moreno *et al.*, 2001), o material obtenido a través de cruces entre nuevas variedades y genotipos locales. Este último caso explicaría la situación de ‘Pretera’ y ‘Del Gordo’ en el dendograma, fuera del grupo que constituyen las variedades locales tradicionales.

Identificación de alelos S

El uso de los cebadores T2-C4R, C2-C4R, SI31-SI32 y SI19-SI20 recientemente desarrollados por Tao *et al.* (1999a) y Wiersma *et al.* (2001), ha permitido la identificación completa de los alelos S de 23 variedades de cerezo analizadas y solamente de un alelo S de los otros 5 genotipos analizados (Tabla 5.1). La amplificación de sólo 1 alelo en las variedades Cubeto (S_3), Ramón Rachilla (S_{23}), Nabuca (S_3), Noelia (S_4) y Veterinaria (S_3) indica que el alelo adicional no puede ser amplificado con los cebadores utilizados, probablemente debido a diferencias en la secuencia de ADN en las zonas conservadas o a la amplificación preferencial de un alelo en combinación con otro (ver Capítulo 4).

La constitución alélica S de las variedades (Tabla 5.1) está caracterizada por la presencia de 4 alelos previamente descritos (S_3 , S_4 , S_6 y S_9) junto con otros 3 nuevos alelos S_{23} , S_{24} y S_L (ver Capítulos 4 y 6). S_{24} sólo se puede amplificar con los cebadores SI31-

SI32 o PruT2-SI32, con los cuales amplifica un fragmento de 497 pb en las variedades Garrafal, Pico Colorado, Pico Colorado Cirino, Virgo Juliana y Del Cardito. De forma similar, en la variedad Lucinio se ha identificado un fragmento de 404 pb con el mismo par de cebadores, que también puede corresponder a un nuevo alelo S (S_L). En la variedad Ramón Rachilla se identificó otro posible alelo S (S_{23}) que se pudo amplificar con todos los pares de cebadores, amplificando fragmentos consistentes con la situación de los cebadores en la secuencia de ADN de la RNasa y los cuales son diferentes de los tamaños descritos previamente. Estos posibles nuevos alelos han sido secuenciados y parece que corresponden a fragmentos de secuencias de RNasas S . Sus características se describen con detalle en el Capítulo 6.

Es interesante que, con la excepción de la variedad ‘Noelia’ (S_4) y Del Pollo (S_6S_9), que son variedades introducidas recientemente, las demás variedades que se agrupan en el primer grupo con los datos de similitud y que corresponden a las variedades tradicionales del Valle del Jerte, sólo presentan combinaciones de los alelos S_3 , S_6 y S_{24} . La mayor parte de estas tienen, además, la constitución S_3S_6 y pertenecerían al grupo VI de incompatibilidad, mientras que el resto son S_3S_{24} o S_6S_{24} . De forma similar, las otras dos variedades tradicionales que aparecen en otros grupos de similitud (‘Del Gordo’ y ‘Pretera’) tienen también la constitución S_3S_6 . El resto de variedades presentan el alelo S_3 en combinación con otros alelos diferentes como S_7 y S_9 , excepto ‘Temprana Negra’ que es S_7S_6 y ‘Ramón Rachilla’ que es S_{23} . Estos resultados indican que el germoplasma tradicional del Valle del Jerte contiene tres alelos (S_3 , S_6 y S_{24}), mientras que la introducción de nuevas variedades ha dado como resultado la introducción de alelos adicionales. El origen del cultivo del cerezo en este valle no está claro aunque, ya fuera con la introducción en la zona de unos pocos genotipos hace siglos, o a través de la domesticación de individuos silvestres, la base genética parece ser estrecha. Esto es compatible con el gran número de características fenotípicas comunes a las variedades locales. Si las variedades derivan de poblaciones silvestres presentes en el valle, estas poblaciones deberían tener una frecuencia alta del alelo S_3 . Los modelos teóricos predicen que las poblaciones deben tener un número limitado de alelos de incompatibilidad pero que las frecuencias de los diferentes fenotipos de incompatibilidad deberían ser iguales, aunque esto puede ser alterado por diferentes factores como el ligamiento del locus S a otros loci

sujetos a selección, efectos estocásticos relacionados con la formación de las poblaciones o un gran tamaño de la población (Lawrence, 2000; Raspé y Kohn, 2002). Estas preguntas únicamente podrán ser contestadas si se realizan estudios de las poblaciones silvestres locales.

Sólo existe un estudio de la intercompatibilidad floral de las variedades de cerezo cultivadas en el Valle del Jerte (Gil-Albert y Hoyos, 1986). En este trabajo los autores efectuaron varios cruces entre algunas de las variedades incluidas en nuestro estudio y, aunque la mayor parte de los resultados están corroborados con los datos moleculares obtenidos en este trabajo, existen algunas discrepancias probablemente debidas a diferencias en la nomenclatura y/o en las variedades utilizadas. El establecimiento de bancos de germoplasma y la caracterización de genotipos con marcadores moleculares puede ser de gran utilidad para evitar estos problemas. En lo que se refiere a las cuatro cerezas picotas más importantes ('Ambrunés', 'Pico Colorado', 'Pico Limón Negro' y 'Pico Negro'), nuestros resultados indican que sólo 'Pico Colorado' (S_6S_{24}) es intercompatible con cualquiera de las otras tres variedades, las cuales tienen la misma constitución alélica S (S_3S_6), y que, como consecuencia, son interincompatibles.

El método de cultivo tradicional del cerezo en el valle, que estaba basado en propiedades pequeñas con gran diversidad de variedades, permitía una polinización eficiente ya que existía polen compatible de otras variedades que comparten algún alelo y que probablemente siempre estaban próximas. Sin embargo, el proceso de selección de los genotipos más interesantes, especialmente en las variedades tardías tradicionales, puede llevar al cultivo de un número reducido de variedades, dando lugar a la aparición de problemas de producción causados por la incompatibilidad. Por lo tanto, los resultados descritos en este capítulo pueden ser de gran utilidad para conservar el germoplasma local, diseñar los cruces que permitan desarrollar genotipos que aprovechen las ventajas de la variabilidad ya existente y diseñar las combinaciones de variedades en las nuevas plantaciones manteniendo las características tradicionales de las cerezas de la zona evitando al mismo tiempo los problemas de producción que pueden estar causados por la incompatibilidad.

6. CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS DE CUATRO ALELOS DE INCOMPATIBILIDAD POLEN-PISTILO EN CEREZO¹

INTRODUCCIÓN

La comparación de las secuencias de ADN complementario (cDNA) de diferentes ribonucleasas *S* de almendro, manzano, peral Japonés y cerezo ha revelado una serie de características estructurales comunes a las ribonucleasas *S* de las Rosáceas. Al igual que en las ribonucleasas *S* de las Solanáceas (Iorger *et al.*, 1991), se han identificado cinco regiones conservadas (C1, C2, C3, RC4 y C5), aunque una de ellas (RC4) es específica de las Rosáceas y no presenta homología con la región correspondiente de las Solanáceas (Sassa *et al.*, 1996; Ushijima *et al.*, 1998a). Las zonas hipervariables identificadas en las Solanáceas (HV_a y HV_b), que se ha demostrado que pueden estar involucradas en la determinación de la especificidad alélica de las ribonucleasas (Matton *et al.*, 1997), están representadas en las Rosáceas por una única región hipervariable (RHV) localizada en la misma región que HV_a (Ushijima *et al.*, 1998a). Los estudios filogenéticos de estas ribonucleasas han demostrado, además, que las ribonucleasas de las Rosáceas se dividen en dos grupos diferenciados que se correlacionan con su clasificación en las subfamilias Maloidea y Prunoidea (Ma y Oliveira, 2002; Ushijima *et al.*, 1998a). La caracterización de la secuencia genómica de las ribonucleasas de las Rosáceas revela que en peral Japonés (Ushijima *et al.*, 1998a,b), peral Europeo (Zuccherelli *et al.*, 2002), manzano (Janssens *et al.*, 1995) y almendro (Tamura *et al.*, 2000) se ha detectado la presencia de un intrón en la zona hipervariable, mientras que en cerezo (Tao *et al.*, 1999c; Yamane *et al.*, 2000) y otras ribonucleasas de almendro (Ma y Oliveira, 2001) se ha identificado un intrón adicional entre el péptido señal y la proteína.

¹Wünsch A, Hormaza JI. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics (en prensa).

En los capítulos 4 y 5 se describe la utilización de cebadores derivados de las regiones conservadas de las ribonucleasas *S* de cerezo (Tao *et al.*, 1999a; Wiersma *et al.*, 2001) para analizar dos colecciones de germoplasma de cerezo identificando sus genotipos *S*. En esos estudios se ha puesto de manifiesto que entre las variedades locales italianas y españolas estudiadas aparecen al menos 3 nuevos alelos *S* de cerezo. En este capítulo se estudian las secuencias de ADN genómico de esas tres nuevas ribonucleasas *S*, así como la del alelo S_{I2} , incluyendo las zonas flanqueantes 5'. Dado que las regiones 5' de las ribonucleasas de las Rosáceas no habían sido descritas hasta ahora, se han comparado las secuencias obtenidas en cerezo con las disponibles en las Maloideas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ADN genómico

Se seleccionaron las variedades de cerezo de genotipo *S* conocido 'Summit' (S_1S_2), 'Bing' (S_3S_4), 'Hedelfingen' (S_3S_5), 'Hartland' (S_3S_6) y 'Burlat' (S_3S_9), para establecer los tamaños de los fragmentos obtenidos mediante PCR de sus correspondientes ribonucleasas *S*. Cada una de estas variedades pertenece a un grupo de incompatibilidad diferente y su genotipo *S* ha sido confirmado en varios trabajos (Bošković y Tobutt, 2001; Sonneveld *et al.*, 2001; Wiersma *et al.*, 2001). En cuatro variedades, Ferrovia, Pico Colorado, Taleguera Brillante y Vittoria (Capítulos 4 y 5), se amplificaron fragmentos mediante PCR de tamaño diferente a los descritos previamente (Tao *et al.*, 1999a; Wiersma *et al.*, 2001) por lo que fueron seleccionadas para secuenciar cuatro posiblemente nuevas ribonucleasas. Todo el material vegetal fue recogido de los campos experimentales del Servicio de Investigación Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón, situado en Zaragoza. La nomenclatura de los alelos *S* utilizada en este trabajo sigue la propuesta por Tobutt *et al.* (2001).

El ADN genómico para el análisis de PCR fue extraído de acuerdo con el protocolo descrito en el Capítulo 2. El protocolo para la obtención del ADN genómico, utilizado para aislar las secuencias adyacentes a los fragmentos secuenciados, fue llevado a cabo como se

describe a continuación. Cinco gramos de hojas jóvenes fueron triturados en 40 ml de tampón de extracción (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% PVP, 0.1% bisulfito de sodio) y 20 μ l de 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron posteriormente incubadas a 65°C durante 30 minutos, mezcladas con 20 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugadas a 6000 g durante 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y el ADN precipitado añadiendo 12 ml de isopropanol frío. Posteriormente el precipitado fue recuperado después de centrifugar las muestras a 6000g durante 5 minutos. Las muestras se lavaron en 10 ml de tampón de lavado (10mM acetato de amonio en 76% etanol), se dejaron secar durante una noche y se resuspendieron en 1 ml de MTE (TE modificado; 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8.0). El ADN extraído fue purificado haciendo una extracción en 1 v de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), seguida de otra extracción en 1 v de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y una incubación con RNasa (10 μ l/ml) durante 30 minutos a 37°C. El ADN fue entonces precipitado en 1/10 v de acetato de sodio 3M y 2,5 v de etanol frío, lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido en MTE. El ADN extraído fue cuantificado y diluido a 100 ng/ μ l en MTE.

Amplificación de alelos S mediante PCR

Los alelos S de cada variedad fueron identificados mediante PCR utilizando los pares de cebadores T2-C4R, C2-C4R (Tao *et al.*, 1999a) y SI31-SI32, SI19-SI20 (Wiersma *et al.*, 2001) siguiendo el protocolo de PCR descrito en el Capítulo 4. Las reacciones de PCR realizadas para recuperar fragmentos de amplificación de los geles de agarosa se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ l y la electroforesis en tampón 1X TAE.

Clonado y secuenciación del ADN genómico

Los fragmentos de ADN de 2065, 2315 y 1003 pb obtenidos de las variedades Ferrovía, Taleguera Brillante y Vittoria después de su amplificación con los cebadores PruT2-PruC4R y el fragmento de 497 pb obtenido de la variedad Pico Colorado después de la amplificación con los cebadores PruT2-SI32, fueron cortados del gel y el ADN fue

extraído utilizando las columnas Ultrafree-DA (Millipore) (ver Anexo 1). Posteriormente el ADN fue precipitado en presencia de etanol, lavado, secado y resuspendido en agua estéril. Los fragmentos de ADN purificados de ‘Ferrovia’, ‘Taleguera Brillante’ y ‘Vittoria’ fueron clonados utilizando el plásmido ‘pGEM-T Easy’ (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 2). Las colonias transformadas fueron seleccionadas y la purificación del plásmido se llevó a cabo utilizando ‘Plasmid Mini Kit’ (Qiagen) (ver Anexo 3). Los plásmidos con el inserto de interés fueron seleccionados mediante amplificación por PCR con los cebadores universales M13, y digestiones de restricción. Los clones seleccionados fueron secuenciados en un ABI Prism 3700 DNA Analyzer’ (Applied Biosystems). El fragmento purificado de la variedad Pico Colorado fue secuenciado directamente del ADN extraído de la reacción de PCR. Las secuencias de ADN adyacentes en los extremos 5’ y 3’ de los cuatro fragmentos de PCR secuenciados fueron aislados utilizando el ‘Universal Genome Walker Kit’ (Clontech) y ‘Advantage Genomic Polymerase Mix’ (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 4). Los fragmentos de PCR obtenidos fueron también purificados utilizando las columnas Ultrafree-DA (Millipore), precipitados y secuenciados como se ha descrito. La alineación de secuencias se llevó a cabo utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) y la construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método del vecino más próximo (“neighbour-joining”) basado en la alineación de secuencias de nucleótidos con el programa Clustal X 1.8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de alelos *S* mediante análisis de PCR

En la reacción de PCR de los alelos S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 y S_9 en las variedades Summit, Bing, Hedelfingen, Hartland y Burlat con los cebadores PruT2-PruC4R, PruC2-PruC4R, SI19-SI20, SI31-SI32 y SI31-SI20 se amplificaron fragmentos cuyo tamaño es el descrito por Tao *et al.* (1999a) y Wiersma *et al.* (2001). La amplificación mediante PCR para identificar los alelos *S* de las variedades Pico Colorado, Taleguera Brillante y Vittoria dio lugar a dos fragmentos en cada variedad; en la variedad Taleguera se observaron dos

bandas de tamaño desconocido con todos los pares de cebadores; una de ellas produce tamaños muy parecidos a los del alelo S_2 excepto con el par PruT2-SI32. En la variedad Vittoria se observaron una banda de tamaño conocido que corresponde a S_3 y otra banda de tamaño no descrito previamente con todos los pares de cebadores. De forma similar, en la variedad Pico Colorado se obtuvo un fragmento correspondiente al alelo S_6 y otra banda que únicamente fue amplificada con la combinación de cebadores PruT2-SI32 (ver Capítulos 4 y 5). Así, los tamaños de uno de los fragmentos amplificados en la variedad Taleguera Brillante y el obtenido en la variedad Vittoria son respectivamente 2315 y 1003 pb con los cebadores PruT2-PruC4R, 1834 y 599 pb con los cebadores PruC2-PruC4R, 453 y 409 pb con los cebadores SI31-SI32 y 1906 y 671 con los cebadores SI19-SI20. En la variedad Pico Colorado sólo se pudo identificar el alelo S_6 utilizando los cebadores PruT2-PruC4R, PruC2-PruC4R y SI19-SI20. Sin embargo, otro fragmento de 448 pb se identificó utilizando los cebadores PruT2-SI32. En la variedad Ferrovía, se amplificaron mediante PCR fragmentos correspondientes al alelo S_3 , y otros fragmentos que posiblemente correspondan al alelo S_{12} . Wiersma *et al.* (2001) definieron fragmentos de amplificación de 423 y 1711 pb con los cebadores SI31-SI32 y SI19-SI20 en el cultivar Schneiders para el alelo S_{13} (ahora llamado S_{12} , Tobutt *et al.*, 2001); estos tamaños coinciden con los tamaños de los fragmentos obtenidos con los mismos cebadores en la variedad Ferrovía. De hecho, hay indicios de que las variedades Ferrovía y Schneiders podrían corresponder al mismo genotipo (Balmer, 2001) lo que ha sido comprobado mediante microsatélites amplificando ADN de ‘Ferrovía’ y de ‘Schneiders’ (a partir de material proporcionado por K. Tobutt, East Malling, Reino Unido) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 2 (Wünsch y Hormaza, 2002b). Los tamaños de los fragmentos amplificados con los cebadores PruT2-PruC4R y PruC2-PruC4R son 2065 y 1647 respectivamente. Los fragmentos amplificados cuyo tamaño es diferente de los que han sido descritos previamente, amplificados en las variedades Vittoria, Pico Colorado y Taleguera Brillante representarían tres nuevos alelos S que han sido designados S_{23} , S_{24} , S_{25} respectivamente siguiendo en orden consecutivo la nomenclatura utilizada para otros alelos S de cerezo identificados recientemente (Tobutt *et al.*, 2001; K.Tobutt, comunicación personal).

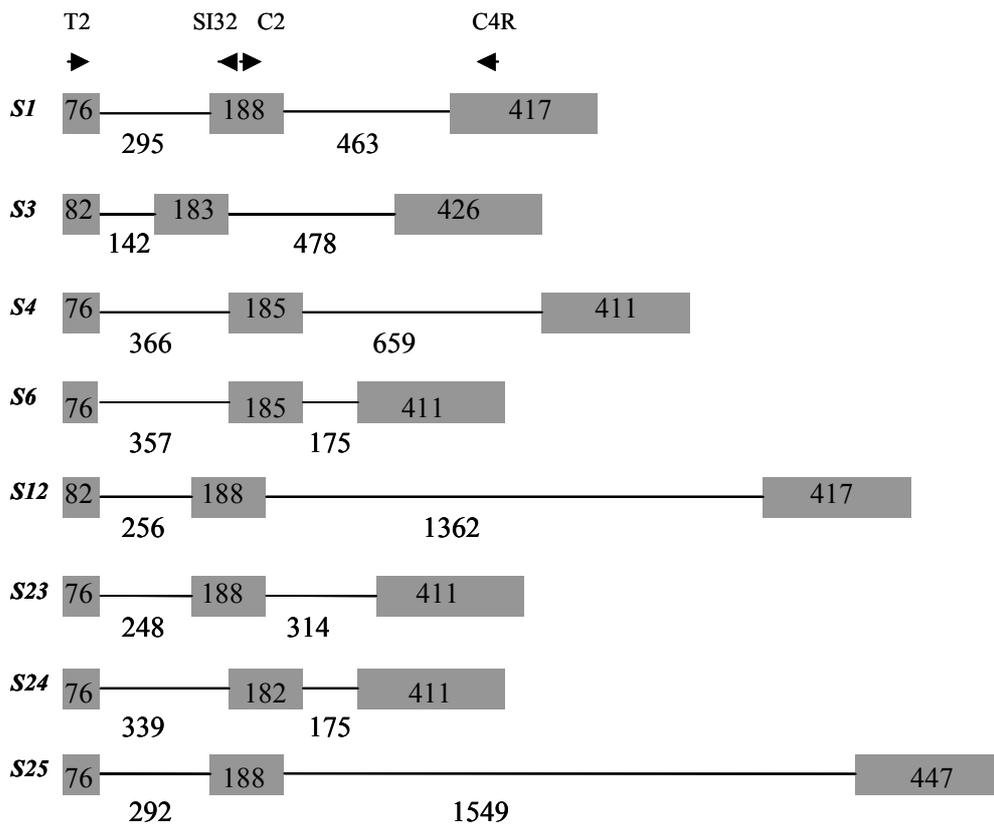
Clonado y secuenciación del ADN genómico de las ribonucleasas S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25}

Con el objetivo de obtener toda la secuencia codificante de estas cuatro posibles ribonucleasas, las secuencias genómicas parciales obtenidas después de la amplificación con PruT2-PruC4R y PruT2-SI32 fueron utilizadas para aislar las secuencias adyacentes a estos fragmentos por los extremos 5' y 3' mediante paseo cromosómico ('genome walking'). Las secuencias genómicas obtenidas corresponden a cuatro ribonucleasas S (DDBJ/EMBL/GenBank AY259112, AY259113, AY259114, AY259915; Anexos 5-8). La presencia de un sitio de restricción *XhoI* en la secuencia de ADN, que produciría dos fragmentos de restricción de 625 y 1086 pb después de la amplificación con SI19-SI20, tal y como fue descrito por Wiersma *et al.* (2001) confirmaría que la secuencia de ADN de la ribonucleasa obtenida de la variedad Ferrovia/Schneiders corresponde al alelo S_{12} . Los alelos S_{23} y S_{24} corresponden a los alelos también identificados en las variedades de cerezo del Valle del Jerte Ramón Rachilla, Garrafal, Del Cardito, Pico Colorado Cirino y Virgo Juliana (ver Capítulo 5, Wunsch y Hormaza, 2003).

De forma similar a otras ribonucleasas de cerezo (Tao *et al.*, 1999c; Yamane *et al.*, 2000), en los cuatro alelos secuenciados se identificaron dos intrones (Figura 6.1). El primer intrón está situado entre el péptido señal y la proteína, mientras que el segundo intrón se sitúa en la región hipervariable. El tamaño del primer intrón en los cuatro alelos identificados en este trabajo S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} , es de 256, 248, 339 y 292 pb, respectivamente, mientras que el tamaño del segundo intrón es más variable, siendo 1362, 314, 175 y 1549 pb respectivamente. Todas las uniones intrón/exón conservan la secuencia consenso GT/AG que se encuentra en la mayoría de los intrones de plantas y tienen un alto contenido en AT (66-73%) (Simpson y Filipowicz, 1996). Por otra parte, tanto las secuencias como los tamaños de los exones están más conservados. Así, el tamaño del primer exón es de 76 pb (en S_{23} , S_{24} y S_{25}) o 82 pb (en S_{12}), el tamaño del segundo exón es de 182 pb (en S_{24}) o 188 pb (en S_{12} , S_{23} y S_{25}) y el tamaño del tercer exón es de 411 pb (en S_{23} y S_{24}), 417 pb (en S_{12}) o 447 pb (en S_{25}). La secuencia de aminoácidos de los cuatro alelos presenta un dominio conservado de ribonucleasa T2 (Sassa *et al.* 1996) y un supuesto péptido señal que comprende aproximadamente los 25 residuos del extremo amino terminal. Las regiones conservadas (C1, C2, C3, RC4 y C5) definidas por Ushijima

et al. (1998a) en las ribonucleasas *S* de otras Rosáceas están también conservadas en estas cuatro ribonucleasas y la región hipervariable (RHV) también puede ser identificada.

Figura 6.1. Representación esquemática del ADN genómico de 8 ribonucleasas *S* de cerezo. Las cajas representan exones, las líneas representan intrones y las flechas representan cebadores de PCR.



También se han aislado fragmentos de ADN de 721, 739, 281 y 307 pb de la zona 5' del supuesto codón de iniciación de las ribonucleasas *S*₁₂, *S*₂₃, *S*₂₄, *S*₂₅ respectivamente. Estas secuencias flanqueantes presentan una posible caja TATA conservada a -86, -84, -86 y -92 pb respectivamente del nucleótido 'A' del supuesto codón de iniciación ATG (Figura 6.2). En peral Japonés la caja TATA se identificó 124 pb antes del supuesto codón de iniciación mientras que el sitio de iniciación de la transcripción está situado a -91 y/o -92

(Ushijima *et al.*, 1998b). Por lo tanto, nuestros resultados indican que la región no traducida en cerezo (Prunoideas) es más corta que en las Maloideas, aunque sería necesario analizar esta región en otras especies Prunoideas para confirmar que esta situación se conserva en esta subfamilia. La caracterización de las regiones flanqueantes de 3 ribonucleasas *S* de peral Japonés y una de manzano demostró que las secuencias 5' analizadas no contienen ningún motivo conservado además de la caja TATA. Esto indica que la regulación de la expresión génica puede llevarse a cabo por una región intragénica o, alternativamente, por una región localizada más arriba de la región promotora analizada (Ushijima *et al.*, 1998b). El análisis de las regiones flanqueantes 5' de tres ribonucleasas *S* de peral Japonés (Norioka *et al.*, 2001) reveló una zona de alta homología de una longitud de 200 pb localizada más arriba de la supuesta caja TATA, siendo esta zona una posible candidata para regular la expresión de las ribonucleasas *S* de peral Japonés. En las ribonucleasas analizadas en este trabajo la similitud entre las secuencias flanqueantes 5' es alta hacia abajo de la caja TATA ya que en esta región aparecen 64 nucleótidos conservados entre las cuatro ribonucleasas. Sin embargo, la similitud es baja hacia arriba de la caja TATA. La alineación de las secuencias flanqueantes 5' de las cuatro ribonucleasas de cerezo y cuatro de peral Japonés (Norioka *et al.* 2001) no reveló ningún motivo conservado; por el contrario, todo parece indicar que las ribonucleasas de cada especie forman dos grupos muy diferentes y bien diferenciados (Figura 6.2). El motivo tipo IA (Ficker *et al.*, 1998) conservado en peral Japonés (Norioka *et al.*, 2001) no está conservado en las secuencias de cerezo analizadas, aunque un motivo similar se identificó a -254 pb, en la secuencia de *S*₂₃. Otros motivos como el I y el III (Kaufmann *et al.*, 1991; Ficker *et al.*, 1998) identificados en las Solanáceas, y que parecen estar involucrados en la regulación de la expresión génica de las ribonucleasas *S* no se encontraron en las secuencias analizadas en este trabajo. Por lo tanto, la poca homología identificada entre las secuencias 5' analizadas de cerezo (Prunoideas) y peral Japonés (Maloideas) confirma la diferenciación filogenética entre las ribonucleasas *S* de estas dos subfamilias (Ma y Oliveira, 2002).

Figura 6.2. Alineación de las secuencias flanqueantes 5' de las ribonucleasas de cerezo S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} , con las secuencias flanqueantes 5' de las ribonucleasas S_2 , S_3 , S_4 y S_5 de peral Japonés (Norioka *et al.*, 2001). Los nucleótidos conservados entre las secuencias de cerezo y entre estas y las de peral Japonés están indicados por asteriscos, los espacios están indicados por guiones. Los nucleótidos están numerados a partir del nucleótido 'A' del codón de iniciación ATG, que está numerado como +1. Las posibles cajas TATA de cerezo y peral Japonés (Norioka *et al.*, 2001) están subrayadas. El motivo tipo IA (Ficker *et al.*, 1998) identificado en peral Japonés (Norioka *et al.*, 2001) y en el alelo de cerezo S_{23} , están subrayados con dos líneas.

```

PAS23 TCTTTAATCTTTTGAATATATAAAA-AAAACAAGGGTTTTATGATGATTTTTTGTGT -207
PAS24 TCTTTAATCTTTGACTATGTTAAAGAAAAACAAGGGTTCTATGATGATTTCTT----- -212
PAS25 TCTTTAATCTTTCAATTGTTAGAA-AAAACAAGGGTTTTAT-----TTTTTC----- -208
PAS12 ATGATAATAACGTCTGGATGTCCGCATAAGAACAATGGTTTTATGATGATTTTTT----- -201
      **** * * * * * * * * * * * * * * *
PPS2 ACATGACTAGTTTGAATAAAAAATATTGGAGAAAAAGTAGCTATCA--ATTATAGAA-- -212
PPS4 ACATGACTAGTTTGAATAGAAA-TAATGGAGCAAATTTGCTATAA--ATTATAGAA-- -223
PPS5 ACATGACTATTTTGAATAGAGA--A-----AAAAATTGCTACAA--ATTATAGGA-- -207
PPS3 ACATGACTATTTTGAATAAAGA--A-----AAAAATTGCTACAA--ATTATAGAA-- -204
      * * * * * * * * * * * * * * *

PAS23 TGTTTTGTTTATACACGTATATTTGGGTCTTGAGAACTAGTGGGAAAAGGT-AACCAA -148
PAS24 --TTT-GTTTATACATGTATATTTGGTCTTGAGAACTTGTGGGAAAAGGT-AACCAA -156
PAS25 -----TTCATACATGTATATTTGGTCTTGAGAACTTGTGGGAAA-----CCAA -162
PAS12 ----TTGTTATAC-----T-----T-GAGAACTTGTGGGAAAAGGT-AGCCAA -161
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PPS2 ----CATGTGATCGAGTACAAGTGATCATGGATGGGTCAATTACAACATTTTGATCAAC -157
PPS4 ----CATGTGATCAAATATACGTGATCATGGATGT-TCAATTAAGGTATTTGGTGGAC -169
PPS5 ----CATGTGATCAAATACACTTGATCATGGATGA-TCAATTAGAGCTTTTGATCAAC -153
PPS3 ----CATGTGATCAAATAGACGTGATCATGGATGC-TCAATTAGAGCTTTT-GATCAAC -151
      * * * * * * * * * * * * * * *

PAS23 GTTGGATGTACCTTCGCTTACAATTTGTAAGTGAGAGATTAATTGCGA----- -100
PAS24 GTTGGATTTACCTTTGCTCACAATTTCTAAGTGAGAGATTAAT-GCGATAG----TACA -102
PAS25 GTTGGACG-ACCTTTGCTTACAAGCTGTAAGTAAGAGATTAATTGCGACAG----TACG -108
PAS12 GTTGGATGTACCTTT-CTTACAATTTATAAGTGAGAGATTAATTGCGACAGGACCGTACA -102
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PPS2 CCCTTATTTATGGACGAATGTA-CGCATATGCCTACAACCAGA-ACCACAAGAAAT-AAGA -100
PPS4 CCCTTATTTATGCATGCATGTA-CGCATATGCCTACAAC TAGT-ACTATAAATAT-AAGA -112
PPS5 CCCTTCTTTATGCATGCATGTA-CGTATATGCCTACTAGTAGC-ACTATAAATAT-AAGA -96
PPS3 CCCTTCTTTATGCATGCATGTA-CGTATATGGCTACAAGTAGC-ACTATAAATAT-AAGA -94
      * * * * * * * * * * * * * * *

PAS23 CCCCATGCGACCTCCTTATATAA---GCAGCA--AACACAGTGAGTCGTAGCTCAGAAA-- -47
PAS24 CCCCATTC AACCTCCTTATATAA---ACAGCA--AACAAAGTGATTCCTAGCTCAGAAA-- -49
PAS25 ATCCATACAACCTCCTTATATAATAAGCAGCA--AACACAGTGAGTCGTAAGTCAGAAA-- -52
PAS12 CCCCATGCAACCTCCTTATATAA---GCAGCC--AACAAAATGAATCTTAGCTGAGAAA-- -49
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PPS2 GCCTGATTGATCTCCAAT-TGATCCACACCACGGCCACTACTACTTCAAATG----- -49
PPS4 GCTTAATTGATCTCCAAT-TGATCCGACCACCACCTATACTACTTGAAGTTTAAATC -53
PPS5 GCTTAGTTGATCTCCAAT-TACTCCACACCAG---TCTACTACTCCAAATC----- -49
PPS3 GCTTATTTGATCTCCAAT-TACTCCACACTA-----CTACTACTCCAAATC----- -49
      * * * * * * * * * * * * * * *

+1
PAS23 GCCTCTCTCATTCTGTTGTATTTTT--GCTTTAGTATT---CTCCAAAGTATGGCGA +7
PAS24 GCCTCTCCCATTTCTGTTGTATTTCTTATTGCTTGAGTATT---CTCTAA-GTATGTCTGA +7
PAS16 GCCTCTCTCATTCTGTTGTATTTCTTGTGCTTTAGTATTATT-CTCTAA-GTATGGGGA +7
PAS12 GACTCTCTTATTCTGCTGATTTCTTGTGCTTTAGTATT---CTCTAA-GTATGGGGA +7
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
PPS2 GAGGAAATTAGTAATTAATTTGCCTCGC-TCTTGAACAAAT---ATTATCAAATGAGGA +7
PPS4 GATCTAATTAGTAATTAATCTGCCTCGC-TCTTGAACAAATTAATATTATTCAAATGGGGA +7
PPS5 GGTCAAATTACTCATTAATCTGCCTCGC-TCTTGAACAAAC---ATTATCAAATGGGGA +7
PPS3 GATCAAATTACTCATTAATCTGCCTCGC-TCTTGAACAAAC---ATTATCACTAGGGA +7
      * * * * * * * * * * * * * * *

```

Comparación de las ribonucleasas S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} con otras ribonucleasas S del género *Prunus*

Se han alineado las secuencias de ADN codificantes inferidas de S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} , con el ADN complementario de otros seis alelos S de cerezo previamente descritos S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 (ahora S_9 , Tobutt *et al.*, 2001) y S_6 (DDBJ/EMBL/GenBank AB028153, AJ298311, AB010306, AB028154, AJ298314, AB010305; Tao *et al.*, 1999a,b; Sonneveld *et al.*, 2001) y de otras especies de *Prunus* para las que se ha descrito la región codificante completa; estos son S_a , S_b , S_c de almendro (DDBJ/EMBL/GenBank AB026836, AB011469, AB011470; Tamura *et al.*, 2000, Ushijima *et al.*, 1998a); S_l , S_7 , S_f de albaricoquero Japonés (DDBJ/EMBL/GenBank AB101438, AB101439, AB101437; Tao *et al.*, 2002) y S_a de guindo (DDBJ/EMBL/GenBank AB050393; Yamane *et al.*, 2001). La alineación de estas secuencias reveló similitudes máximas entre secuencias que variaron entre el 96% (cerezo S_6 - S_{24}) y el 66% (cerezo S_9 , S_{12} -almendro S_a), aunque la mayor parte de las comparaciones dieron valores máximos de 88% siendo S_6 y S_{24} excepcionalmente similares. A partir de los datos de las secuencias se construyó un árbol filogenético con las ribonucleasas S de *Prunus* analizadas (Figura 6.3), en el que se ve reflejado que, en general, las secuencias de cerezo analizadas como S_{12} , S_{24} y S_{25} son filogenéticamente más próximas a otras secuencias de cerezo como S_1 , S_2 y S_6 que a otras secuencias de *Prunus* como S_a de almendro. No obstante, no se produce una separación clara entre las secuencias procedentes de diferentes especies lo que apoyaría la hipótesis de que el polimorfismo de las ribonucleasas S de las Rosáceas tuvo lugar con anterioridad a la especiación (Ishimizu *et al.*, 1998; Ushijima *et al.*, 1998a). En ese caso, aparecerían nuevos polimorfismos en cada especie pero al inferir las filogenias de las distintas secuencias la situación esperada sería la observada en la Figura 6.3.

Para evaluar las diferencias a nivel proteico, las secuencias de aminoácidos inferidas de las secuencias de S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} fueron comparadas con las secuencias de aminoácidos de los alelos S de las otras especies de *Prunus* mencionadas anteriormente (Figura 6.4). La alineación de las 10 ribonucleasas de cerezo presenta 112 residuos conservados mientras que la comparación de las 17 secuencias de *Prunus* reveló sólo 82 aminoácidos conservados. La similitud entre secuencias de aminoácidos entre las 17

ribonucleasas de *Prunus* varía entre 54% (cerezo S_{23} - almendro S_a) y 93% (cerezo S_6 - S_{24}). Como ha sido descrito por Tamura *et al.* (2000) y Ma y Oliveira (2002), tanto la secuencia de nucleótidos como la de aminoácidos del alelo S_a de almendro, son consistentemente diferentes de las secuencias de otros *Prunus*. En general, al igual que con las secuencias de nucleotidos, se observó una homología intraespecífica mayor que interespecífica ya que los alelos de cerezo analizados, S_{12} , S_{23} , S_{24} , y S_{25} , son más similares a las otras ribonucleasas S de cerezo (71-93%) que a las ribonucleasas S de *Prunus* (54-79%). Sin embargo, es interesante recalcar que los alelos de cerezo S_2 y S_6 son menos similares al alelo de cerezo S_3 (73% y 75%) que al alelo de almendro S_b (84 y 82%) lo que también corrobora los datos obtenidos al comparar las secuencias de cDNA de las distintas ribonucleasas.

Figura 6.3. Árbol filogenético inferido por el método del vecino más próximo realizado a partir de los alineamientos múltiples de las secuencias de nucleótidos del cDNA de las ribonucleasas S de *Prunus* utilizando CLUSTAL X 1.8. Las ribonucleasas S_2 y S_4 (GenBank AB014073, AB014072) de peral Japonés fueron utilizadas como grupos externos. Las especies de las que ha sido obtenida cada secuencia están representadas por sus iniciales; PA: *Prunus avium*, PC: *Prunus cerasus*, PD: *Prunus dulcis*, PM: *Prunus mume*, PP: *Pyrus pyrifolia*. La longitud de las barras verticales es arbitraria, mientras que la longitud de las barras horizontales refleja la distancia genética entre nodos. La barra de escala indica la distancia horizontal equivalente a 0,05 reemplazamiento por posición.

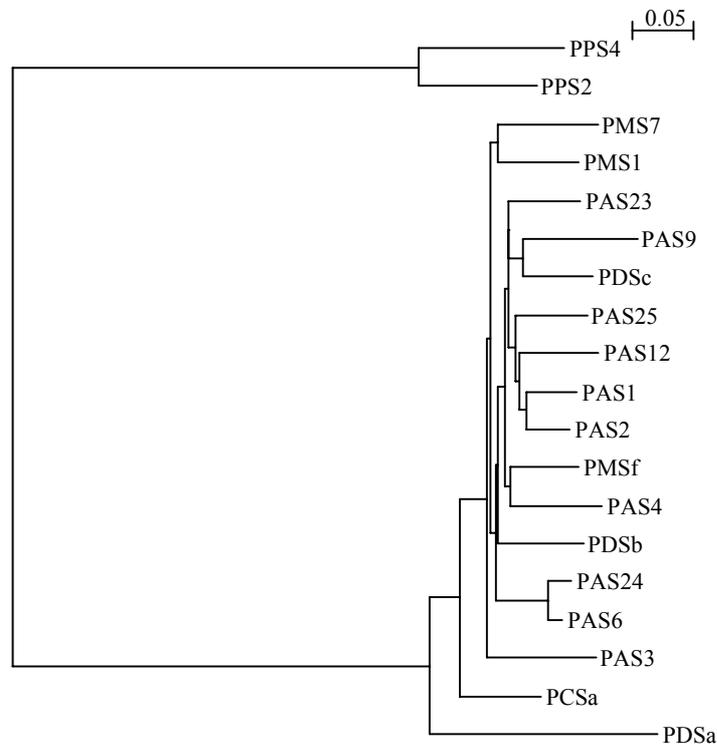


Figura 6.4. Alineación de la secuencia de aminoácidos deducida de las ribonucleas *S* de cerezo y otras especies de *Prunus*. Las posiciones de los aminoácidos están numeradas, los residuos conservados están indicados por asteriscos y los espacios están indicados por guiones. Las cinco regiones conservadas y la zona hipervariable de las Rosáceas (*Ushijima et al.*, 1998a) están subrayadas. Las especies de las que ha sido obtenida cada secuencia están representadas por sus iniciales; PA: *Prunus avium*, PC: *Prunus cerasus*, PD: *Prunus dulcis*, PM: *Prunus mume*.

```

PAS1      MAMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSKP-RPLQ 57
PAS2      MGMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 59
PAS3      MAMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 57
PAS4      MAILKSTLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRNK-PCTKP-RPLQ 56
PAS6      MAMLKSSPAFLVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSSP-RPLQ 57
PAS9      MAMLKSSLALLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRTK--CSNP-RPLQ 55
PAS12     MGMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 59
PAS25     MGMLKSSVAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 57
PAS23     MAILNSTLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 57
PAS24     MSMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPATC-IRSNKPCSKH-RPLQ 56
PCSa      MVTLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPATCSLS-RTPCYKP-RPPQ 58
PDSa      MAMLKSLAFHVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPATCAVS-KQPCYQN--PPS 55
PDSb      MAMLKSSPAFLVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRIKRPCSNP-RPLQ 57
PDSc      MGMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRMKRPCSNP-RPLQ 57
PMS1      MAMLKSSLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCRVRGK--CSNP-RPIQ 57
PMS7      MTTLKSSTALLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTTCRFSSK--PSNQORRLQ 57
PMSf      MAILKSTLAFVLVLAFAFFFCYVMSSG--SYDYFQFVQWPPPTNCKFR--KCSKP-RPLQ 54
*  * : : : : : : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

C1

```

PAS1      NFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGSKYEDRKVYPKLRSKLRKRSWPDVESGNDTRFWEGEWN 117
PAS2      YFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGSQFDGRKVSQPLRAKLRKRSWPDVESGNDTRFWEGEWN 119
PAS3      NFTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGSRFKKELLSPRMQSKLKISWPNVSSNDTKFWESEWN 117
PAS4      NFTIHGLWPSNYSNPRMPSKCTGSLFNRKRVYQPLRSLDKISWPDVESGNDTRFWESEWN 116
PAS6      YFTIHGLWPSNYSNPRMPSNCTGFPQFK-RILSPQLRSKLQTSWPDVESGNDTKFWESEWN 116
PAS9      YFTIHGLWPSNYSNPKMPSNCTGFPQFK-RILSPQLRSKLQTSWPDVESGNDTKFWESEWN 115
PAS12     YSTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGSKYEDRKVYPKLRSKLRKRSWPDVESGNDTRFWEGEWN 119
PAS25     NFTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGSEFKERKLSKLRKRSWPDVESGNDTRFWESEWN 117
PAS23     YFTIHGLWPSNYSNPTMPSNCSNGTQFMQNLFPYLRSLKMSWPDVESGNDTKFWESEWN 117
PAS24     IFTIHGLWPSNYSNPRMPSNCTGFPQFK-RILSPQLRSKLQTSWPDVESGNDTKFWESEWN 115
PCSa      IFTIHGLWPSNYSNPKRPSNCSNGSLFDSRKVYQPLRLNLKISWPNVKSNDTEFWESEWN 118
PDSa      IFTIHGLWPSNYSKKAWANCTRTRFN-NSLAPKLEAKLKISWPNVENANYTEFWESEWN 114
PDSb      YFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGSQFNFTKVS PKMRVVKLRKRSWPDVESGNDTRFWEGEWN 117
PDSc      YFTIHGLWPSNYSNPTKPSNCSNGTGFQFK-RILSPQLRSKLQTSWPDVESGNDTKFWESEWN 117
PMS1      IFTIHGLWPSNYSNPTPSNCSNGSQFKESMVS PRLRSKLRKRSWPNVEGSNDTRFWESEWN 117
PMS7      IFTIHGLWPSNYSNPRMPSNCTGSPQFK-RILSPQLRSKLKKS WPDVESGNDTRFWESEWN 117
PMSf      RFTIHGLWPSNYSNPTRPSNCTGLQFEARKVYQPLQSDLKISWPDVESGNDTKFWESEWN 114
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

C2

RHV

```

PAS1      KHGRCSQTLNQMQYFEISHDMWVSYNITEILKNASIVPHPTQKWSYSDIVSPIKTATKR 177
PAS2      KHGRCSQTLNQMQYFERSQNMWRSYNITEILRNASIVPHPTQTWTYSDIVSPIKATKR 179
PAS3      KHGTCSEQTLNQMQYFEISHMWNFSNITDILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSAIQSKTQR 177
PAS4      KHGRCSQTLNQMQYFERSHAMWISYNITEILKNASIVPSATKNWTYSDIVSPIKRATKR 176
PAS6      KHGTCSEQTLNQMQYFERSYAMWMSYNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVAPIKAATKR 176
PAS9      KHGTCSEQTLNQMQYFERSQNMWRSYNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSPIKTATNR 175
PAS12     KHGKCSQTLNQMQYFERSFAMWKSYNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSPIKAVTKT 179
PAS25     KHGKCSQTLNQMQYFQRSHEMWSFNITEILRNASIVPHPTQTKWYSDIVSPIKAVTQT 177
PAS23     KHGTCSEILNIMQYFQRSQAMWKSHNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSPIKSATGR 177
PAS24     KHGTCSEQTLNQMQYFERSYAMWMSYNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVAPIKAATKR 174
PCSa      KHGRCSQTLNQMQYFERSDEMWSYNITEILKKAQIVPNATRQTKWYSDIVSPIKAATNT 178
PDSa      KHGTCSEQTLNQMQYFERSHDIWNAFNITEILKKAQIVPNATRQTKWYSDIVSPIKATVRK 173
PDSb      KHGTCSEGLNQMQYFERSHEMWSYNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVAPIKTATKR 177
PDSc      KHGTCSEQTLNQMQYFERSHEMWSYNITEILKNASIVPHPAKTWTYSDIVSPIKAATGR 177
PMS1      KHGRCSQTLNQMQYFERSHEMWFHFNITEILKNASIVPHPTQTKWYSDIVSTIKAVTQT 177
PMS7      KHGTCSEKLNQMQYFERSHEMWFHFNITEILKNASIVPSATQKWSYSDIVSAIKARTQT 177
PMSf      KHGKCSQTLNQMQYFERSHAMWTSFNITEILKNASIVPHPKKTWYSDIVAPIKTATER 174
* * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

C3

RC4

PAS1	TPLLRCK-----TDPA----TN-----TELLH--EVPFCYEHALKQIDCNRTAGCKNPQAISFQ	226
PAS2	TPLLRCK-----QDK-----K-----TQLLH--EVPFCYEYNALKQIDCNRTAGCQNQPAISFQ	226
PAS3	TPLLRCK-----TDPA----HPN--ANTQLLH--EVPFCYGYNAIKQIDCNRTAGCKNQVNILFP	229
PAS4	TPLLRCK-----YDK-----S-----TQLLH--EVPFCYEDALKQIDCNGTAGCPNQKVISFQ	223
PAS6	TPLLRCK-----QDK-----N-----TVLLH--EVPFCYEYNALKQIDCNRTSGCQNQPAISFQ	223
PAS9	TPLLRCK----SQPKS--Q-AN----FQLLH--EVLVCFDYNALVHIDCNRTAGCWNVNDIKFQ	226
PAS12	TPLLRCK-----RDHP----NK-----PELLH--EVLVCLDYNGLIQIDCNRTAGCRNQQAISFQ	228
PAS25	TPLLRCKFPPKSQTKS--QPKSQ--ATSQLLH--EVLVCLDYDALRLIDCNRTAGCGNQQAISFQ	236
PAS23	TPLLRCK-----QDK-----S-----TQLLH--EVPFCYDYNALKQIDCNRTAGCGKQRDISFQ	224
PAS24	TPLLRCK-----QDK-----N-----TVLLH--EV-FCYEYNALKQIDCNRTSGCQNQPAISFQ	220
PCSa	TPLLRCK-PDPAQSKSQPSQPKS-PQKPQLLH--EVPFCYDYHAKKQIDCNR-TGCLN-KDISFQ	237
PDSa	MPALRCK-----PDP---TKPKNHKISHQLLH--EVLVCLHYKGRALIDCNR-TACDNNLKILFQ	227
PDSb	TPVLRCK-----PDPA----QNKSGPKTQLLH--EVPFCYEHALKQIDCNRTAGCWNVNDIKFQ	231
PDSc	TPLLRCK-----YDN-----N-----TQLLH--EVPFCYGYKAIKQIDCNR-PGCKNKIDIKFQ	223
PMS1	TPLVRCK-----QHK-----K-----TQLLH--EVLVCFEYKALKQIDCNRTAGCPNQQAISFQ	224
PMS7	TPSLRCK-----RDK-----K-----TQLLHLHEVVLVCFEYNALKQIDCNRTATCGNQQAIFWQ	226
PMSf	TPLLRCK-----LDK-----K-----TQLLH--EVPFCYEYKAKKQIDCNRTAGCGHQQAISFQ	221

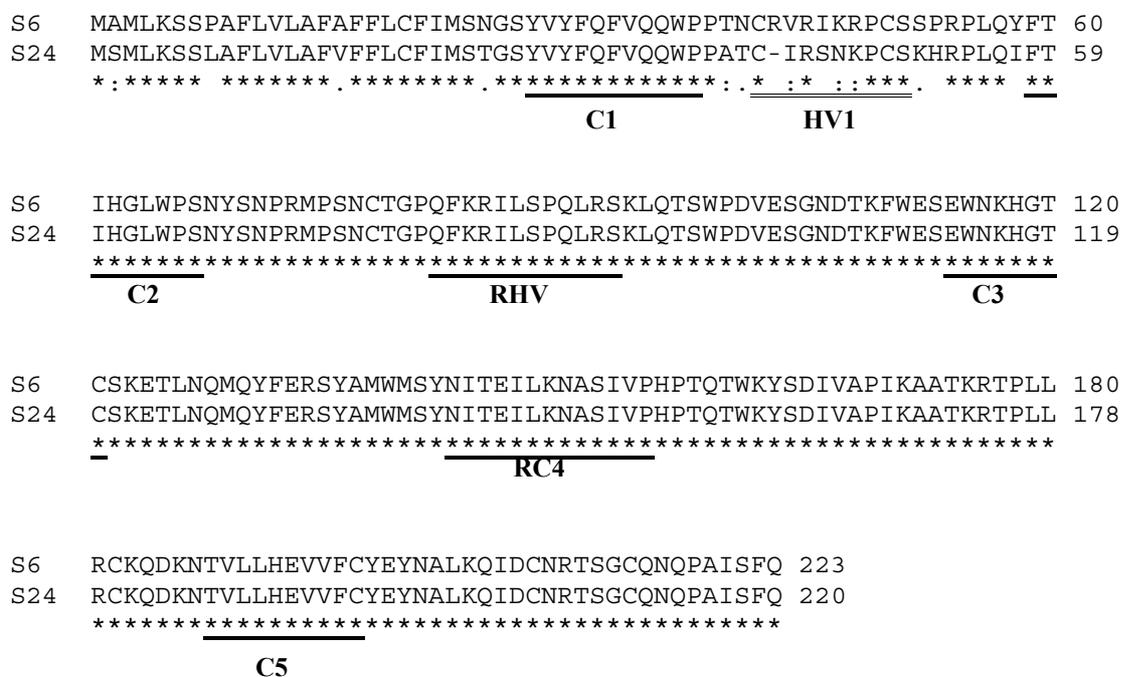
* :***
*** ** :* *.. **** . * : * *

C5

Las ribonucleasas S_{24} y S_6 tienen intrones de tamaños muy similares (Figura 6.1) y tanto sus secuencias de nucleótidos como de aminoácidos son también excepcionalmente similares, lo que indica que ambos alelos pueden haber derivado de un ancestro común o que, alternativamente, uno puede haber derivado del otro a través de una serie de mutaciones. El hecho de que el alelo S_6 esté presente en varios genotipos de cerezo (Bošković y Tobutt 2001; Sonneveld *et al.*, 2001; Wiersma *et al.*, 2001; Capítulo 4) y que el alelo S_{24} solamente ha sido identificado hasta ahora en 4 variedades de una zona específica de la península Ibérica (Capítulo 5) sostendría la segunda hipótesis. Estos dos alelos, sorprendentemente, tienen la misma secuencia de aminoácidos en la zona hipervariable (RHV) mientras que la región donde se acumulan la mayor parte de las sustituciones de aminoácidos se encuentra a continuación de la región C1 definida por Ushijima *et al.* (1998a), (Figura 6.5). Esta región también es muy variable en todas las ribonucleasas S de cerezo y *Prunus* analizadas (Figura 6.4); de hecho, en las ribonucleasas S de las Solanáceas esta región contiene dos de los residuos más variables identificados fuera de las zonas hipervariables HVa y HVb (Tsai *et al.*, 1992). Esta región de gran variabilidad situada entre las regiones C1 y C2 fue definida como HV1 por Kheyr-Pour *et al.* (1990), después de comparar las secuencias de las ribonucleasas S de *Nicotiana glauca*. Se supone que los residuos más variables deben estar involucrados en la especificidad alélica de las ribonucleasas (Tsai *et al.*, 1992), y se ha demostrado que las regiones hipervariables HVa y HVb de las ribonucleasas S de las Solanáceas juegan un papel clave en el reconocimiento de polen que lleva el mismo alelo (Matton *et al.*, 1997), aunque otros

estudios sugieren que este reconocimiento no está restringido a las zonas HV (Verica *et al.*, 1998). Otros pares de ribonucleasas de gran similitud han sido descritos en peral Japonés. En esta especie, las ribonucleasas S_3 y S_5 tienen 8 substituciones de aminoácidos en una zona de 70 aminoácidos que incluye la región RHV, y estas diferencias son suficientes para discriminar entre polen S_3 y S_5 (Ishimizu *et al.*, 1998). Sin embargo, otro par de ribonucleasas S de gran similitud (S_1 - S_4) tienen las substituciones de aminoácidos distribuidas por toda la secuencia (Ishimizu *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los avances recientes hacia la identificación del factor S del polen (Ushijima *et al.*, 2003) y cruces en campo, ayudarán a confirmar si otras regiones de la secuencia de las ribonucleasas S , que se encuentran fuera de la zona variable RHV en las Rosáceas, pueden estar involucradas en el reconocimiento específico entre las proteínas S del polen y del estilo.

Figura 6.5. Alineación de las secuencias de aminoácidos de las ribonucleasas S_6 y S_{24} de cerezo. Las posiciones de los aminoácidos están numeradas, los residuos conservados están indicados por asteriscos y los espacios están indicados por guiones. Las cinco regiones conservadas y la zona hipervariable de las Rosáceas (Ushijima *et al.*, 1998a) están subrayadas, y la zona variable de las Solanáceas, HV1 (Kheyr-Pour *et al.*, 1990), está subrayada con dos líneas.



7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DEL CARÁCTER DE AUTOCOMPATIBILIDAD POLEN–PISTILO EN LA VARIEDAD DE CEREZO ‘CRISTOBALINA’

INTRODUCCIÓN

La autocompatibilidad es un carácter muy deseable en las variedades de especies frutales que presentan autoincompatibilidad gametofítica, como el cerezo, puesto que posibilita el establecimiento de plantaciones monovariales. Los genotipos autocompatibles en especies normalmente autoincompatibles pueden ocurrir de forma natural o artificial, y pueden estar causados por varios factores, como pérdida de la funcionalidad de los factores del locus *S*, ya sea del polen, del estilo o de ambos, o factores externos al locus *S*, siendo estos la poliploidía y la consiguiente presencia de polen digénico hetero-alélico, o cambios en el fondo genético del genotipo (De Nettancourt, 2001).

Aunque los casos de mutaciones estilares para el locus *S* y para un alelo específico son raros (De Nettancourt, 2000), estos han sido descritos en varias especies que presentan autoincompatibilidad gametofítica como *Oenothera*, *Lycopersicum* o *Pyrus* (Lewis y Crowe, 1954; Royo *et al.*, 1994; Sassa *et al.*, 1997), y su estudio ha ayudado a establecer la estructura y la función del locus *S* en el estilo (De Nettancourt, 2000). Así, la caracterización molecular de una mutación del factor *S* del estilo, que no afecta al polen (Sassa *et al.*, 1997) llevó a la conclusión de que genes diferentes controlan la especificidad alélica en el polen y en el estilo. De forma similar, la observación de que proteínas *S* sin actividad ribonucleasa confieren autocompatibilidad, ayudó a confirmar que la actividad ribonucleasa es esencial para la expresión de la reacción de incompatibilidad en el estilo (Royo *et al.*, 1994).

Por otra parte, también se han descrito distintos mutantes en el sistema de incompatibilidad gametofítica en los que solamente la funcionalidad del polen está

afectada (PPM; ‘Pollen Part Mutants’) y se han propuesto varias causas para explicar este comportamiento (Brewaker y Natarajan, 1960; Golz *et al.*, 1999; Lewis, 1961; Pandey, 1965). En algunos casos, se ha comprobado que la autocompatibilidad se debe a una duplicación del locus *S* (Brewaker y Natarajan, 1960; Golz *et al.*, 1999) o a una parte de él (Pandey, 1965); que normalmente se encuentra en un fragmento cromosómico adicional (‘centric fragment’). Esta situación fue inicialmente descrita por Lewis (1943, 1947) como una interacción competitiva (‘Competitive interaction’) de las proteínas *S* codificadas por el polen dialélico, a partir del estudio de genotipos tetraploides autocompatibles de *Oenothera*. Así, en un individuo tetraploide heterocigoto para el locus *S*, el polen diploide heterocigoto supera la barrera de incompatibilidad, mientras que el polen diploide homocigoto no lo hace y, como consecuencia, toda la descendencia es heterocigota para el locus *S*. Aunque se ha confirmado la capacidad del polen heteroalélico para superar la barrera de incompatibilidad (Golz *et al.*, 1999), la explicación de este comportamiento aún no está clara puesto que todavía no se conoce con precisión la interacción entre los factores *S* del polen y del estilo en la reacción de incompatibilidad gametofítica.

Sin embargo, la descripción de individuos homocigotos para el locus *S* en la descendencia de la autofecundación de genotipos autocompatibles de *Oenothera* (Lewis, 1961) y la imposibilidad de detectar duplicaciones de factor *S* del estilo en líneas dihaploides autocompatibles de *Solanum tuberosum* (Thompson *et al.*, 1991) indica que la existencia de polen dialélico y la consecuente interacción competitiva no es la única explicación posible para la existencia de mutantes del polen en este sistema de incompatibilidad. Otra posibilidad sería la mutación del propio factor *S* del polen dando lugar a una ausencia de este factor o de la función del mismo. Diferentes estudios (Lai *et al.*, 2002; Luu *et al.*, 2000; Ushijima *et al.*, 2003; Golz *et al.*, 1999) apuntan a que en la interacción polen-pistilo el modelo que opera puede ser el modelo inhibitorio, en el que el factor *S* del polen es un inhibidor de las ribonucleasas *S* (ver Introducción General). McCubbin y Kao (2000) sugirieron que, en este modelo, si el factor *S* del polen tiene que tener la capacidad de inhibir a todas las ribonucleasas menos a las que tienen su mismo alelo, entonces el factor *S* del polen debe tener dos dominios, uno de especificidad para poder reconocer a las ribonucleasas que tienen su mismo alelo y otro de actividad inhibitoria para inhibir todas las ribonucleasas con otros alelos, e interaccionar de manera

diferente con unas y otras. Estudios recientes han propuesto dos variantes posibles de este sistema: en uno de los modelos (Lai *et al.*, 2002; Ushijima *et al.*, 2003), los dos dominios estarían en la misma proteína, el factor S del polen, que sería una proteína con un dominio caja F (F-box protein) codificada por un gen SFB; en el otro (Luu *et al.*, 2000; Luu *et al.*, 2001), los dos dominios corresponderían a dos proteínas diferentes, una sería un inhibidor general de la actividad de las ribonucleasas S (RI; RNase inhibitor) y la otra sería el factor S que funcionaría específicamente en el reconocimiento y ‘protección’ de las ribonucleasas con el mismo alelo. En el modelo inhibidor, una mutación que implique una supresión o una pérdida de la funcionalidad del factor S del polen, lo que han sido llamados ‘verdaderos mutantes del polen’, en lugar de mutantes del polen causados por la presencia de polen heteroalélico, sería una mutación letal, es decir no se transmitiría, porque, al no inhibirse la actividad de ninguna ribonucleasa, los tubos polínicos siempre serían detenidos y nunca habría fecundación. Sin embargo, según el modelo de Luu *et al.* (2000, 2001) la existencia de verdaderos mutantes del polen sería posible, porque una mutación en el factor S del polen no sería letal, ya que la presencia de la proteína inhibidora permitiría la fecundación.

En algunas especies de Rosáceas se han descrito mutantes para el carácter de autoincompatibilidad y su estudio ha permitido profundizar en el conocimiento de la reacción de incompatibilidad polen-pistilo. Sassa *et al.* (1997) analizaron la variedad autoincompatible de peral Japonés ‘Osa-Nijisseiki’ (S_2S_4), cuyo alelo S_4 es funcional en el polen pero no en el estilo debido a una supresión cromosómica que abarca el gen que codifica la ribonucleasa S_4 sin afectar a la expresión del factor S del polen. En almendro, el mutante ‘Jeffries’ ($S_{cm}S_d$) puede ser fecundado por polen de cualquier variedad de almendro, excepto por el suyo y, además, el polen de esta variedad no puede fecundar a ninguna variedad con el alelo S_d (Kester *et al.*, 1994). La explicación de este comportamiento es que ‘Jeffries’ presenta una supresión del haplotipo S_c que abarca más allá del locus S y que incluye los genes S_c del polen y del estilo, además de una duplicación del haplotipo S_d , comportándose como si fuera homocigoto para el haplotipo S_d (Ushijima *et al.*, 2001).

En cerezo, la autocompatibilidad natural es un fenómeno muy poco frecuente (Tehrani y Brown, 1992) y, como consecuencia, el número de variedades autocompatibles naturales es muy reducido. No obstante, se han desarrollado variedades autocompatibles de alto interés comercial como ‘Lapins’, ‘Sunburst’ o ‘Sweetheart’ que provienen del mismo progenitor, la variedad ‘Stella’ (Lapins, 1975). Esta variedad fue obtenida del cruce de ‘Lambert’ y ‘JI2420’, siendo esta última una selección autocompatible descendiente de ‘Emperor Francis’ polinizada con polen de la variedad ‘Napoleon’ sometido rayos X (Lewis, 1949; Lewis y Crowe, 1954). Sin embargo, la apuesta del sector productivo por las variedades autocompatibles de buena calidad está suponiendo un preocupante estrechamiento de la base genética del cerezo cultivado que, de hecho, ya es limitada en los cultivares de cerezo de interés comercial (Iezzoni *et al*, 1990). Por ello, sería de gran interés el introducir otra fuente de autocompatibilidad en los actuales programas de mejora de esta especie. Entre las excepciones autocompatibles en cerezo se encuentra la variedad Cristobalina (Hugard, 1978) también denominada ‘Catorce de Abril’ (Herrero, 1964). Esta variedad es una mutación temprana de la variedad Temprana de Sot, encontrada en Sot de Ferrer, Castellón (Herrero, 1964). Además del carácter de autocompatibilidad, ‘Cristobalina’ posee otras características interesantes para su introducción en programas de mejora como son una maduración extremadamente temprana (Figura 7.1.a.), crecimiento poco vigoroso, rabillo largo o resistencia al agrietado.

Además de su interés para los programas de mejora de cerezo, la peculiaridad del carácter autocompatible de ‘Cristobalina’ puede permitir avanzar en los estudios de incompatibilidad no solamente en cerezo sino también en otras especies con incompatibilidad de tipo gametofítico. Por tanto, el objetivo de este trabajo es caracterizar la mutación que confiere el carácter de autocompatibilidad a la variedad Cristobalina con el fin de determinar a qué factores del locus *S* o externos a este se debe su comportamiento autocompatible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para establecer las relaciones de incompatibilidad de la variedad Cristobalina con otros grupos de incompatibilidad descritos en cerezo, esta se cruzó *in vivo* en el laboratorio de forma recíproca con las variedades ‘Summit’ (S_1S_2), ‘Gilpeck’ (S_1S_3), ‘Lambert’ (S_3S_4), ‘Burlat’ (S_3S_9) y ‘Ramon Oliva’ (S_6S_9) todas ellas pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad. Para establecer si la mutación de ‘Cristobalina’ se encuentra en el polen o en el estilo se hizo además un cuadro de compatibilidad mediante cruzamientos *in vivo* en el laboratorio con las variedades Ambrunés, Pico Negro, Duroni 3 y Hartland ya que todas presentan los mismos alelos de incompatibilidad que ‘Cristobalina’, S_3S_6 (ver Capítulo 4). Para evaluar las descendencias y la naturaleza de la mutación se hicieron cruzamientos recíprocos en campo con una variedad con los mismos alelos ‘Ambrunés’, con una variedad con el alelo S_3 [‘Lambert’ (S_3S_4)] y con otra con el alelo S_6 [‘Ramon Oliva’ (S_6S_9)]. Adicionalmente, para estudiar la segregación fenotípica del carácter de autocompatibilidad se utilizó una población de 41 individuos de cuatro años de edad descendiente del cruzamiento de ‘Brooks’ (S_1S_9) x ‘Cristobalina’ (S_3S_6). El material de la población de ‘Brooks’ x ‘Cristobalina’ fue recogido de la finca ‘Santa Bárbara’ situada en la localidad de Caspe en la provincia de Zaragoza y el resto del material vegetal fue recogido del Servicio de Investigación Agroalimentaria de la Diputación General de Aragón en Zaragoza.

Extracción de ADN genómico e identificación de alelos *S* en las descendencias

El ADN genómico de los individuos de las descendencias fue extraído directamente de los embriones maduros de los frutos o de las hojas, en el caso de poblaciones en estado de plántula o árboles adultos, utilizando el protocolo descrito en el Capítulo 2. Los alelos *S* de las descendencias de cada cruzamiento fueron identificados mediante PCR utilizando los pares de cebadores T2-C4R, C2-C4R (Tao *et al.*, 1999a) siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 4.

Clonado y secuenciación del ADN genómico de las ribonucleasas S_3 y S_6 de la variedad Cristobalina

Los genes de las ribonucleasas S_3 y S_6 de ‘Cristobalina’ fueron clonados a partir de fragmentos amplificados mediante PCR utilizando los pares de cebadores S3F1 (AAAGCCTTCCCCACTCTATT) - S3R1 (GCTCAAACCTCTTCTTATTT) y S6F1 (AAGCCTCTGATCCCATTCTGT) - S6R1 (CCAAACCATACTATACTTT). Estos cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia de cDNA de los alelos S_3 y S_6 (DDBJ/EMBL/GenBank AB010306, AB010305) (Tao *et al.*, 1999a) y abarcan toda la zona codificante de estas dos ribonucleasas. El clonado y secuenciación de estos fragmentos de ADN fue llevado a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el Capítulo 6.

Cruzamientos y observación microscópica de tubos polínicos

Para la obtención de polen tanto para cruzamientos *in vivo* en el laboratorio como en campo, se recogieron flores en estado de botón globoso (Figura 7.1.b.). De estas se separaron las anteras que se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente en una bandeja de papel. Pasado este tiempo y después de observar la dehiscencia de las anteras, éstas fueron coladas con un pincel a través de una malla de 0,26 mm para separar el polen. El polen se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Los cruzamientos *in vivo* en el laboratorio fueron realizados con flores recogidas en estado de botón globoso, emasculadas y colocadas en espuma de florista húmeda. Se colocaron 20 flores por cruzamiento y fueron polinizadas 24 horas después de su emasculación con un pincel utilizando el polen previamente recogido. Los pistilos de las flores fueron fijados en FAA (formaldehído: ácido acético: 70% etanol; 1:1:18) (Johansen, 1940) a los 5 días de su polinización y guardados a 4°C hasta su preparación para la observación al microscopio. Para los cruzamientos en campo se emascularon manualmente las flores en estado de botón globoso en el propio árbol (Figura 7.1.c) y se polinizaron 24 horas después, con un pincel utilizando el polen recogido con anterioridad (Figura 7.1.d.).

Para la observación microscópica de los tubos polínicos de los pistilos fijados de los cruzamientos *in vivo* en el laboratorio, estos fueron lavados 3 veces durante 1 hora en agua destilada. Posteriormente se lavaron durante 24 horas en sulfito sódico al 5%, y se esterilizaron durante 12 minutos a $1,1 \text{ kg/cm}^2$ (Jeffries y Blecher, 1974) en solución de sulfito sódico limpia. Posteriormente los pistilos fueron aplastados entre portaobjetos y cubreobjetos con una solución de azul de anilina al 0,1% en 0,1 N PO_4K_3 para la tinción de callosa (Linskens y Esser, 1957). Las preparaciones se guardaron en bandejas con papel húmedo a 4°C y se dejaron tiñendo durante al menos 24 horas. Las preparaciones se observaron al microscopio de fluorescencia de luz incidente para luz violeta Ortolux II con filtro excitador BP 355-425 y filtro bloqueador LP 460. Se consideraron cruzamientos compatibles aquellos en los que habiendo germinado cantidad suficiente de polen en el estigma (Figura 7.2.a. y 7.2.b.) y de tubos polínicos en el estilo (Figura 7.2.c.), en la mayor parte de las flores observadas los tubos polínicos llegaron al ovario (Figura 7.2.d.), e incompatibles aquellos para los que en la mayor parte de flores observadas los tubos polínicos se detuvieron antes de llegar al ovario (Figura 7.2.e.).



Figura 7.1.

a. Variedades de cerezo, con 'Cristobalina' en primer plano, destacando el considerable adelanto en su ciclo fenológico respecto a otras variedades.



b. Flores en estado de botón globoso, en el que se recoge el polen y se emasculan las flores.



c. Flores emasculadas, listas para ser polinizadas.



d. Flores varios días después de la polinización manual, en las que se observa el desarrollo inicial de los frutos

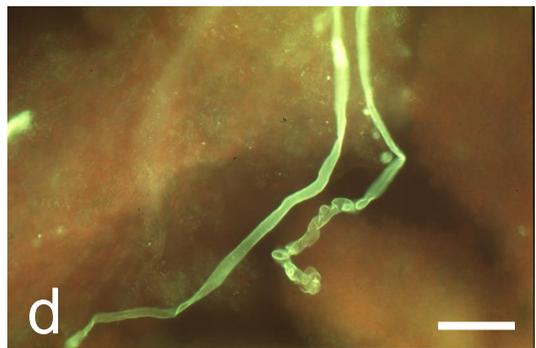
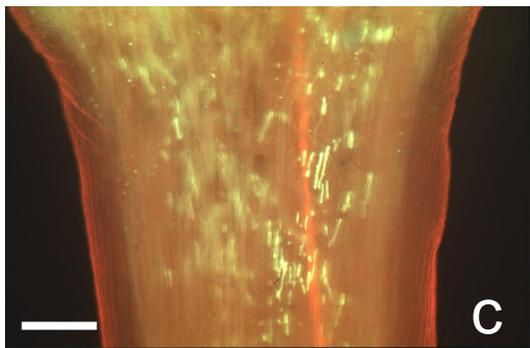
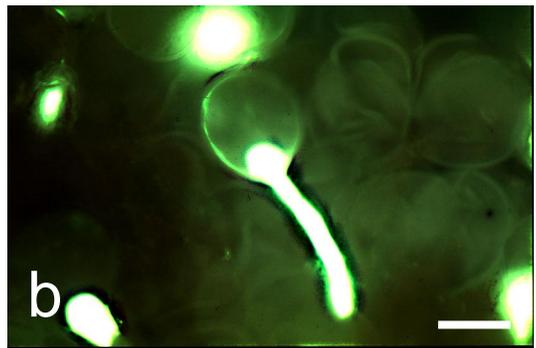
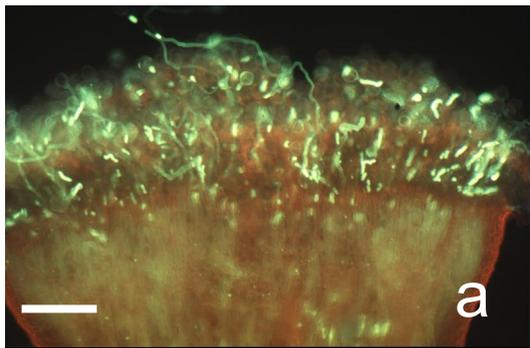


Figura 7.2.

- a.** Estigma con polen germinado. Tinción con azul de anilina. Barra = 200 μm .
- b.** Grano de polen germinado en el estigma. Tinción con azul de anilina. Barra = 30 μm .
- c.** Estilo con tubos polínicos. Tinción con azul de anilina. Barra = 200 μm .
- d.** Tubos polínicos llegando al ovario en un cruzamiento compatible. Tinción con azul de anilina. Barra = 80 μm .
- e.** Tubo polínico detenido en el estilo en un cruzamiento incompatible. Tinción con azul de anilina. Barra = 20 μm .

RESULTADOS

Relaciones de incompatibilidad polen-pistilo entre ‘Cristobalina’ y otras variedades

Los cruzamientos recíprocos entre ‘Cristobalina’ y las variedades ‘Summit’ (S_1S_2), ‘Gilpeck’ (S_1S_3), ‘Lambert’ (S_3S_4), ‘Burlat’ (S_3S_9) y ‘Ramón Oliva’ (S_6S_9) realizados *in vivo* en el laboratorio y observados en el microscopio fueron todos compatibles, confirmando así que ‘Cristobalina’ pertenece a un grupo diferente de incompatibilidad que el resto de variedades. Los cruzamientos realizados *in vivo* en el laboratorio y observados en el microscopio entre ‘Cristobalina’ y las variedades ‘Ambrunés’, ‘Pico Negro’, ‘Duroni 3’ y ‘Hartland’ así como las autofecundaciones y los cruces entre estas (Tabla 7.1) confirmaron que ‘Cristobalina’ es autocompatible y que ‘Ambrunés’, ‘Pico Negro’, ‘Duroni 3’ y ‘Hartland’ son autoincompatibles. Teniendo en cuenta que mediante PCR las cinco variedades presentan los mismos alelos S , el cuadro de cruzamientos confirma además que las variedades Ambrunés, Pico Negro, Duroni 3 y Hartland pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad ya que todos los cruzamientos entre ellas son incompatibles. Los cruzamientos en los que ‘Cristobalina’ fue utilizada como parental masculino y las otras cuatro variedades fueron utilizadas como parental femenino fueron todos compatibles mientras que los recíprocos, es decir, en los que ‘Cristobalina’ es el parental femenino y las otras cuatro son el parental masculino, fueron incompatibles.

Tabla 7.1. Cuadro de compatibilidad de variedades del Grupo VI de incompatibilidad incluyendo ‘Cristobalina’. Cruces realizados *in vivo* en el laboratorio y observados con microscopía de fluorescencia. +: cruce compatible, -: cruce incompatible.

♀ \ ♂	Cristobalina	Ambrunés	Pico Negro	Duroni 3	Hartland
Cristobalina	+	-	-	-	
Ambrunés	+	-	-	-	
Pico Negro	+	-	-		-
Duroni 3	+	-	-	-	-
Hartland	+		-		-

Caracterización molecular de las ribonucleasas S_3 y S_6 de ‘Cristobalina’

En la variedad Cristobalina, los análisis de PCR utilizando los cebadores conservados de las ribonucleasas S de cerezo amplifican fragmentos correspondientes a los alelos S_3 y S_6 (ver Capítulo 4). Para comprobar la identidad de estos fragmentos, las ribonucleasas de S_3 y S_6 de ‘Cristobalina’ fueron amplificadas mediante PCR con los pares de cebadores S3F1-S3R1 y S6F1-S6R1 respectivamente, y los fragmentos obtenidos de 1474 y 1304 pb fueron clonados, secuenciados y comparados con las secuencias ya caracterizadas de estas dos ribonucleasas (Tao *et al.*, 1999a; Sonneveld *et al.*, 2001).

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos de la ribonucleasa S_3 de ‘Cristobalina’ es prácticamente idéntica a la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA de las ribonucleasas S_3 , identificadas en la variedad Satonishiki (S_3S_6) (DDBJ/EMBL/GenBank AB010305; Tao *et al.*, 1999a) y en la variedad Napoleon (S_3S_4) (DDBJ/EMBL/GenBank AJ298312; Sonneveld *et al.*, 2001), ya que la secuencia de ADN de la ribonucleasa S_3 de ‘Cristobalina’ difiere de la secuencia S_3 de ‘Satonishiki’ y ‘Napoleon’ en únicamente dos nucleótidos. Por otra parte, la comparación de la secuencia genómica obtenida de la ribonucleasa S_3 de ‘Cristobalina’ con la secuencia genómica de la ribonucleasa S_3 de ‘Satonishiki’ (DDBJ/EMBL/GenBank AB031816; Tao *et al.* 1999b) reveló 5 nucleótidos adicionales diferentes situados en las secuencias de ADN de los intrones.

La secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de la ribonucleasa S_6 de ‘Cristobalina’ es idéntica a la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA de la ribonucleasa S_6 identificada en ‘Satonishiki’ (DDBJ/EMBL/GenBank AB010306; Tao *et al.*, 1999a) y ambas difieren de la de ‘Colney’ (S_9S_6) (DDBJ/EMBL/GenBank AJ298315; Sonneveld *et al.*, 2001) en 2 aminoácidos, debido a la diferencia de 4 nucleótidos. La comparación de la secuencia genómica obtenida de las ribonucleasa S_6 de ‘Cristobalina’ con la secuencia genómica de la ribonucleasa S_6 de ‘Satonishiki’ (DDBJ/EMBL/GenBank AB031818; Tao *et al.* 1999b) reveló 3 nucleótidos diferentes situados en las secuencias de ADN de los intrones. En cualquier caso, si aceptamos un valor para la tasa de error en las bases públicas de datos de secuencias de entre 0,037% a 0,29% (Krawetz, 1989) o incluso

superior (Kristensen *et al.*, 1992), las diferencias encontradas entre las distintas secuencias de los dos alelos no serían significativas.

Análisis genético de la mutación de autocompatibilidad de ‘Cristobalina’

Con el objetivo de caracterizar la genética del carácter de autocompatibilidad de ‘Cristobalina’ y comprobar si la mutación que aporta este carácter se debe a una mutación en el factor *S* del polen o del estilo y si reside en el alelo S_3 o S_6 , se realizó en campo una autofecundación controlada de ‘Cristobalina’ y cruzamientos recíprocos con una variedad con los mismos alelos (‘Ambrunés’; S_3S_6), con una variedad con el alelo S_3 (‘Lambert’; S_3S_4) y con otra variedad con el alelo S_6 (‘Ramón Oliva’; S_6S_9) (Tabla 7.2). De estos cruzamientos se analizó el genotipo *S* de las descendencias mediante PCR.

De la autofecundación controlada de 150 flores de ‘Cristobalina’ se obtuvieron 57 frutos (Tabla 7.2). El genotipo *S* de estos segregó en tres clases; homocigotos S_3S_3 , heterocigotos S_3S_6 y homocigotos S_6S_6 , con un número de individuos por clase de 19, 31 y 7 respectivamente (Tabla 7.2). El análisis de los alelos *S* de otros 43 frutos de ‘Cristobalina’ recogidos aleatoriamente y que se consideran fecundados por polen de ‘Cristobalina’ puesto que esta variedad es de floración muy temprana y su época de floración no se solapa con ninguna otra variedad (Figura 7.1.a.), segregó en las mismas tres clases en la relación 10:26:7 ($S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$). El cruzamiento de ‘Ambrunés’ x ‘Cristobalina’ dio lugar a 53 frutos de 348 flores polinizadas. La descendencia de este cruzamiento segregó en las mismas clases que la autofecundación en la relación 19:25:3 ($S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$). Sin embargo, en el cruzamiento recíproco ‘Cristobalina’ x ‘Ambrunés’ no hubo cuajado en ninguna de las 150 flores polinizadas. La presencia de individuos homocigotos S_3 y de homocigotos S_6 en la descendencia de la autofecundación de ‘Cristobalina’ y en el cruzamiento de ‘Ambrunés’ x ‘Cristobalina’, indica que ambos alelos del polen de ‘Cristobalina’ pueden efectuar la fecundación. Sin embargo, las proporciones observadas, no se ajustan a una proporción esperada de 1:2:1 para una mutación en ambos alelos del polen de ‘Cristobalina’ (Tabla 7.2).

En los cruzamientos con ‘Lambert’ (S_3S_4) y ‘Ramón Oliva’ (S_6S_9) como parentales masculinos y ‘Cristobalina’ como parental femenino se polinizaron 320 y 295 flores respectivamente de las que se obtuvieron 130 y 110 frutos respectivamente (Tabla 7.2). De ambas descendencias se analizaron 10 frutos, siendo la segregación en la población de ‘Cristobalina’ x ‘Lambert’ $S_3S_4:S_4S_6$ (4:6) y la de ‘Cristobalina’ x ‘Ramón Oliva’ $S_3S_9:S_6S_9$ (7:3). Los cruzamientos recíprocos con ‘Cristobalina’ como parental masculino y ‘Lambert’ y ‘Ramón Oliva’ como parentales femeninos dieron lugar a 95 y 138 frutos respectivamente. Tras la siembra de los embriones, se obtuvieron 41 individuos del cruzamiento con ‘Lambert’ y no se obtuvo ninguna plántula del cruzamiento con ‘Ramón Oliva’, por lo que el cruzamiento no ha podido ser analizado. En la descendencia del cruzamiento con ‘Lambert’ se obtuvo la segregación $S_3S_3:S_3S_4:S_3S_6:S_4S_6$ (3:0:21:17); esta proporción tampoco se ajusta a la proporción esperada de 1:1:1:1 si ambos alelos de ‘Cristobalina’ estuvieran mutados (Tabla 7.2).

Tabla 7.2. Cruzamientos realizados en campo y segregación de los genotipos *S* de las descendencias analizados mediante PCR. Proporciones esperadas y análisis de chi cuadrado, cuando ambos alelos del factor *S* del polen están mutados.

♀	♂	Nr. ind.	Segregación observada	Nr. obs.	Prop. esperada	Nr. esperado	P	χ^2
Cristobalin a S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	57	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	19:31:7	1:2:1	14:29:14	0,064	5,49
Cristobalin a S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	43 ¹	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	10:26:7	1:2:1	11:21:11	0,316	2,30
Cristobalin a S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	100 ²	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	29:57:14	1:2:1	25:50:25	0,040	6,46
Ambrunés S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	47	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	19:25:3	1:2:1	12:23:12	0,004	11,09
Cristobalin a S_3S_6	Ambrunés S_3S_6	0						
Lambert S_3S_4	Cristobalina S_3S_6	41	$S_3S_6:S_4S_6:$ $:S_3S_3:S_3S_4$	21:17:3:0	1:1:1:1	10:10:10:10	$8,1 \times 10^{-7}$	31,10
Cristobalin a S_3S_6	Lambert S_3S_4	10	$S_3S_4:S_4S_6$	4:6	1:1	5:5	0,819	0,40
Ramón Oliva S_6S_9	Cristobalina S_3S_6	0						
Cristobalin a S_3S_6	Ramón Oliva S_6S_9	10	$S_3S_9:S_6S_9$	7:3	1:1	5:5	0,449	1,60
Brooks S_7S_9	Cristobalina S_3S_6	41	$S_7S_3:S_7S_6:$ $:S_3S_9:S_6S_9$	11:12:9:9	1:1:1:1	10:10:10:10	0,883	0,66

¹: Polinización libre. ²: Número total de individuos de autofecundación controlada y autofecundación libre.

Una hipótesis que podría explicar los resultados obtenidos sería la existencia de un locus (que denominamos locus M) cuyo producto génico pueda ser epistático sobre el factor S del polen. En ese caso, una mutación del factor M (M^*) en el polen, haría que se produjese fecundación en presencia de ribonucleasas S en el pistilo con el mismo alelo de incompatibilidad. Así, los genotipos esperados en la descendencia de la autofecundación de ‘Cristobalina’ bajo la hipótesis de un locus M con un alelo M^* ligado al alelo S_3 , se reflejan en la tabla 7.3.

Tabla 7.3. Genotipos esperados en la descendencia de la autofecundación de ‘Cristobalina’ para un alelo M^* ligado al alelo S_3 , que modifica el fenotipo del locus S en el polen y no modifica el fenotipo del locus S en el estilo.

		Polen				
		Parentales		Recombinantes		
		Gametos	S_3M^*	S_6M	S_3M	S_6M^*
Estilo	Parentales	S_3M^*	S_3M^*/S_3M^*	NF	NF	S_3M^*/S_6M^*
		S_6M	S_3M^*/S_6M	NF	NF	S_6M/S_6M^*
	Recombinantes	S_3M	S_3M/S_3M^*	NF	NF	S_3M/S_6M^*
		S_6M^*	S_3M^*/S_6M^*	NF	NF	S_6M^*/S_6M^*

NF: no hay fecundación.

De esta manera, en la descendencia de la autofecundación de ‘Cristobalina’ existirían individuos homocigotos para los alelos S_3 y S_6 , e individuos heterocigotos para los dos alelos. Si consideramos que el factor M no tiene ningún efecto sobre el fenotipo del factor S en el estilo, podemos estimar la frecuencia de recombinación (FR) entre los loci S y M a partir del número de homocigotos S_6S_6 . Así, en la población de 100 individuos (Tabla 7.2) el número de recombinantes homocigotos S_6S_6 es de 14 individuos y el número teórico de individuos en la descendencia sería 200, porque la mitad de los genotipos posibles, los procedentes de polen S_6M y S_3M , no llegan a producirse (Tabla 7.3). En ese caso, FR sería 0,28 y las segregaciones observadas y esperadas en los distintos cruzamientos se reflejan en la Tabla 7.4.

Tabla 7.4. Segregaciones observadas de los cruzamientos analizados y análisis de chi cuadrado cuando la frecuencia de recombinación entre los loci *S* y *M* es de 0,28 y cuando la variedad Cristobalina ha sido utilizada como parental masculino siendo su genotipo para estos dos loci S_3M^*/S_6M .

♀	♂	Nr. indiv.	Segregación observada	Nr. obs.	Nr. esperado FR=0,28	P	χ^2
Cristobalina S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	57	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	19:31:7	20,52:28,5:7,98	0,80	0,45
Cristobalina S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	43 ¹	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	10:26:7	15,48:21,5:6,02	0,22	3,04
Cristobalina S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	100 ²	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	29:57:14	36:50:14	0,31	2,31
Ambrunés S_3S_6	Cristobalina S_3S_6	47	$S_3S_3:S_3S_6:S_6S_6$	19:25:3	16,92:23,5:6,58	0,32	2,30
Lambert S_3S_4	Cristobalina S_3S_6	41	$S_3S_6:S_4S_6:$ $:S_3S_3:S_3S_4$	21:17 :3:0	11,92:11,92: :8,58:8,58	1×10^{-4}	21,29
Brooks S_1S_9	Cristobalina S_3S_6	41	$S_1S_3:S_1S_6:$ $:S_3S_9:S_6S_9$	11:12: :9:9	10,25:10,25: :10,25:10,25	0,88	0,66
Brooks S_1S_9	Cristobalina S_3S_6	32 ³	SC:SI	16:16	16:16	1,00	0,00
Brooks S_1S_9	Cristobalina S_3S_6	32 ³	S_1S_3 -SC: S_1S_6 -SC: : S_3S_9 -SC: S_6S_9 -SC: : S_1S_3 -SI: S_1S_6 -SI: : S_3S_9 -SI: S_6S_9 -SI	5:5: :2:4: :3:4: :4:5	5,76:2,24: :5,76:2,24: :2,24:5,76: 2,24:5,76	0,21	11,34

¹: Polinización libre. ²: Número total de individuos de autofecundación controlada y autofecundación libre. ³: Individuos para los que se ha observado la reacción de incompatibilidad o compatibilidad al microscopio. SC: autocompatible, SI: autoincompatible

Estudio de la transmisión del carácter de autocompatibilidad

Para estudiar la correlación entre los alelos heredados de ‘Cristobalina’ y la expresión fenotípica del carácter de autocompatibilidad, se analizó el genotipo *S* mediante PCR de 41 individuos descendientes del cruzamiento de ‘Brooks’ (S_1S_9) x ‘Cristobalina’ (S_3S_6) y el crecimiento de los tubos polínicos de la autofecundación de cada árbol realizada en flores *in vivo* en el laboratorio. Los genotipos de los 41 árboles segregaron en las cuatro clases esperadas $S_1S_3:S_1S_6:S_3S_9:S_6S_9$ (11:12:9:9), (Tabla 7.2). La observación de los tubos polínicos al microscopio reveló la presencia de individuos autocompatibles e individuos autoincompatibles. Este ensayo fue repetido durante dos años seguidos y, debido a

problemas de carácter técnico como la escasez de flores en algunos árboles o años, sólo se han obtenido resultados concluyentes para 32 de los 41 árboles analizados. De estos 32 árboles, 16 de ellos son autocompatibles y los otros 16 son autoincompatibles. De los árboles que podemos considerar autocompatibles tras el examen de los tubos polínicos al microscopio, existen 5 árboles con el genotipo S_1S_3 , 5 árboles con el genotipo S_1S_6 , 2 árboles con el genotipo S_3S_9 y 4 árboles con el genotipo S_9S_6 . Asimismo de los 16 árboles autoincompatibles, 3 árboles tienen el genotipo S_1S_3 , 4 el genotipo S_1S_6 , 4 el genotipo S_3S_9 y 5 el genotipo S_9S_6 .

DISCUSIÓN

En este trabajo se han utilizado diferentes métodos para estudiar el carácter de autocompatibilidad de la variedad Cristobalina. Los resultados obtenidos indican que ‘Cristobalina’ tiene una mutación que afecta a la función del factor S del polen y no del estilo, y que esta mutación no radica específicamente en ninguno de los dos alelos de incompatibilidad sino que afecta a ambos alelos.

Caracterización de la mutación de autocompatibilidad

Los datos obtenidos indican que la autocompatibilidad en ‘Cristobalina’ no se debe a una mutación de la función del factor S del estilo ya que, en los cruzamientos realizados en el laboratorio, ‘Cristobalina’ no puede ser fecundada por variedades con los mismos alelos de incompatibilidad (Tabla 7.1) y, en los cruzamientos realizados en campo en los que ‘Cristobalina’ es utilizada como parental femenino con ‘Ambrunés’, ‘Lambert’ y ‘Ramón Oliva’ como parentales masculinos, la segregación de las descendencias fue la esperada para un cruzamiento en el que no hay mutación en el estilo (Tabla 7.2). En la descendencia del cruce de ‘Cristobalina’ (S_3S_6) x ‘Lambert’ (S_3S_4) no aparece ni el genotipo homocigoto S_3S_3 ni el genotipo heterocigoto S_3S_6 , lo que indica que sólo el polen S_4 de ‘Lambert’ es capaz de efectuar la fecundación y que el polen S_3 de ‘Lambert’ es detenido en el estilo. El mismo razonamiento es aplicable al alelo S_6 dado que no se detectó la presencia de individuos S_6S_6 o S_3S_6 en la descendencia del cruzamiento de

‘Cristobalina’ (S_3S_6) x ‘Ramón Oliva’ (S_6S_9). Del mismo modo, en el cruzamiento de ‘Cristobalina’ (S_3S_6) x ‘Ambrunés’ (S_3S_6) no hubo fecundación, luego ambos tubos polínicos S_3 y S_6 de ‘Ambrunés’ fueron detenidos por las ribonucleasas S_3 y S_6 de ‘Cristobalina’. Esta situación concuerda con el hecho de que la secuencia de aminoácidos obtenida de las ribonucleasas de ‘Cristobalina’ es la misma que la de las ribonucleasas S_3 y S_6 caracterizadas en otros cultivares de cerezo y que son capaces de causar una reacción de incompatibilidad en presencia de polen con los mismos alelos.

No obstante, los resultados obtenidos cuando ‘Cristobalina’ actúa como parental masculino parecen indicar que el comportamiento autocompatible de ‘Cristobalina’ se debe a un comportamiento anómalo del factor S del polen. Este hecho se puede deducir de los resultados de los cruzamientos realizados *in vivo* en el laboratorio ya que el polen de ‘Cristobalina’ es capaz de fecundar variedades del mismo grupo de incompatibilidad (Tabla 7.1), y en campo es capaz de fecundar a la variedad Ambrunés (Tabla 7.2). Es decir, el factor S del polen de ‘Cristobalina’ tiene o está afectado por una mutación que le permite atravesar el estilo en presencia de ribonucleasas con su mismo alelo de incompatibilidad. Es más, la presencia de genotipos homocigotos S_3 y S_6 , tanto en la autofecundación de ‘Cristobalina’ como en el cruce con la variedad Ambrunés como parental femenino, indica que tanto el polen S_3 como el polen S_6 no son inhibidos por la presencia de ribonucleasas S_3 o S_6 y que, por lo tanto, los dos factores S del polen de ‘Cristobalina’ presentan un comportamiento anómalo. Esta hipótesis se corrobora por la presencia en la descendencia de la población de ‘Brooks’ x ‘Cristobalina’ de individuos autocompatibles que han heredado el alelo S_3 y de individuos autocompatibles que han heredado el alelo S_6 y que indica que ambos alelos pueden aportar el carácter de autocompatibilidad, por lo que este no estaría correlacionado exclusivamente con ninguno de los dos alelos. Sin embargo, si ambos alelos son capaces de aportar indistintamente el carácter de autocompatibilidad, toda la descendencia del cruzamiento ‘Brooks’ x ‘Cristobalina’ debería ser autocompatible y se han observado tanto individuos autocompatibles como autoincompatibles, lo que indica que, aunque ambos alelos pueden aportar el carácter de autocompatibilidad, no siempre es así.

La posibilidad de que la autocompatibilidad en la variedad Cristobalina esté causada por la presencia de un alelo adicional, ya sea por un aumento en la ploidía o por un fragmento cromosómico, implicaría que la descendencia de la autofecundación sería heterocigótica lo que no se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo. Alternativamente, una duplicación de solamente parte del locus S , de manera que la ribonucleasa S correspondiente no hubiera sido duplicada y, por lo tanto, no pueda ser detectada, podría ser la explicación de la mutación que confiere la autocompatibilidad en ‘Cristobalina’. En ese caso la duplicación del locus S no podría ser detectada con el método utilizado en este trabajo para identificar el genotipo S de las descendencias, y los genotipos aparentemente homocigotos podrían ser heterocigotos.

Análisis genético de la autocompatibilidad en ‘Cristobalina’

La proporción de la segregación observada en la autofecundación de ‘Cristobalina’ y en el cruzamiento de ‘Ambrunés’ x ‘Cristobalina’, no se ajusta a la proporción esperada (1:2:1; hom.:het.:hom.) para una mutación del factor S del polen en ambos alelos (Tabla 7.2). Aunque esta desviación se puede deber a un número escaso de individuos en la descendencia analizada, el hecho de que la desviación se produzca en la misma dirección, favoreciendo al alelo S_3 , en dos cruzamientos distintos indica que puede deberse a otras causas. Una podría ser una mayor capacidad competitiva del polen S_3 durante el crecimiento en el estilo; de hecho, existen numerosos ejemplos de diferencias en la capacidad competitiva del polen en distintas circunstancias (Hormaza y Herrero, 1992). También podría deberse a una selección postzigótica en detrimento de los embriones homocigóticos S_6S_6 . Pero, además de la segregación distorsionada en las descendencias mencionadas, no toda la descendencia del cruzamiento de ‘Brooks’ x ‘Cristobalina’ es autocompatible. Por tanto, los resultados obtenidos con segregaciones distorsionadas y descendencias autoincompatibles son difíciles de explicar bajo la hipótesis de que ambos alelos estén mutados y que ambos aporten siempre el carácter de autocompatibilidad. La segregación obtenida en el cruzamiento ‘Lambert’ (S_3S_4) x ‘Cristobalina’ (S_3S_6), tampoco concuerda con esta hipótesis, ya que en ese caso, si tanto el polen S_3 como el polen S_6 de ‘Cristobalina’ hubieran atravesado el estilo y llegado a efectuar la fecundación, el genotipo

S_3S_4 debería estar presente en la descendencia y las cuatro clases segregantes S_3S_6 , S_4S_6 , S_3S_3 , S_3S_4 deberían estar presentes en la misma proporción (Tabla 7.2). Como en el caso anterior, varias explicaciones son posibles. Por un lado, un bajo número de individuos en la población estudiada. Por otro lado, una selección pre o postzigótica que confiera una ventaja al polen S_6 . Sin embargo, esta hipótesis no concuerda con las segregaciones obtenidas en los cruzamientos ‘Cristobalina’ x ‘Cristobalina’ o ‘Ambrunés’ x ‘Cristobalina’ discutidas anteriormente en las que se produce un efecto inverso, que es una ventaja hacia el polen S_3 .

Una hipótesis alternativa que podría explicar más eficientemente los resultados obtenidos es que exista un locus, al que se le puede nombrar como locus M , que modifique la función del factor S del polen. Cuando el factor M está mutado (M^*), se modificaría la función del factor S del polen de manera que podría efectuar la fecundación en presencia de ribonucleasas S con su mismo alelo de incompatibilidad, mientras que si el factor M no está mutado, el tubo polínico no supera la barrera de incompatibilidad. Si el genotipo de ‘Cristobalina’ para los loci S y M fuera S_3M^*/S_6M , el genotipo de los granos de polen producidos por ‘Cristobalina’ sería S_3M^* y S_6M o S_3M y S_6M^* cuando haya recombinación entre los loci S y M . De forma que en una autofecundación de ‘Cristobalina’ o en un cruzamiento con una variedad con los mismos alelos, los gametos con el genotipo S_6M y S_3M no efectuarán la fecundación y los gametos con el genotipo S_3M^* o S_6M^* si lo harán (Tabla 7.3). De esta manera, en la descendencia de la autofecundación de ‘Cristobalina’ existirán individuos homocigotos para los alelos S_3 y S_6 , e individuos heterocigotos para los dos alelos. La frecuencia de recombinación entre los locus S y M de 0,28, calculada a partir de los datos de la población de autofecundación de ‘Cristobalina’, explicaría correctamente la mayoría de las segregaciones observadas en las descendencias analizadas. Es más, explicaría por qué en la descendencia de ‘Brooks’ x ‘Cristobalina’ la mitad de los individuos son autocompatibles y la otra mitad son autoincompatibles y por qué ambos fenotipos se dan en las cuatro clases segregantes (Tabla 7.4). Sin embargo, la segregación obtenida en la población de ‘Lambert’ x ‘Cristobalina’ tampoco se ajusta a la hipótesis del locus M^* ligado a S_3 , aunque la probabilidad aumenta considerablemente de la primera a la segunda hipótesis, de $8,1 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ respectivamente (Tablas 7.2 y 7.4). En esta población la presencia del locus modificador M^* explicaría la presencia de un mayor

número de individuos heterocigotos S_3S_6 y S_4S_6 que de individuos S_3S_3 y S_3S_4 , puesto que el polen con el alelo S_6 siempre efectuará la fecundación independientemente de la presencia del factor M o M^* puesto que no hay presencia de ribonucleasas S_6 en el estilo. Sin embargo, el polen con el alelo S_3 sólo efectuará la fecundación cuando esté ligado al factor M^* , dada la presencia de las ribonucleasas S_3 del estilo de ‘Lambert’. La realización de nuevos cruzamientos entre estas y otras variedades podrá ayudar a confirmar si, en efecto, las segregaciones obtenidas pueden estar causadas por un locus modificador y establecer con mayor exactitud la distancia de dicho locus al locus S .

Autocompatibilidad en ‘Cristobalina’, mutantes del polen y modelos de interacción polen-pistilo

Si suponemos que la reacción de incompatibilidad en cerezo se realiza siguiendo el modelo inhibitor, de acuerdo con el modelo propuesto por Lai *et al.* (2002) y Ushijima *et al.* (2003), la pérdida de funcionalidad del factor S del polen en los dos alelos de ‘Cristobalina’ sería una mutación letal ya que ninguna S -RNasa sería inhibida y los tubos polínicos serían detenidos. Solamente una mutación en la región de especificidad alélica del SFB de ambos alelos, pero no en la región del dominio de inhibición, desactivaría a todas las ribonucleasas permitiendo el crecimiento de los tubos polínicos, y explicando así la superación de la barrera de incompatibilidad en esta variedad. Por otro lado, según el modelo de Luu *et al.* (2000, 2001), en ‘Cristobalina’ podría existir una mutación que inhabilite a ambos factores del polen permitiendo así que RI (Inhibidor de la Ribonucleasa) desactive a todas las ribonucleasas y que por lo tanto siempre haya fecundación. Para ambos modelos, los dos factores S del polen de ‘Cristobalina’ deberían haber mutado dando lugar al mismo fenotipo; en el primer caso tendría que existir una mutación que dé lugar a la pérdida de especificidad simultánea de ambos factores S del polen y en el segundo tendría que existir una supresión cromosómica o una mutación de la expresión del factor del polen S pero no de RI. Sin embargo, si partimos de la base de que la tasa espontánea de mutación del locus S en cerezo es baja ($0,3-2,5 \times 10^{-6}$ granos de polen) en comparación con su diversidad alélica (Lewis, 1948), y que las mutaciones hacia la autocompatibilidad en cerezo son muy escasas (Tehrani y Brown, 1992), es muy

improbable que ambos alelos S del polen hayan mutado al mismo tiempo en una única variedad.

Factores externos al locus S , o loci modificadores, que modifican la respuesta de incompatibilidad también han sido descritos en varios trabajos (McCubbin y Kao, 2000). La mayoría de estos factores han sido descritos en Solanáceas y su efecto está implicado en la modificación de la respuesta estilar. Sin embargo, Thompson *et al.* (1991) propusieron la existencia de un locus modificador (I), no relacionado con el locus S , y que afectaría solamente a la función del factor del S polen, para explicar la inexistencia de duplicaciones del locus S en las líneas autocompatibles de *Solanum* estudiadas. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo y la deducción a partir de éstos de la existencia del supuesto factor M^* descrito en el apartado anterior. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que una modificación en la expresión del factor S del polen, dentro del modelo inhibitor sólo podría explicarse mediante un modelo en el que el dominio de inhibición y el dominio de especificidad alélica del factor S del polen se encuentren en genes diferentes, ya que la situación contraria sería una mutación letal. De manera que el supuesto locus M podría existir en un modelo en el que ambos dominios estén en dos proteínas diferentes, modificando o suprimiendo la función del factor S del polen e impidiendo que este proteja o reconozca a las ribonucleasas S con su mismo alelo. De esta forma, todas las ribonucleasas S serían inhibidas por el factor de inhibición y siempre habría fecundación. Aunque estudios recientes apuntan al modelo inhibitor del factor S del polen, también existe evidencia que apoya el modelo receptor (De Nettancourt, 2001), en el cual los mutantes del polen puedan ser causados por supresiones del factor S del polen o por duplicaciones del alelo S .

Con los datos obtenidos en este trabajo se puede descartar la hipótesis de la presencia de polen dialélico debido a una duplicación del gen S que contenga el gen de la ribonucleasa S , en cuyo caso la duplicación del locus S sólo sería parcial. Además, parece poco probable que ambos alelos de ‘Cristobalina’ hayan mutado simultáneamente dando lugar al mismo fenotipo. Sin embargo, los resultados apuntan a que la superación de la barrera de incompatibilidad por cualquiera de los dos factores S del polen de ‘Cristobalina’ puede estar causada por la presencia de un locus M mutado (M^*), ligado al alelo S_3 , que

modificaría la función del factor *S* del polen permitiéndole superar la presencia de las ribonucleasas *S* correspondientes. Esta hipótesis, puede tener cabida en un modelo como el de Luu *et al.* (2000, 2001). La profundización en el estudio de la autocompatibilidad en ‘Cristobalina’ con nuevos cruzamientos y la caracterización molecular en cerezo del gen SFB descrito en almendro y posible candidato al factor *S* del polen en GSI (Lai *et al.*, 2002; Ushijima *et al.*, 2003) y la proteína PhSB1 candidata a factor RI (Sims y Ordanic, 2001) en el modelo de Luu *et al.* (2000, 2001) puede abrir nuevas expectativas en este sentido.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Identificación molecular y relaciones de similitud en variedades y patrones de cerezo

La utilización de marcadores moleculares tipo microsatélite se está consolidando como uno de los métodos mas apropiados para llevar a cabo estudios de identificación de genotipos y similitud genética en numerosas especies vegetales (Gupta y Varshney, 2000) incluidas las especies frutales (Wünsch y Hormaza, 2002a). En este trabajo, el uso de una batería de microsatélites desarrollados en melocotonero (Aranzana *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 1999; Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000) ha permitido establecer la identidad del genotipo de 104 variedades y 17 patrones de cerezo pertenecientes a distintas especies e híbridos interespecíficos, independientemente de la época del año o del ciclo fenológico del árbol. La utilización de secuencias de microsatélites desarrollados en una especie diferente para llevar a cabo la identificación de variedades de cerezo abre la posibilidad de utilizar un gran número adicional de microsatélites que continúan desarrollándose en melocotonero (Aranzana *et al.*, 2002; Dirlewanger *et al.*, 2002) para llevar a cabo la identificación varietal en cerezo y otras especies del género *Prunus* (Hormaza, 2002; Serrano *et al.*, 2002). Aunque algunas secuencias se han desarrollado recientemente en cerezo (Downey y Iezzoni, 2000; Cantini *et al.*, 2001), la transportabilidad de los microsatélites entre especies cercanas reduce la necesidad de identificar estas secuencias en cada especie del género, lo que va a permitir eliminar uno de los principales limitantes para una utilización más generalizada de este tipo de marcadores.

La similitud genética entre las variedades analizadas obtenida a partir de los datos moleculares del análisis con microsatélites, agrupa a estas de acuerdo con su origen geográfico. Así, las variedades antiguas y parentales de programas de mejora analizadas de la colección del SIA (Zaragoza) se agrupan en variedades originarias del sur de Europa y variedades originarias de Centro Europa y Norteamérica, lo que se explica teniendo en cuenta que las variedades del centro y norte de Europa son las que fueron introducidas en Norteamérica, y han supuesto la base de los programas de mejora en EEUU y Canadá. Asimismo, las variedades locales del Valle del Jerte analizadas se diferencian claramente del resto de variedades introducidas en esa zona con posterioridad, y de las variedades que

son producto del cruzamiento entre variedades locales y foráneas. La posibilidad de diferenciar de una manera fiable y objetiva las variedades tradicionales del Valle del Jerte, permitirá conservar y manejar con eficacia un germoplasma de gran interés por su calidad de fruto y maduración tardía.

Por otra parte, el estudio de la variabilidad y similitud genética entre los diferentes genotipos analizados indica que el cerezo presenta una variabilidad similar a otras especies de *Prunus*, como el melocotonero (Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000), que, sin embargo, son fundamentalmente autógamas. Esta situación podría se puede explicar por la estrecha base genética de los genotipos cultivados de cerezo, que se hace evidente por el hecho de la limitada variabilidad de los caracteres de potencial interés económico en esta especie (Iezzoni *et al.*, 1990) y porque que todas las variedades autocompatibles cultivadas o utilizadas en programas de mejora actualmente provienen de la misma variedad, ‘Stella’ (Lapins, 1975). La posibilidad de estudiar la diversidad genética entre las distintas variedades, patrones y poblaciones mediante el uso de microsatélites beneficiará a los programas de mejora ayudando a tomar decisiones tanto respecto a los genotipos parentales para los cruzamientos como al manejo de las colecciones de germoplasma permitiendo maximizar la diversidad a conservar. En cerezo, esta aproximación es cada vez más importante para mantener la variabilidad existente en el material silvestre en peligro de extinción que se encuentra esparcido por muchas zonas de Europa y algunos países asiáticos. Los microsatélites parecen una herramienta adecuada para abordar estos objetivos, y sería de interés ampliar este tipo de estudios a las áreas donde es necesario conservar variedades o genotipos de interés antes de que desaparezcan.

Caracterización molecular de genotipos *S*, nuevos alelos de incompatibilidad y autocompatibilidad en cerezo

El desarrollo de un método de identificación de alelos *S* mediante PCR en cerezo agiliza el proceso realizado tradicionalmente mediante cruzamientos controlados y complementa otros métodos como el análisis de ribonucleasas estilares (Bošković y Tobutt, 2001) que necesita de la utilización de material estilar solamente disponible

durante la floración en primavera y en árboles adultos. La ventaja principal del método desarrollado, basado en cebadores complementarios a las zonas conservadas de las ribonucleasas S de cerezo, es que en una reacción se pueden identificar un gran número de alelos y todos los alelos de un mismo genotipo, y simultáneamente, se pueden identificar nuevos alelos. En los métodos de PCR basados en cebadores alelo-específicos (Sonneveld *et al.*, 2001) es necesario llevar a cabo una reacción de PCR para cada alelo, lo que multiplica el número de reacciones por genotipo por el número de alelos posibles. Además, la utilización de cebadores alelo-específicos disminuye considerablemente la probabilidad de identificar nuevos alelos. Sin embargo, el uso de enzimas de restricción para diferenciar alelos después de la amplificación con cebadores de las zonas conservadas, lo que ha sido denominado PCR-RFLP (Yamane *et al.*, 2001), puede ser de gran utilidad para complementar el método propuesto de identificación de alelos S mediante PCR con cebadores conservados.

En este trabajo, la utilización del método desarrollado en las colecciones de cerezo analizadas ha permitido establecer la constitución alélica S de 90 variedades estudiadas, entre las que se encuentran algunas variedades de gran interés comercial como son ‘Brooks’ o Marvin 4-70’, cuyo genotipo S no había sido descrito previamente. Además, se han identificado al menos 6 nuevos alelos de incompatibilidad de los cuales 3 han sido clonados y secuenciados, corroborando su identidad como ribonucleasas S . Estos alelos han sido denominados S_{23} , S_{24} y S_{25} y están presentes en las variedades Vittoria, Pico Colorado y Taleguera Brillante respectivamente.

A pesar de la utilidad y aplicabilidad del método desarrollado, los cruzamientos controlados o la observación al microscopio de estos siguen siendo métodos precisos para establecer las relaciones de incompatibilidad entre variedades de cerezo, ya que son estos los que observan el resultado de la reacción de incompatibilidad entre genotipos. La identificación de alelos S mediante PCR, sin embargo, puede ser utilizada para otras aplicaciones como la identificación de los alelos de incompatibilidad en descendencias y los consiguientes estudios genéticos, como ha sido llevado a cabo en este trabajo para las descendencias del estudio de ‘Cristobalina’, o la selección precoz de un alelo S concreto, como el alelo S_4 en descendencias de la variedad Stella que es el que aporta la

autocompatibilidad. Además, la identificación de alelos *S* mediante PCR puede ser utilizado como un carácter adicional a la identificación de genotipos utilizando microsatélites dado que, de hecho, son alelos de un mismo locus *S*, y por lo tanto, su herencia es mendeliana y presentan una alta reproducibilidad. En cualquier caso, el creciente número de alelos de incompatibilidad descritos debe conducir a un consenso entre los grupos que trabajan en este área para establecer unos criterios comunes que permitan distinguir inequívocamente los alelos. A medio plazo, una vez que los nuevos alelos han sido identificados mediante la metodología descrita en este trabajo, la distinción inequívoca debería estar basada en la comparación de secuencias de ADN.

En este sentido, la comparación de las secuencias obtenidas de las ribonucleasas *S*₂₃, *S*₂₄, *S*₂₅ y *S*₁₂, con las secuencias de otras 6 ribonucleasas de cerezo previamente descritas (Tao *et al.*, 1999; Sonneveld *et al.*, 2001) y otras ribonucleasas del género *Prunus* ha permitido corroborar que la similitud interespecífica entre estas secuencias es a menudo mayor que la similitud intraespecífica lo que apoya la hipótesis de que la divergencia alélica de este gen fue anterior a la especiación (Ishimizu *et al.*, 1998; Ushijima *et al.*, 1998a). Sin embargo, las cuatro secuencias obtenidas en este trabajo son más similares a algunas de las secuencias de cerezo previamente descritas que a las secuencias de otras especies del género, lo que es esperado puesto que la evolución de las secuencias continúa tras la especiación.

En este trabajo se han caracterizado por primera vez en una especie del género *Prunus* las regiones flanqueantes 5' de las ribonucleasas *S* identificadas. Dicha caracterización ha revelado que, con excepción de la caja TATA, en estas no se encuentra conservado ninguno de los motivos descritos y que se cree juegan un papel en la regulación de la expresión de las ribonucleasas *S* en las Solanáceas (Kaufmann *et al.*, 1991; Ficker *et al.*, 1998). Por otra parte, su comparación con las secuencias flanqueantes 5' de peral Japonés ha corroborado la poca similitud existente entre las secuencias de ambas subfamilias (Prunoideas y Maloideas) de las Rosáceas y su diferenciación filogenética (Ma y Oliveira, 2002; Ushijima *et al.*, 1998a). Por otra parte, la comparación de las secuencias de aminoácidos, derivadas de las secuencias de ADN, de las ribonucleasas *S*₆ y *S*₂₄, muestra que sólo difieren en los residuos situados entre las regiones conservadas C1 y C2.

La comprobación de que esta zona variable, denominada HV1 en las Solanáceas, puede tener una función en la especificidad alélica de las ribonucleasas *S* de las Rosáceas puede ser de gran interés para profundizar en el estudio de la interacción polen-pistilo en la reacción de incompatibilidad en esta familia.

El estudio de la variedad autocompatible ‘Cristobalina’ ha proporcionado un acercamiento preliminar al conocimiento de las causas que pueden explicar dicho comportamiento. Los resultados obtenidos se pueden resumir en dos conclusiones principales; por un lado, que la mutación que confiere el carácter de autocompatibilidad a esta variedad radica en el polen y no en el estilo y, por otro, que afecta a los dos alelos presentes en el polen. La identificación de mutantes específicos del polen en las Rosáceas había sido descrita por Lewis y Crowe en 1954, después de la irradiación con rayos X. Más recientemente, una mutación similar ha sido descrita para uno de los haplotipos de una población natural de *Petunia axillaris* (Tsukamoto *et al.* 2003). La dificultad de analizar este tipo de mutaciones radica en que aún no se conoce con exactitud el funcionamiento del factor *S* del polen. Así, varias hipótesis han intentado explicar este comportamiento que, puede estar causado por duplicaciones de todo el locus *S* (Brewaker y Natarajan 1960; Golz *et al.*, 1999) o solamente por la duplicación de parte de él (Pandey, 1965, Thompson *et al.*, 1991), por una mutación del propio factor *S* del polen (Lewis, 1961) o por un locus modificador no relacionado con el locus *S* (Thompson *et al.*, 1991). En todo caso, las mutaciones que producen la falta de funcionalidad del factor *S* del polen convierte a estos genotipos en una herramienta natural muy útil para estudiar la interacción entre los factores *S* del polen y del estilo. Los resultados obtenidos en ‘Cristobalina’ parecen indicar que un factor distinto al locus *S* podría estar implicado en la reacción de incompatibilidad, lo que supondría el primer caso conocido en Rosáceas. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para corroborar esta hipótesis.

En resumen, en este trabajo se ha aplicado una metodología molecular tanto para la identificación de genotipos y estudios de similitud como para analizar la incompatibilidad en variedades de cerezo. Ambos métodos se han desarrollado en la colección de cerezos del SIA de Zaragoza y han sido aplicados en la colección de cerezos locales del Valle del Jerte. La identificación de genotipos y los estudios de similitud están basados en el

polimorfismo de los microsatélites y se han utilizado secuencias desarrolladas en melocotonero. El uso de microsatélites en la identificación varietal ha permitido establecer los perfiles de los genotipos de las diferentes variedades y analizar la similitud genética entre estos, representando este trabajo uno de los primeros análisis en profundidad del germoplasma y la diversidad genética de cerezo. Los estudios de incompatibilidad están basados en la variabilidad alélica de las secuencias genómicas de las ribonucleasas *S* utilizándose secuencias conservadas de estas. La aplicación de un método de identificación alélica *S* mediante PCR ha permitido complementar la identificación genotípica, conocer la constitución del locus *S* de variedades de gran interés comercial e identificar nuevos alelos que han sido clonados y secuenciados. Estas secuencias genómicas y su comparación con otras secuencias de ribonucleasas *S* han permitido avanzar en el conocimiento de la variabilidad y la relación interespecífica de las ribonucleasas del género *Prunus*. Asimismo la aplicación de estas dos metodologías en las variedades locales de cerezo del Valle del Jerte ha permitido establecer la diversidad y las relaciones de incompatibilidad entre estas variedades locales, lo que permite diseñar una estrategia de conservación y manejo de un germoplasma de gran interés por su diferenciación, ante la constante introducción de variedades más productivas. Por último, el estudio de la variedad autocompatible ‘Cristobalina’, ha desvelado la existencia de un mutante natural del polen para ambos alelos de incompatibilidad, lo que supone que esta variedad sea una herramienta muy valiosa para el estudio de la autoincompatibilidad gametofítica y la identificación de la estructura y función del factor *S* del polen en Rosáceas.

9. CONCLUSIONES

1. Los marcadores moleculares de ADN tipo microsatélite son una herramienta muy adecuada para la identificación de variedades y patrones de cerezo debido al gran polimorfismo que revelan, su codominancia, su buena reproducibilidad y porque permiten identificar los diferentes genotipos en cualquier época del año y en cualquier estado del desarrollo del árbol.
2. La posibilidad de utilizar secuencias de microsatélites en especies relacionadas permite utilizar un gran número de microsatélites recientemente desarrollados en melocotonero para estudiar otras especies de *Prunus*, como el cerezo, sin necesidad de identificar nuevos microsatélites en cada especie del género. No obstante, la conservación y el polimorfismo de los microsatélites disminuye cuando la distancia genética entre especies aumenta.
3. El uso de los datos moleculares obtenidos a partir de los microsatélites permite estimar la similitud genética entre genotipos. En cerezo, la similitud genética entre genotipos está correlacionada con su origen geográfico y el movimiento del material vegetal de esta especie.
4. Los cebadores desarrollados a partir de las zonas conservadas de las secuencias de ADN de las ribonucleasas estilares *S* permiten identificar y analizar la constitución alélica *S* de genotipos de cerezo, mediante PCR. Este método presenta ventajas frente a otros métodos moleculares y bioquímicos de identificación de la constitución alélica *S* ya que no necesita la utilización de tejido estilar y se pueden identificar un gran número de alelos *S* y todos los alelos *S* de un genotipo en la misma reacción de PCR.
5. El uso de cebadores conservados en la reacción de PCR para la identificación de la constitución alélica *S* en variedades cuyo genotipo no ha sido todavía descrito permite identificar nuevos alelos de incompatibilidad.

6. La secuenciación del ADN genómico, incluyendo la región 5', de las ribonucleasas de cuatro alelos de cerezo confirma que las características estructurales de las ribonucleasas *S* de las Rosáceas están conservadas en la familia.
7. Aunque para algunas secuencias de ribonucleasas *S* de *Prunus* la divergencia alélica es anterior a la especiación dentro del género, en los alelos identificados en este trabajo la variabilidad intraespecífica es menor que la variabilidad interespecífica lo que sugiere que en ellos la divergencia puede haber sido posterior a la especiación.
8. La variabilidad molecular de dos ribonucleasas *S* (S_6 y S_{24}) de gran similitud reside exclusivamente en una zona variable HV1 entre las zonas conservadas C1 y C2. La confirmación de que estas variaciones son suficientes para discriminar entre polen con los dos alelos correspondientes indicaría que la especificidad alélica de las ribonucleasas *S* puede residir en la zona HV1.
9. La zona promotora que se encuentra en la región 5' de las secuencias de ADN de las ribonucleasas de cerezo solamente tiene conservado un dominio caja TATA y no contiene ningún dominio similar a los que se cree juegan un papel en la expresión de las ribonucleasas *S* en las Solanaceas.
10. La caja TATA en cerezo se encuentra más cerca del codón de iniciación de la transcripción que en peral y manzano, lo que parece indicar que la zona no traducida de las ribonucleasas *S* de las Prunoideas es más corta que en las Maloideas.
11. La poca similitud entre las secuencias 5' de cerezo y peral Japonés confirma la diferenciación filogenética que ha sido descrita entre las ribonucleasas de las Prunoideas y Maloideas que forman dos clades bien diferenciados.
12. La variedad de cerezo 'Cristobalina' debe el carácter de autocompatibilidad a una mutación que afecta a la funcionalidad de los dos alelos *S* del polen y no del estilo.

Este genotipo constituye por lo tanto una herramienta muy interesante para el estudio de la reacción de incompatibilidad y de la función del factor *S* del polen en Rosáceas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Gavilán T. 1967. El cerezo en el Valle del Jerte. Ministerio de Agricultura, Monografías No. 16, Madrid.
- Angliolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 98:411-421.
- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbó J, Arús P. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121:87-92.
- Aranzana MJ, Carbó J, Arús P. 2003a. Microsatellite variability in peach [*(Prunus persica)* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1341-1352.
- Aranzana MJ, Pineda A, Cosson P, Dirlwanger E, Ascasibar J, Cipriani G, Ryder CD, Testolin R, Abbott A, King GJ, Iezzoni AF, Arús P. 2003b. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the *Prunus* genome. *Theoretical and Applied Genetics* 106:819-825.
- Badenes ML, Parfitt DE. 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics* 90:1035-1041.
- Balmer M. 2001. European Sweet Cherry Industry: Germany, France, Italy, Turkey. *The Compact Fruit Tree* 34:81-85.
- Bargioni G. 1996. Sweet Cherry Scions: Characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods. En: Webster, A.D. y Looney, N.E. (eds) *Cherries: Crop physiology, production and uses*, pp. 73-112. Cab International, Wallingford, Oxon, UK.
- Bartolozzi F, Warburton ML, Arulsekhar S, Gradziel TM. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123:381-387.
- Bautista R, Crespillo R, Cánovas FM, Claros MG. 2002. Identification of olive tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica* 129:33-41.
- Beaver JA, Iezzoni AF, Ramm CW. 1995. Isozyme diversity in sour, sweet and ground cherry. *Theoretical and Applied Genetics* 90:847-852.
- Bortiri E, Oh SH, Gao FY, Potter D. 2002. The phylogenetic utility of nucleotide sequences of sorbitol 6-phosphate dehydrogenase in *Prunus* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 89:1697-1708.

- Bošković R, Tobutt KR. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90:245-250.
- Bošković R, Tobutt KR. 1998. Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 103:273-86.
- Bošković R, Tobutt KR. 1999. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in apple. *Euphytica* 107:29-43.
- Bošković R, Tobutt KR. 2001. Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups, by analysing stylar ribonucleases. *Theoretical and Applied Genetics* 103:475-485.
- Bošković R, Russell K, Tobutt KR. 1997. Inheritance of stylar ribonucleases in cherry progenies, reassignment of incompatibility alleles to two incompatibility groups. *Euphytica* 95:221-228.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32:314-330.
- Brace J, Ockendon DJ, King GJ. 1993. Identification of S-alleles in *Brassica oleracea*. *Euphytica* 80:229-234.
- Brettin TS, Karle R, Crowe EJ, Iezzoni AF. 2000. Chloroplast inheritance and DNA variation in sweet, sour and ground cherry. *Journal of Heredity* 91:75-79.
- Brewaker JL, Natarajan AT. 1960. Centric fragments and pollen-part mutations of incompatibility alleles in *Petunia*. *Genetics* 45:699-704.
- Brooks RM, Olmo HP. 1952. Register of fruit & nut varieties. 1920-1950. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, U.S.A.
- Brooks RM, Olmo HP. 1997. Register of fruit & nut varieties, 3rd ed. ASHS Press, Alexandria, VA., U.S.A.
- Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology* 27:499-511.
- Brown SK, Iezzoni AF, Fogle HW. 1996. Cherries. En: Janick, J. and Moore, J.N. (eds) *Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits*, vol. 1, pp. 213-255. John Wiley & Sons, New York.
- Buteler MI, LaBonte DR, Jarret RL, Macchiavelli RE. 2002. Microsatellite based paternity analysis in polyploid sweetpotato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127:392-396.

- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR. 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52:922-927.
- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D. 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:205-209.
- Chen X, Cho YG, McCouch SR. 2002. Sequence diversity of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species. *Molecular Genetics and Genomics* 268:331-343.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG, Marrazzo MT, Peterlunger E, Testolin R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus Persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:65-72.
- Crane MB, Brown AG. 1937. Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *Journal of Pomology & Horticultural Science* 15:86-116.
- Crane MB, Lawrence JC. 1929. Genetical and cytological aspects of incompatibility and sterility in cultivated fruits. *Journal of Pomology & Horticultural Science* 7:276-301.
- CTIFL. 1990. Le Cerisier "Le Cerise De Table". Ctifl, Paris.
- De Nettancourt D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York.
- De Nettancourt D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants, 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- De Vicente M, Truco MJ, Egea J, Burgos L, Arús P. 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.) *Plant Breeding* 117:153-158.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana MJ, Poizat C, Zanetto A, Arús P, Laigret F. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus Persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105:127-138.
- Downey S, Iezzoni A. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125:76-80.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Duneman F. 1994. Molecular classification of *Malus* with RAPD markers. In: H. Schmidt & M. Kellerhals (Ed.), *Progress in Temperate Fruit Breeding*, pp. 295-300. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Durman RE, Korban SS. 1994. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 79:109-114.
- Faostat. 2002. Agriculturedata. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>.
- Ficker M, Kirch HH, Eijlander R, Jacobsen E, Thompson RD. 1998. Multiple elements of the *S₂*-RNase promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.) are required for cell type-specific expression in transgenic potato and tobacco. *Molecular and General Genetics* 257:132-142.
- Flores del Manzano F. 1985. Historia de una comarca alto extremeña: el valle del Jerte. Institución Cultural “El Brocense”, Excma. Diputación General de Cáceres, Cáceres.
- Fogle HW. 1975. Cherries. En: Janick J. y Moore J.N. (eds), *Advances in Fruit Breeding*, pp. 348-366. Purdue University Press, W. Lafayette, Indiana.
- Free JB. 1960. The behaviour of honey bees visiting the flowers of fruit trees. *Journal of Animal Ecology* 29:385-395.
- Gerlach HK, Stösser R. 1997. Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angewandte Botanik* 71:412-418.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics* 96:1069-1076.
- Gil-Albert F, Hoyos P. 1986. Algunas notas sobre la biología floral de variedades de cerezo del Valle del Jerte. *Actas SECH* 1986:181-190.
- Godoy JA, Jordano P. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology* 10:2275-2283.
- Golz JF, Clarke AE, Newbigin E. 1999. A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana glauca* S locus. *Genetics* 152:1123-1135.
- Golz JF, Clarke AE, Newbigin E. 2000. Mutational approaches to the study of self-incompatibility: revising pollen-part mutants. *Annals of Botany* 85:95-103.
- Goulao L, Monte-Corvo L, Oliveira CM. 2001. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:72-77.
- Granger AR, Clarke GR, Jackson JF. 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 86:458-464.
- Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* 94:249-254.

- Gupta PK, Varshney RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.
- Hagen LS, Khadari B, Lambert P, Audergon JM. 2002. Genetic diversity in apricot revealed by AFLP markers: species and cultivars comparisons. *Theoretical and Applied Genetics* 105:298-305.
- Hauck N, Iezzoni AF, Yamane H, Tao R. 2001. Revising the *S*-allele nomenclature in sweet cherry (*Prunus avium*) using RFLP probes. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:654-660.
- Hedrick UP, Howe G.H, Taylor OM, Tubergen CB, Wellington R. 1915. The Cherries of New York. Report of the New York Agricultural Experiment Station for the Year 1914 II. J.B. Lyon, Albany, N.Y.
- Herrero J (coord.). 1964. Cartografía de las variedades frutales de hueso y pepita. CSIC Aula Dei, Zaragoza.
- Hokanson SC, Szewc-Mc Fadden AK, Lamboy WF, Mcferson JR. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics* 97:671-683.
- Hormaza JI. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 104:321-328.
- Hormaza JI, Herrero M. 1992. Pollen selection. *Theoretical and Applied Genetics* 83:663-672.
- Hormaza JI, Dollo L, Polito VS. 1994a. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulk segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 89:9-13.
- Hormaza JI, Dollo L, Polito VS. 1994b. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* (pistachio: Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Economic Botany* 48:349-358.
- Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao TH. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S-proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* 6:1021-1028.
- Hugard J. 1978. Origine du pollen et varietes pollinisatrices. *Le Fruit Belge* 381:11-32.
- Hurtado MA, Watman A, Beck E, Abbot GA, Llácer G, Badenes ML. 2002. Genetic diversity in apricot cultivars based on AFLP markers. *Euphytica* 127:297-301.

- Iezzoni A, Schmidt H, Albertini A. 1990. Cherries (*Prunus*). En: Moore, J.N. and Ballington, J.R., Jr. (eds) Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops, vol 1, pp. 111-173. I.S.H.S., Wageningen, The Netherlands.
- Igic B, Kohn JR. 2001. Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98:13167-13171.
- Ioerger TR, Gohlke JR, Xu B, Kao TH. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility proteins in the Solanaceae. Sexual Plant Reproduction 4:81-87.
- Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F, Norioka S. 1998. Primary structural features of rosaceous S-RNases with gametophytic self-incompatibility. Plant Molecular Biology 37:931-941.
- Ishimizu T, Inuoe K, Shimonaka M, Saito T, Terai O, Norioka S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98:961-967.
- Janssens GA, Goderis IJ, Broekaert F, Broothaerts W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based in allele-specific PCR. Theoretical and Applied Genetics 91:691-698.
- Jeffries CJ, Blecher AR. 1974. A fluorescent brightener used for pollen tube identification in vivo. Stain Technology 49:199-202.
- Johansen DA. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hill: New York, New York.
- Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Windfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding 3:381-390.
- Kaufmann H, Salamini F, Thompson RD. 1991. Sequence variability and gene structure at the self-incompatibility locus of *Solanum tuberosum*. Molecular and General Genetics 226:457-466.
- Kester DE, Micke WC, Viveros M. 1994. A mutation in 'Nonpareil' almond conferring unilateral incompatibility. Journal of the American Society for Horticultural Science 119:1289-1292.
- Kheyr-Pour A, Bintrim SB, Ioerger TR, Remy R, Hammond SA, Kao TH. 1990. Sequence diversity of pistil S-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. Sexual Plant Reproduction 3:88-97.
- Krawetz SA. 1989. Sequence errors described in GenBank: a means to determine the accuracy of DNA sequence interpretation. Nucleic Acids Research 17:3951-3957.
- Kristensen T, Lopez R, Prydz H. 1992. An estimate of the sequencing error frequency in the DNA sequence databases. DNA Sequence 2: 343-346.

- Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G, Xue Y. 2002. An F-box gene linked to self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Molecular Biology* 50:29-42.
- Lapins KO. 1975. 'Compact Stella' cherry. *Fruit Varieties Journal* 29:20.
- Lawrence MJ. 2000. Population genetics of the homomorphic self-incompatibility polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* 85 (Supplement A):221-226.
- Lee HS, Huang S, Kao TH. 1994. *S*-proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367:560-563.
- Lewis D. 1943. Physiology of incompatibility in plants. III Autopolyploids. *Journal of Genetics* 45. 171.
- Lewis D. 1947. Competition and dominance of incompatibility alleles in diploid pollen. *Heredity* 1:85-108.
- Lewis D. 1948. Structure of the incompatibility gene. I Spontaneous mutation rate. *Heredity* 2:219-236.
- Lewis D. 1949. Structure of the incompatibility gene. II Induced mutation rate. *Heredity* 3:339-355.
- Lewis D. 1961. Chromosome fragments and mutation of the incompatibility gene. *Nature* 190:990-991.
- Lewis D, Crowe LK. 1954. Structure of the incompatibility gene. IV Types of mutation in *Prunus avium* L. *Heredity* 8:357-363.
- Linskens HF, Esser K. 1957. Über die spezifische Anfärbung der Pollenschläuche im Griffel und die Zahl der Kallosepfropfen nach Selbstbefruchtung und Fremdbefruchtung. *Naturwissenschaften* 44:1-2.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.
- Lu ZX, Reighard GL, Baird WV, Abbott AG, Rajapakse S. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *HortScience* 31:127-129.
- Luu DT, Qin X, Morse D, Cappadocia M. 2000. *S*-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407:649-651.
- Luu DT, Qin X, Laublin G, Yang Q, Morse D, Cappadocia M. 2001. Rejection of *S*-heteroallelic pollen by a dual-specific *S*-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* 159:329-335.
- Ma RC, Oliveira MM. 2001. Molecular cloning of the self-incompatibility genes *S1* and *S3* from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sexual Plant Reproduction* 14:163-167.

- Ma RC, Oliveira MM. 2002. Evolutionary analysis of *S*-RNase genes from Rosaceae species. *Molecular Genetics and Genomics* 267:71-78.
- Maguire TL, Edwards KJ, Saenger P, Henry R. 2000. Characterisation and analysis of microsatellite loci in a mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 101:279-285.
- MAPA, 2000. Anuario de Estadística Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Matthews P, Dow KP. 1969. Incompatibility groups: sweet cherry (*Prunus avium*) En: Knight RL (eds) Abstract Bibliography of Fruit Breeding and Genetics to 1965: *Prunus*, pp 540-544. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal.
- Matton DP, Maes O, Laublin G, Xike Q, Bertrand C, Morse D, Capadoccia M. 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *The Plant Cell* 9:1757-1766.
- McClure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342:955-957.
- McCubbin AG, Kao TH. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell Development and Biology* 16:333-364.
- Monte-Corvo L, Cabrita L, Oliveira C, Leitao J. 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47:257-265.
- Moreno J, Trujillo I. 2001. Relaciones entre las variedades de cerezo cultivadas en el valle del Jerte con marcadores RAPDs. *Actas de Horticultura* 35:405-410.
- Moreno J, Manzano MA, Toribio F, Trujillo I, Rallo L. 2001. Establecimiento del banco de germoplasma de variedades de cerezo del valle del Jerte. *Actas de Horticultura* 36:824-830.
- Morgante M, Pfeiffer A, Jurman I, Paglia G, Olivieri AM. 2001. PCR analysis of SSR polymorphisms in plant using agarose gels. En: Karp, A., Isaac, P.G., Ingram, D.S. (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, pp. 206-207. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Murfett J, Atherton T, Mou B, Gasser C, McClure BA. 1994. *S*-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes *S*-allele-specific pollen rejection. *Nature* 367:563-566.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76:5269-5273.
- Norioka N, Katayama H, Matsuki T, Ishimizu T, Takasaki T, Nakanishi T, Norioka S. 2001. Sequence comparison of the 5' flanking regions of Japanese pear (*Pyrus*

- pyrifolia*) S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility. Sexual Plant Reproduction 13:289-291.
- Ortiz A, Renaud R, Calzada I, Ritter E. 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. Journal of Horticultural Science 72:1-9.
- Pandey KK. Centric chromosome fragments and pollen-part mutations of the incompatibility gene in *Nicotiana glauca*. Nature 206: 792-795.
- Paran I, Michelmore RW. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theoretical and Applied Genetics 85:985-993.
- Parent JG, Pagé D. 1998. Identification of raspberry cultivars by sequence characterised amplified region DNA analysis. HortScience 33:140-142.
- Perera L, Russell JR, Provan J, Powell W. 2000. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). Genome 43:15-21.
- Rajapakse S, Belthoff LE, He G, Estager AE, Scorza R, Verde I, Ballard RE, Baird WV, Callahan A, Monet R, Abbott AG. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 90:503-510.
- Raspé O, Kohn JR. 2002. S-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae). Heredity 88:458-465.
- Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C, Tohme J. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. American Journal of Botany 87:1647-1655.
- Royo J, Kinz C, Kowyama Y, Anderson MA, Clarke AE, Newbigin E. 1994. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-incompatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Proceedings of the National Academy of Science USA 91:6511-6514.
- Sassa H, Hirano H, Ikeshashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Plant Cell Physiology 33:811-814.
- Sassa H, Hirano H, Ikeshashi H. 1993. Identification and characterization of stelar glycoproteins associated with self-incompatibility of Japanese pear, *Pyrus serotina* Rehd. Molecular and General Genetics 241:17-25.
- Sassa H, Mase N, Hirano H, Ikeshashi H. 1994. Identification of self-incompatibility-related glycoproteins in styles of apple (*Malus x domestica*). Theoretical and Applied Genetics 89:201-205.

- Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, Hirano H, Koba T, Ikeshashi H. 1996. Self-incompatibility (*S*) alleles of Rosaceae encode members of a distinct class of the T_2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics* 250:547-557.
- Sassa H, Hirano H, Nishio T, Koba T. 1997. Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of *S*-Rnase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). *The Plant Journal* 12:223-227.
- Sensi E, Vignani R, Scali M, Masi E, Cresti M. 2003. DNA fingerprinting and genetic relatedness among cultivated varieties of *Olea europaea* L. estimated by AFLP analysis. *Scientia Horticulturae* 97:379-388.
- Serrano B, Gómez-Aparisi J, Hormaza JI. 2002. Molecular fingerprinting of *Prunus* rootstocks using SSRs. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 77:368-372.
- Simpson GG, Filipowicz W. 1996. Splicing precursors to mRNA in higher plants: mechanisms, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* 32:1-41.
- Sims T, Ordanic M. 2001. Identification of a S-ribonuclease binding protein in *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology* 47:771-783.
- Société Pomologique De France. 1927. Le Verger Français. Catalogue Descriptif des Fruit Adoptés par le Congrès Pomologique. Réveil du Beaujolais, Villefranche.
- Société Pomologique De France. 1947. Le Verger Français. Catalogue Descriptif des Fruit Adoptés par le Congrès Pomologique. B. Aranud, Lyon, Paris.
- Sonneveld T, Robbins TP, Bošković R, Tobutt KR. 2001. Cloning six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* 102:1046-1055.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck LE, King GJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott A.G. 2000. Characterisation of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics* 101:421-428.
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glossl J. 1997. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology* 6:1189-1194.
- Stockinger EJ, Mulinix CA, Long CM, Brettin TS, Iezzoni AF. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *Journal of Heredity* 87:214-218.
- Struss D, Boritzki M, Karle R, Iezzoni AF. 2002. Microsatellite markers differentiate eight Giessen cherry rootstocks. *HortScience* 37:191-193.
- Takeda T, Shimada T, Nomura K, Ozaki T, Haji T, Yamaguchi M, Yoshida M. 1998. Classification of apricot varieties by RAPD analysis. *Journal of the Japanese*

- Society for Horticultural Science 67:21-27.
- Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Tamura M, Ushijama K, Sassa H, Hirano H, Tao R, Gradziel TM, Dandekar AM. 2000. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 101:344-349.
- Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.
- Tao R, Yamane H, Sassa H, Mori H, Gradziel TM, Dandekar AM, Sugiura A. 1997. Identification of stilar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiology* 38:304-311.
- Tao R, Yamane H, Sugiura A, Murayama H, Sassa H, Mori H. 1999a. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:224-233.
- Tao R, Yamane H, Akira H. 1999b. Cloning and nucleotide sequences of cDNA encoding S1- and S4-RNases (Accessions Nos. AB028153 and AB028154) from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Physiology* 120:1207.
- Tao R, Yamane H, Akira H. 1999c. Cloning of genomic DNA sequences encoding S1-, S3-, S4-, and S6-RNases (Accessions Nos. AB031815, AB031816, AB031817, AB031818) from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Physiology* 121:1057.
- Tao R, Habu T, Yamane H, Sugiura A. 2002. Characterization and cDNA cloning for Sf-RNase, a molecular marker for self-compatibility, in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 71:595-600.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17:6463-6471.
- Tehrani G, Brown S. 1992. Pollen-incompatibility and self-fertility in sweet cherry. *Plant Breeding Reviews* 9:367-388.
- Testolin R, Marrazo MT, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, Pancaldi M, Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43:512-520.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The clustal X windows interface: flexible strategies for sequence multiple alignment aided with quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Thompson RD, Uhrig H, Hermsen JGT, Salamini F, Kaufmann H. 1991. Investigation of a self-compatible mutation in *Solanum tuberosum* clones inhibiting S-allele activity

- in pollen differentially. *Molecular and General Genetics* 226:283-288.
- Tobutt KR, Sonneveld T, Bošković R. 2001. Cherry (in)compatibility genotypes-harmonization of recent results from UK, Canada, Japan and USA. *Eucarpia Fruit Breeding Section Newsletter* 5:41-46.
- Tsai DS, Lee HS, Post LC, Kreiling KM, Kao TH. 1992. Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sexual Plant Reproduction* 5:256-263.
- Tsukamoto T, Ando T, Takahashi K, Omori T, Watanabe H, Kokubun H, Marchesi E, Kao TH. 2003. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by loss of pollen function. *Plant Physiology* 131:1903-1912.
- Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, Hirano H. 1998a. Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular and General Genetics* 260:261-268.
- Ushijima K, Sassa H, Hirano H. 1998b. Characterization of the flanking regions of the S-RNase genes of Japanese pear (*Pyrus serotina*) and apple (*Malus x domestica*). *Gene* 211:159-167.
- Ushijima K, Sassa H, Tamura M, Kusaba M, Tao R, Gradziel TM, Dandekar AM, Hirano H. 2001. Characterization of the S-locus region of almond (*Prunus dulcis*): Analysis of a somaclonal mutant and a cosmid contig for S haplotype. *Genetics* 158:379-386.
- Ushijima K, Sassa H, Dandekar HM, Gradziel TM, Tao R, Hirano H. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell* 15:771-781.
- Van Nerum I, Geerts M, Van Haute A, Keulemans J, Broothaerts W. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative 'new' S-alleles. *Theoretical and Applied Genetics* 103:584-591.
- Verica JA, McCubbin AG, Kao TH. 1998. Are the hypervariable regions of S RNases sufficient for allele-specific recognition pollen?. *The Plant Cell* 10:314-316.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Fritjters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Walsh PS, Erlich HA, Higuchi R. 1992. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods & Applications* 1:241-250.
- Warburton ML, Bliss FA. 1996. Genetic Diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared

- to inbreeding coefficients. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 12:1012-1019.
- Watkins R. 1976. Cherry, plum, peach, apricot and almond. En: Simmonds, N.W. (eds) *Evolution of Crop Plants*, pp. 242-247. Longman, London and New York.
- Weber JL, May PE. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44:388-396.
- Webster AD, Looney NE. 1996. World distribution of Sweet and Sour Cherry Production: National Statistics. En: Webster, A.D. and Looney, N.E. (eds) *Cherries: Crop physiology, production and uses*, pp. 25-69. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Westwood MN. 1993. *Temperate-zone pomology: physiology and culture*, 3rd ed. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- White G, Powell W. 1997. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology* 6:1195-1197.
- Wiersma PA, Wu Z, Zhou L, Hampson C, Kappel F. 2001. Identification of self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 102:700-708.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2002a. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125:59-67.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2002b. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89:56-63.
- Wünsch A, Hormaza JI. 2003. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of Spanish local sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, (en prensa).
- Xu H, Bakalinsky AT. 1996. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *HortScience* 31:267-268.
- Yaegaki H, Shimada T, Moriguchi T, Hayama H, Haji T, Yamaguchi M. 2001. Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) *Sexual Plant Reproduction* 13:251-257.

- Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, Ban Y, Hayashi T, Matsuta N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics* 102:865-870.
- Yamane H, Tao R, Murayama H. 2000. Determining the *S*-genotypes of several sweet cherry cultivars based on PCR-RFLP analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75:562-567.
- Yamane H, Tao R, Sugiura A, Hauck NR, Iezzoni AF. 2001. Identification and characterization of *S*-RNases in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus*). *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126:661-667.
- Yap V, Nelson RJ. 1996. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.
- Zohary D, Hopf M. 1988. Domestication of plants in the Old World. Oxford University Press, Oxford.
- Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L, Sansavini S. 2002. *S*-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.) *Sexual Plant Reproduction* 15:153-158.

ANEXO 1

PURIFICACIÓN DE ADN DE GELES DE AGAROSA UTILIZANDO COLUMNAS ‘ULTRAFREE-DA’ (MILLIPORE)

Identificar el fragmento de interés mediante electroforesis en un gel de agarosa en 1X TAE (40 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM Na₂ EDTA). Cortar el fragmento de interés del gel y colocarlo en la parte superior de la columna o ‘Gel Nebulizer’. Centrifugar la columna a 5.000 g durante 10 minutos y desechar el ‘Gel Nebulizer’ y el filtro ‘Ultrafree-MC’. Precipitar el ADN en 1/10 v de acetato de sodio 3M y 2,5 v de etanol frío, lavar con etanol al 70%, secar a temperatura ambiente y resuspender en MTE. Cuantificar el ADN en un gel de agarosa al 1% en 1X TBE o TAE.

ANEXO 2

CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR UTILIZANDO EL PLÁSMIDO ‘pGEM-T EASY’ (PROMEGA)

1. Purificación de fragmentos de PCR

Seleccionar, purificar y cuantificar el fragmento de ADN de interés siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 1.

2. Ligación del fragmento de ADN al plásmido ‘pGEM-T Easy’

Estimar la cantidad necesaria de fragmento de ADN (inserto), en función de la concentración y el tamaño de este, para llevar a cabo la ligación al plásmido (vector) en una proporción 3/1 (inserto/vector) utilizando la siguiente fórmula:

$$[(\text{ng de vector} \times \text{kb del inserto}) / \text{kb del vector}] \times 3/1 = X \text{ ng de inserto}$$

Ligar el inserto y el vector en 10 μ l de volumen total combinando los siguientes componentes:

- 1 μ l Tampón de ligación (10X)
- 1 μ l Vector 'pGEM-T Easy'
- 1 μ l T4 ADN Ligasa
- X μ l Inserto, fragmento de ADN purificado
- X μ l Agua estéril hasta completar 10 μ l

Incubar a 4°C durante una noche. Purificar mediante una extracción con butanol, mezclar 10 μ l de ligación con 40 μ l de agua estéril y 500 μ l de 1-Butanol. Centrifugar durante 15 min. a 14.000 rpm, a una temperatura de 4°C y decantar el sobrenadante, secar el precipitado y resuspender en 4 μ l de agua.

3. Transformación por electroporación

Mezclar 2 μ l de ligación en 40 μ l de células de *E.coli* competentes, incubar 30 seg. en hielo y aplicar descarga de electroporación, añadir 960 μ l de medio 2YT¹ líquido e incubar en agitación a 37°C durante 1 hr.

4. Siembra en placas

Después de la incubación, sembrar las células transformadas de cada muestra en tres placas de Petri con 20 ml de medio LB² sólido, 20 μ l ampicilina (100 mg/ml), 4 μ l de IPTG (0,84 M) y 40 μ l de X-GAL (20 mg/ml) cada una. Incubar las placas a 37°C durante una noche y seleccionar las colonias transformadas. Repicar las colonias transformadas en placas Petri con el mismo medio, cultivarlas a 37°C durante una noche y conservarlas a 4°C.

¹: Medio 2YT: En 900 ml de agua destilada añadir 16 gr de bacto-triptona, 10 gr de extracto de levadura y 5 gr de NaCl; ajustar el volumen a 1 l con agua destilada y el pH a 7,0.

²: Medio LB (Luria-Bertani): En 950 ml de agua destilada añadir 10 gr de bacto-triptona, 5 gr de extracto de levadura y 10 gr de NaCl; ajustar volumen a 1 l con agua destilada y el pH a 7,0 con NaOH 5N.

ANEXO 3

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS UTILIZANDO COLUMNAS 'PLASMID MINI KIT' (QIAGEN)

1. Cultivo de colonias transformadas

Cultivar las colonias transformadas en agitación a 37°C durante 12-16 hr. en tubos con 3 ml de medio LB líquido y 6 µl de ampicilina (50 mg/ml).

2. Purificación de plásmidos

Transferir el cultivo a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y centrifugar el cultivo 2 veces, durante 2 min., a 4°C y 5.000 rpm. Decantar todo el sobrenadante y resuspender las células en 0,3 ml de tampón P1 (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A). Añadir 0,3 ml de tampón P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), mezclar suavemente de 4 a 6 veces por inversión e incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Añadir 0,3 ml de tampón P3 (3 M acetato potásico, pH 8,5) frío, mezclar suavemente por inversión de 4 a 6 veces e incubar 5 minutos en hielo. Mezclar otra vez, centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min y recuperar el sobrenadante con rapidez. Mientras tanto, equilibrar la columna añadiendo 1 ml de tampón QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100) y esperar hasta que se vacíe por gravedad; entonces añadir el sobrenadante a la columna y dejarlo filtrar. Lavar la columna 4 veces con 1 ml de tampón QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% isopropanol) y llevar a cabo la extracción de los plásmidos ('elution') añadiendo 0,8 ml de tampón QF (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% isopropanol), dejándolo filtrar por gravedad y recogiendo el filtrado. Finalmente, precipitar el ADN con 0,7 v de isopropanol a temperatura ambiente, centrifugar a 10.000 rpm durante 30 min. y decantar el sobrenadante. Lavar el precipitado 2 veces en 1 ml de etanol al 70% y recuperar el precipitado después de centrifugar durante 10 min a 10.000 rpm. Secar el precipitado durante 5 min. a temperatura ambiente y resuspender en 20 µl de TE (100 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA). Cuantificar la concentración del plásmido en un gel de agarosa al 1% en 1X TAE y tinción con bromuro de etidio.

ANEXO 4

AISLADO DE SECUENCIAS GENÓMICAS ADYACENTES A UNA SECUENCIA DE ADN CONOCIDA UTILIZANDO EL ‘UNIVERSAL GENOME WALKER KIT’ (BD BIOSCIENCES CLONOTECH)

1. Digestión de ADN genómico

Digerir cada muestra de ADN genómico con 4 enzimas de restricción (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*), utilizar la muestra de ADN humano suministrado como control positivo con la enzima *PvuII*. Para cada reacción de digestión combinar los siguientes componentes:

- 25 µl ADN genómico (100 ng/µl)
- 8 µl Enzima de restricción (10 U/µl)
- 10 µl Tampón de la enzima de restricción (10X)
- 57 µl Agua desionizada

Mezclar los componentes, incubar 2 hr. a 37 °C, mezclar durante 10 seg y volver a incubar a 37 °C de 16 a 18 hr. Comprobar que se ha completado la digestión mediante la electroforesis de 5 µl de reacción de digestión en un gel de agarosa al 0,5% y tinción con bromuro de etidio.

2. Purificación del ADN digerido

Añadir a cada reacción de digestión 95 µl (1 v) de fenol, mezclar, centrifugar brevemente para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Recuperar la fase superior (acuosa) y añadir 95 µl (1 v) de cloroformo, mezclar, centrifugar brevemente para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Recuperar la fase superior (acuosa) y precipitar el ADN en 2 v (190 µl) de etanol al 95 % frío y 1/10 v (9,5 µl) de 3 M NaOAc (pH 4,5). Mezclar, centrifugar a 15.000 rpm durante 10 min., decantar el sobrenadante y lavar el precipitado en 100 µl de etanol al 80 %. Centrifugar a 15.000 rpm durante 5 min., decantar el sobrenadante y secar el precipitado a temperatura ambiente. Disolver

el ADN en 20 μ l de TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA; pH 7,5). Finalmente, cuantificar 1 μ l del ADN digerido y purificado en un gel de agarosa al 0,5 % y tinción con bromuro de etidio.

3. Ligación de adaptadores

Ligar adaptadores a cada ADN digerido y al control positivo (5 reacciones de ligación por muestra de ADN). Para cada reacción de ligación combinar los siguientes componentes:

- 4,0 μ l ADN digerido y purificado
- 1,9 μ l Adaptadores (25 μ M)
- 1,6 μ l Tampón de ligación (10X)
- 0,5 μ l ADN Ligasa T4 (6 U/ μ l)

Incubar durante una noche a 16 °C. Para detener la ligación, incubar 5 min. a 70 °C y añadir 72 μ l de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7,4) a cada reacción. Mezclar durante 15 seg.

4. Reacciones de PCR para la amplificación de fragmentos adyacentes

4.1. Diseño de cebadores

Diseñar 2 cebadores (GSP1 y GSP2) para cada secuencia de ADN conocido y para cada extremo de la secuencia cuyos fragmentos adyacentes se quieren identificar. Se utiliza GSP1 en la primera reacción de PCR y GSP2 en una segunda reacción de PCR ('nested PCR'). Los cebadores deben estar orientados hacia fuera del fragmento de ADN, deben tener de 26 a 30 nucleótidos con un contenido de GCs del 40 al 60%, no deben solapar y GSP2 tiene que estar localizado más allá del extremo 3' de GSP1, es decir, más arriba que GSP1 para aislar el fragmento adyacente al extremo 5' y más abajo que GSP1 para aislar el fragmento adyacente al extremo 3'. Además, deben estar localizados lo más cerca posible a los extremos del fragmento de ADN conocido.

4.2 Primera PCR

Para cada muestra de ADN conocido y para cada extremo cuyo ADN se quiere identificar, llevar a cabo 8 reacciones de PCR (1 reacción por cada enzima de restricción utilizada, 2 controles positivos y 2 controles negativos), combinando los siguientes componentes:

37,8 µl	Agua desionizada
5,0 µl	Tampón de PCR <i>Tth</i> (10X)
1,0 µl	dNTPs (10 mM cada uno)
2,2 µl	Mg(OAc) ₂ (25 mM)
1,0 µl	Cebador AP1 (10 µM) (complementario a adaptador)
1,0 µl	‘Advantage Genomic Polymerase Mix’ (50X)
1,0 µl	Cebador GSP1 (10 µM) en las 4 reacciones con el ADN digerido y en uno de los controles negativos, y el cebador PCP1 (10 µM) en los dos controles positivos y en el otro control negativo
1,0 µl	ADN digerido y ligado con cada enzima de restricción, el ADN humano digerido y ligado en un control positivo y agua en el otro control positivo y los dos controles negativos.

Poner una gota de aceite mineral sobre las reacciones y comenzar una reacción de PCR en un termociclador ‘GeneAmp PCR System 9600’ (PE biosystems) siguiendo el protocolo siguiente:

7 ciclos:	94°C durante 2 seg.
	72°C durante 3 min.
32 ciclos:	94°C durante 2 seg.
	67°C durante 3 min.
1 ciclo:	67°C durante 4 min.

Analizar los fragmentos de PCR mediante la electroforesis de 8 µl de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

4.3 Segunda PCR ('Nested PCR')

Si se ha obtenido la amplificación de fragmentos en las muestras de ADN ligado en la reacción de PCR anterior, diluir 1 µl de la primera reacción de PCR en 49 µl de agua desionizada y llevar a cabo la segunda reacción de PCR constituida por los mismos componentes que la primera reacción de PCR a excepción de que se utiliza el cebador AP2 en lugar de AP1, el cebador GSP2 en lugar de GSP1, el cebador PCP2 en lugar de PCP1 en los controles y 1 µl de la primera reacción de PCR diluida en lugar de el ADN ligado, utilizando el siguiente programa de PCR:

5 ciclos: 94°C durante 2 seg.
 72°C durante 3 min.
20 ciclos: 94°C durante 2 seg.
 67°C durante 3 min.
1 ciclo: 67°C durante 4 min.

Analizar los fragmentos de PCR mediante electroforesis de 5 µl de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 1,5%. Si se han obtenido los fragmentos de interés se procede a hacer una electroforesis con todo el contenido de la reacción de PCR para aislar y purificar el fragmento del gel de agarosa utilizando el protocolo descrito en el Anexo 1.

ANEXO 5

Accesión del GenBank AY259115, secuencia genómica de la ribonucleasa *S*₁₂ de cerezo.

LOCUS bankit532527 3160 bp DNA linear PLN 20-MAR-2003
DEFINITION Prunus avium gene for S12-RNase, genomic sequence.
ACCESSION ;
KEYWORDS .
SOURCE sweet cherry.
ORGANISM Prunus avium
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 3160)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Cloning and characterization of genomic DNA sequences of
self-incompatibility alleles from sweet cherry
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 3160)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAR-2003) Unidad Fruticultura, SIA-DGA, Ctra.
Montañana 930, Zaragoza 50016, Spain
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..3160
/organism="Prunus avium"
/cultivar="Ferrovia"
/db_xref="taxon:42229"
gene 722..3026
/gene="S-RNase"
/allele="S12"
CDS join(722..803,1060..1247,2610..3026)
/gene="S-RNase"
/codon_start=1
/product="S12-RNase"
/translation="MGMLKSSLAFLVLFAFFLFCFIMSAGDGSYDYFQFVQWPPTNC
RVRIKRPCSNRPLQYSTIHGLWPSNYSNPTKPSNCNGLKFEAKKLSPEMQTKLKSSW
PDVESGNDTKFWEGEWNKHGKCSEQTLNQMQYFERSFAMWKSYNITEILKNASIVPHP
TQTWKYSDIASPIKAVTKTTPLLRCKRDHPNKPPELLHEVVLCLDYNGLIQIDCNRTAG
CRNQQAISFQ"
BASE COUNT 988 a 635 c 510 g 1026 t 1 others
ORIGIN
1 tacagcgatt ttagcaata agtgattttc tcgtagttta ccaancgggt tgggcttccc
61 caaaattttt agaaaatcgc ttatcacccc caaataagca ataccaaacg agcacttagc
121 atggtttcat atgattatga tcatagaagg ttctaggctt cttagctatta aatcatcaaa
181 ttgtactaga ttactagga aacgtcaaca atagaaacct tcaaattggc gctttctttt
241 tattttattt tattttttat tgttgactta gtttacgaaa gcgttcagct aaagggtgcta
301 gtggcttctt tgggtttcct tttttgttta tttgttaagt ggcttccttg tgttatatat
361 atatagttat tatcttatct gaatgtccgc atgttattat catgcggatg ccatgtgaaa
421 catgcaagaa agcagatagg ggtagtacaa aatacatggt gtccacatga taataacgct
481 tggatgtccg cataagaaca atggttttat gatgattttt tttgtttata cttgagaaac
541 ttgtgggaaa aggtagccaa agttggatgt acctttctta caatttataa gtgagagatt
601 aattgcgaca ggaccgtaca ccccatgcaa cctcctatat aagcagccaa caaaatgaat
661 cttagctgag aaagactctc ttattctgct gtatttcttg ttgctttagt attctctaag
721 tatggggatg ctgaaatcgt cactcgcttt ccttgctctt gcttttgctt tcttcttggt
781 tttcatcatg agcgtggtg atgggtgagtt gcgttacaat cttttgctct atatatectc
841 tatgcatata atcagcattg cgtttttcta cttgtatttt ttgttcagag aaactattgt
901 gtatgttcga tgatatatca catgacatgc ggtgtattga cttcaccac atatttttga
961 ttttaataatc taacgcacaa ctttcttttg ataagtaagt attgggaatt gcttttctgc
1021 atgtcctctt tttattttca tcctcttttt acttggcagg atcttacgac tatttttcaat
1081 ttgtgcaaca atggccaccg accaactgca gagttcgcat caagcgacct tgctccaacc

```

1141 cccggccatt acaatattcc accatccatg gcctatggcc aagtaattat tcaaacccaa
1201 cgaagcccag taattgcaat gggttgaaat ttgaggcaaa gaaattggta agtactaatt
1261 acttcgtttt aggttatttt ttattatagg gatthttagg taatttggaa caatgacctc
1321 tgaatttatt gcgagttaca ttttattctc tcaactcaat ttttaagttc tctcattaaa
1381 aatgaaaccc tcaatttata gtccatgtag tcctttaaaa taaaaactaa agaaccaaaa
1441 aacaaaacat taaataaagt aaaaagcaat gggaaaacat tattctctca accccaactg
1501 gcggacctag tagcttttct tttgggggga gtagtaccat aatttcaagg ttatatatat
1561 ttatatttaa actgatattg tagcagctgc ttaagagtaa tggttttttc atggagcttg
1621 gggccatggc cattgcaggt atgtatgtgg ctccgcccc taagccacta caaacattca
1681 cacctccact gcaaactgac acctcctccg tctagctttt acctcgagca cccccactca
1741 ccacaacact ttttctctac acctgccaaa gtgtaaccaa gtcaagctcg tcgaagaagt
1801 cgtcaccagt acctctgtca cctcccaagc ccacaaacac cgcaatctct aatctcccac
1861 cctccccagc catgaaacca cctcaccct ccctcaccgc tcatgaaacg caccaccaaa
1921 cccacaccct ctctcaaacg tctctgattc ccaatcacc ctcactcttg ttttcagttt
1981 tttgtttggt tgttatgttt tattttttaa ttttttgaag gactacatca actaaaacga
2041 gttgacgaac taaaatttaa ctcgtaata agttcaggaa ccatctatcc aaacaagcca
2101 ttaattttta aagatgtgag gtgaaattct taatttaacc ctaagattaa cagaaaaatt
2161 agaagtgcag aaaactaaac gtacaacaca tgatcgagtt aaaggcattt aggaactaaa
2221 aaaaaattat gggactaaaa tataattcgc ggacaagtcc atagatcatt tactccaaat
2281 tgaccttcat tttattttca tagtctctag cattttatta acataatata cttttttcaa
2341 taaaccttgg gtattatata aaattctgat gctggtccta tagttaggca tatattgttt
2401 tgaatttata caaaagtata attaagggac ctatattgta tacaataaaa tgaccacaat
2461 taaaattaaa ttttaactc agtttaattg aagaaaacaa tcttgtccaa gaatgaaaat
2521 ccagctaacc cttacatttt gacccaaaaa aaaaaatact tacgttttac tttttctcaa
2581 aatatgtata tattgcttgg gtgtctcagt cccctgaaat gcaaaccaaa ctgaagaaat
2641 cttggccgga cgtggaaagt ggcaatgata caaaatthtt ggaagggcga tggacaacac
2701 atggtaaatg ttccgaacag aactaaacc aaatgcaata cttcgagcga tccttcgcaa
2761 tgtggaagtc atacaatatt acagagatcc ttaaaaacgc ttcaatcgta ccacatccga
2821 cacaacatg gaagtactcg gacatagcat caccattaa agcagtaact aaaacaacac
2881 cgctccttct ttgcaaactg gatcaccta ataagcctga gttgctacat gaagtggtag
2941 tttgtttgga ttataatggg ctgatacaga ttgactgtaa tcgaacagca ggatgccgaa
3001 atcaacaagc catctcgttt caatgaaact attttcgaag tcataataaa gtagtatggg
3061 tttagtacca gtgtaataac acaaaatgaa tggcacctaa agtttgcgaa tttttttttt
3121 cggggtcagt agtaaatact tttgtttttc taacataaaa

```

//

ANEXO 6

Accesión del GenBank AY259112, secuencia genómica de la ribonucleasa *S₂₄* de cerezo.

LOCUS bankit523476 1464 bp DNA linear PLN 20-MAR-2003
DEFINITION Prunus avium gene for S24-RNase, genomic sequence.
ACCESSION ;
KEYWORDS .
SOURCE sweet cherry.
ORGANISM Prunus avium
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1464)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Cloning and characterization of genomic DNA sequences of
self-incompatibility alleles from sweet cherry
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1464)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAR-2003) Unidad Fruticultura, SIA-DGA, Ctra.
Montañana 930, Zaragoza 50016, Spain
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1464
/organism="Prunus avium"
/cultivar="Pico Colorado"
/db_xref="taxon:42229"
gene 282..1464
/gene="S-RNase"
/allele="S24"
CDS join(282..357,697..878,1054..1464)
/gene="S-RNase"
/codon_start=1
/product="S24-RNase"
/translation="MSMLKSSLAFLVLAFFVFLCFIMSTGSYVYFQFVQQWPPATCIR
SNKPCSKHRPLQIFTIHGLWPSNYSNPRMPSNCTGPFKRLISPOLRSKQLQTSWPDVE
SGNDTKFWESEWNKHGTCSETLNQMIFYFERSYAMXMSYNITEILKNASIVPHPTQTW
KYSDIVAPIKAATKRTPLLRCKQDKNTVLLHEVXFCEYNALKQIDCNRTSGCQNQPA
ISFQ"
BASE COUNT 427 a 288 c 247 g 500 t 2 others
ORIGIN
1 tgttctattc ttttttcttt aatcttttga ctatgttaa agaaaacaag ggtttctatg
61 atgatttctt tttgtttata catgtatatt tggttcttga gaaacttggt ggaaaaggta
121 accaaagtgt gatttacctt tgctcacaat ttctaagtga gagattaatg cgatagtaca
181 cccattcaa cctcctatat aacagcaaa caaagtgatt cttagctcag aaagcctctc
241 ccattctggt gtatttctta ttgcttgagt attctctaag tatgtcgatg ttgaaatcgt
301 cactcgcgtt ccttgttcct gcttttgttt tcttcttggt tttcattatg agcactgggtg
361 ggttgcatta cctctttttt ctggttata cctatacgtt aattagcatg aattgcattt
421 ttctacttct aatgtttaga gaaatatcat gtgtattaga tgatacaggt ggcatgctgct
481 gtattgaatc agcccatatt tttcatttga tctatcgc atactttggt ggatgagtaa
541 ctattttggg aattattttt ctgcatgggt tctttcgttt actctgaaag ttgtaccgat
601 aagtgcagta ttcatcattg gaagctaaaa atatgttatt tatacatcac atacttattt
661 aagataccat taaccttctc acaataattc tggcaggatc ttatgtctat tttcaatttg
721 tgcaacaatg gccaccggcc acctgcatac gttagcaaca accttgctcc aaacaccggc
781 cattacaaat tttcaccatc catggcctat ggccaagtaa ttattcaaac ccgaggatgc
841 ccagttaatt cactggaccg caatttaagc gaatattggt atgtattggt tcattttggt
901 ttccacctac ctttagctt ttagttttta ccaatttaga ttgttagtat gaacatatat
961 aatatacttt ttttttataa cattcgtcat ctggttaggc acacacatta ttttgaatat
1021 atatctaagt acaaaattgc ttggatgtct cagtccctc aactgcatc caaactgcag

```
1081 acatcttggc cggacgtgga aagtggcaat gatacaaagt tttgggaaag cgaatggaac
1141 aacatggta catgttccaa agagacactt aaccaaatgc agtacttcga gcgatcctac
1201 gcaatgngga tgtcgtacaa tattacagag atccttaaaa acgcttcaat cgtaccacat
1261 ccgacacaaa catggaagta ctcggacata gttgcaccca ttaaagcagc aactaaaaga
1321 acaccctcc tccgttgcaa acaggacaag aatactgtgt tttacatga agnggtattt
1381 tgttatgaat ataatgcgtt aaagcagatt gactgtaatc gaacatccgg atgcctaaat
1441 caaccagcca tctcgtttca ataa
```

//

ANEXO 7

Accesión del GenBank AY259113, secuencia genómica de la ribonucleasa S₂₅ de cerezo.

LOCUS bankit523496 2927 bp DNA linear PLN 20-MAR-2003
DEFINITION Prunus avium gene for S25-RNase, genomic sequence.
ACCESSION ;
KEYWORDS .
SOURCE sweet cherry.
ORGANISM Prunus avium
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2927)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Cloning and characterization of genomic DNA sequences of
self-incompatibility alleles from sweet cherry
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2927)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAR-2003) Unidad Fruticultura, SIA-DGA, Ctra.
Montañana 930, Zaragoza 50016, Spain

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2927
/organism="Prunus avium"
/cultivar="Taleguera Brillante"
/db_xref="taxon:42229"
gene 308..2859
/gene="S-RNase"
/allele="S25"
CDS join(308..383,676..863,2413..2859)
/gene="S-RNase"
/codon_start=1
/product="S25-RNase"
/translation="MGMLKSSVAFVLVLAFAFFFCYVMSSGSYDYFQFVQWPPTNCRV
RIKRPCSNRPLQNF¹TIHGLWPSNYSNPTMPSNCAGSEFKERKLSPKLRSKLKR⁶¹SWPD
VESGNDPRFWEGEWSKHGK¹²¹CSEQTLNQM¹⁸¹QYFORSHEMWQSFNITEILRNASIVPHPTQ
TWTYSDIVSPIKAVTQT²⁴¹TPLL³⁰¹RCKFP³⁶¹PKSQ⁴²¹TKSQ⁴⁸¹PKSQ⁵⁴¹ATSQ⁶⁰¹LLHEVVL⁶⁶¹CYDYDALRL
IDCNRTAGCGNQQAISFQ"

BASE COUNT 880 a 480 c 499 g 1068 t
ORIGIN
1 aatagtatta ggttttaggt tgttgcttt ttctgtttat ttattatattt ttctttaatc
61 ttttcaattt gttagaaaa acaagggtt ttattttttc ttcatacatg tatatttggg
121 tcttgagaaa cttgtgggaa accaaagttg gacgacctt gcttacaagc tgtaagtaag
181 agattaattg cgacagtacg atccatacaa cctcctatat aataagcagc aaacacagtg
241 agtcgtaagt cagaaagcct ctctcattct gttgtatttc ttgttgcttt agtattatc
301 tctaagtatg gggatggtga aatcgtcagt cgctttcctt gttcttgctt ttgctttcct
361 cttttgttac gttatgagca gtggtgggtt gcattacaat cttttgctct ttatatccta
421 tatgcatgta atcagcattg cgtttttcta cttgtatttt ttattcagag aaactattgt
481 gtgtggtgga tgacatgcag tgtattgaat tcaccacat atttttcatt taatctaacg
541 cacaactttg tttggatgag caagtatttg gtgattggtt ttctgcatgt cctcttttta
601 ttttcttaat cttttgttta ttctgataat tgtttgcaat aagtgcagtc ttattcatca
661 caataatttt ggcaggatct tatgactatt ttcaatttgt gcaacaatgg ccaccgacca
721 actgcagagt tcgcatcaag cgaccttgct ccaatccccg gccattacaa aatttcacca
781 tccatggcct gtggccaagt aattattcaa acccaacgat gccagtaat tgcgcaggat
841 ctgaatttaa ggaaaggaaa ttggtacgta ttgtttcctt cttagaaatt agcctgtcat
901 ttgaagataa tatacttttt tgaataaaac cttgggtgct agataaaatt ttgatgttgg
961 ttccctgttg ggcacattgt tttgataata tatctaaagt gcaaaattaa aaatacattt
1021 atatggctct tatttgagat ggctgataat tgttagggcg tcttttgtct gatttagttt
1081 tttttttttt agcatgttag gtttggtgca ctcttgaatt tggactttg aatggtatgt

```

1141  tgatgttttt  gttgtattga  tgaaggtaat  acattgaagt  tgctcttttt  ttgtttgttga
1201  gaagttaatg  aagttgctct  ttgataataa  taaaaaagta  catttatatt  tgtagcttaa
1261  cgtatttctc  tgcaaggatc  tgcttgattt  ttattcttca  tataacacct  catttaaatt
1321  tcatctaagg  actaaaaatt  ctacaacaca  tatttataaa  atttcattat  actttattat
1381  tactagcctc  cccgcacgcg  cttccgcgcc  tgtgggagtt  cttttttaa  aatattttaa
1441  tttaccttag  aattaaaaaa  gataatgggt  ggttgtgttc  cataaaaaa  agatctatta
1501  tttgattttt  tttaaatatg  aaaaagtgtg  aatttaccat  attatcctta  tttaattaat
1561  aatttcaatt  cttagggcta  gtttggcatt  gctgtgctgt  aaaaaatac  gttgtcatat
1621  ttgctgtgag  agaaatcagc  tgtgagggaa  agcagtttgg  cgtttggtaa  actttttggt
1681  aaaagtgttg  ttggtattga  tttcctcata  atcagaaaa  gattgttgca  taatcattaa
1741  aaccagtgcc  tcttcaaac  tgattcctac  ataatcagaa  aatgaaagca  cctcattagc
1801  tgctttcctt  tatagctttc  tctcacagca  atttttaata  gtaagtgatt  ttcttacagt
1861  ttaccaaagc  ggctggactt  cccaaatttt  tttttaaaaa  tcacttatca  ccccaaataa
1921  gcaataccaa  acgggcacat  gtttgcatta  accaagggtg  ttttctagta  ttttgaatgt
1981  ttcaccattt  tctgccttct  gctttatata  tatagattta  tctatttggc  atcaattagc
2041  tttaaaaata  gaaaaatgtg  gtaagtctaa  catttccctt  aaacataata  tagcccacct
2101  tacgctgcat  cagtaaattt  gtcattttca  tgaacggact  tgacagaaaa  tcttagaata
2161  taagagatta  agtgagtcac  tttgaagttt  atagggtaaa  ttgaaaccaa  tgtactagaa
2221  tatgaaaaaa  caatattgta  ccaathtagc  caaatgcat  ctgcttatct  aatcaaaata
2281  ttgtaccaat  taaaatcgaa  attcaagggt  tgatgaagaa  aaaaaacaa  ttttatatta
2341  aagaatgaaa  gtctaactat  atcccttagg  tttttacttt  ttctcaaaat  atgtatatat
2401  tggatgtctc  agtcccccaa  attgcatcc  aaactgaaga  gatcttggcc  tgacgtggag
2461  agtggcaatg  atccaagatt  ttgggaaggc  gaatggagca  aacacggtaa  atggtccgag
2521  cagacactta  accaaatgca  atacttccag  cgatcccacg  aaatgtggca  gtcgttcaat
2581  attacagaga  tccttagaaa  cgcttcaatc  gtaccacatc  cgacacaaac  atggacctac
2641  tcggacatag  tatcaccat  taaagcagta  actcaacaa  cacctctcct  tcgttgcaaa
2701  tttcctccaa  agagccagac  gaagtctcag  cctaagagcc  aggcgacgtc  tcagttgtta
2761  catgaagtgg  tattgtgtta  tgattatgat  gcgttaaggc  tgattgactg  taatcgaaca
2821  gcaggatgcg  gaaatcaaca  agccatctcg  tttcaataaa  ataatagctt  gctttctaaa
2881  agtcataata  aagtaactat  ggtttagtat  ggtaggtgct  tgtgtaa

```

//

ANEXO 8

Accesión del GeneBank AY259114, secuencia genómica de la riboncleasa S₂₃ de cerezo.

LOCUS bankit532525 2039 bp DNA linear PLN 20-MAR-2003
DEFINITION Prunus avium gene for S23-RNase, genomic sequence.
ACCESSION ;
KEYWORDS .
SOURCE sweet cherry.
ORGANISM Prunus avium
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicots;
Rosidae; eurosids I; Rosales; Rosaceae; Amygdaloideae; Prunus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2039)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Cloning and characterization of genomic DNA sequences of
self-incompatibility alleles from sweet cherry
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 2039)
AUTHORS Wunsch,A. and Hormaza,J.I.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-MAR-2003) Unidad Fruticultura, SIA-DGA, Ctra.
Montana 930, Zaragoza 50016, Spain

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..2039
/organism="Prunus avium"
/cultivar="Vittoria"
/db_xref="taxon:42229"
gene 740..1976
/gene="S-RNase"
/allele="S23"
CDS join(740..815,1064..1251,1566..1976)
/gene="S-RNase"
/codon_start=1
/product="S23-RNase"
/translation="MAILNSTLAFVLAFVLAFAFFFCYVMSSGSYDYFQFVQWPPTNCRV
RIKRPCSNRPLQYFTIHLWPSNYSNPTMPSNCNGTQFKMQNLFPYLRSRLKMSWPD
VESGNDTKFWEGEWNKHGTCSERILNIMQYFQRSQAMWKSHNITEILKNASIVPHPTQ
TWKYSDIVSPIKSATGRTPLLRCKQDKSTQLLHEVVFCYDYNAIKQIDCNRTAGCGKQ
RDISFQ"

BASE COUNT 582 a 379 c 376 g 700 t 2 others
ORIGIN
1 ccaccacttg ncagcatcca cccacatgat agcacaaagt tctttcggtg caagttgagc
61 cataatcaac accgatcccc aaaccaatth tggatatatt ggtggttga ataattaatt
121 ttgtgtgctt gacttggtga gcttgggttt ggttttggat caaagcattg gctaggggtg
181 agttgtgggt cgaggaagt atgaggtgtt gctggcgatg gttgctttc ctttgaggca
241 tcaggaagtc attgttagag cctctaacat tnccatgtgt ggccattgac tttggcagtt
301 ttccgtctta gccttgaaca gcattataga aatcactact acaactctaa tattagaatt
361 gtttctaacc acacaaggta atctttaatc ggtttttgaa catgttacgt tttagctttt
421 gtctttccag tttctgttta tttattaact ggcttccttg tgtttattcc tttttcttta
481 atcttttgaa tatattaaa aaaacaaggg tttttatgat gattttttgt tgttgttttg
541 tttatacag tatatttggg tcttgagaaa ctagtgggaa aaggtaacca aagttggatg
601 taccttcgct tacaatttgt aagttagaga ttaattgcga ccccatgcga cctcctatat
661 aagcagcaa cacagtgagt cgtagctcag aaagcctctc tcattctgtt gtattttttg
721 ctttagtatt ctccaagta tggcgatttt gaactcgaca ctgccttcc tctgtcttgc
781 ttttgcttcc ttcttttgtt acgttatgag cagtgggtggg tggcattaca accttttgc
841 ctttatatcc tatatgcata tatatatata atcagcattg cgttttacta cttgtattht
901 ttgttcacag aactattgtg tgtgttcgat gatatatcat atgacatgag gtgtatthg
961 tgaatgtttt tctgcctgtc ccctttttat tttcatcctc tttcgtttat tctgataact
1021 gtttgcaata agtgcagtct attgatcaca ataatttttg caggatctta tgactattht
1081 caatttgtgc aacaatggcc accgaccaac tgcagagttc gcatcaagcg accttgctcc

```

1141 aatccccggc cattacaata tttcaccatc catggcctat ggccaagtaa ttattcaaac
1201 ccaacgatgc ccagtaactg caatgggacg caatttaaga tgcagaatth ggtatgtggt
1261 ggatttttct ttcactcaca tttgttttta gaaattatga ggcacatatc gtaagtatat
1321 aaagttgtaa gtacatttat atacgcata tataatata ctgaatcatt taataaatgg
1381 attcaccagt ttggcgtata tattcaaaat attgtactta atgagatgat aaaaaactta
1441 tgaaaaaaaa gaagaagtta cttatcaaat aatcaaaatc taactatccc gcaatatata
1501 tattcaccag tttgacgttt ctactttttt tctcgtaata tgtatatatt gcttggatgc
1561 ctcagtttcc ttatttacga tccagactga agatgtcttg gccagacgtg gaaagtggca
1621 atgatacaaa attttgggaa ggcgatgga acaaacatgg tacatgttcc gaacggatac
1681 ttaacataat gcaatacttc cagcgatccc aagcaatgtg gaaatcacac aatattacag
1741 agatccttaa aaacgcttca atcgtaccac atccgacaca aacatggaag tactcggaca
1801 tagtatcacc cattaatca gcaactggaa gaacaccct ccttcggtgc aaacaggata
1861 agagtactca gttgttcat gaagtggat tttgttatga ttataacgca ataaagcaga
1921 ttgactgcaa tcgaacagca ggatgaggaa aacaacgtga catctcgttt caataaaatt
1981 atagctacct tcctaagtca taataaagta gtatgtcttt accagcccgg gccgtcgc

```

//

ANEXO 9

Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences.

Heredity, 2002, 89:56-63.

Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences

A Wünsch¹ and JI Hormaza^{1,2}

¹Unidad de Fruticultura, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Campus de Aula Dei, Zaragoza Spain

A total of 76 sweet cherry genotypes were screened with 34 microsatellite primer pairs previously developed in peach. Amplification of SSR loci was obtained for 24 of the microsatellite primer pairs, and 14 of them produced polymorphic amplification patterns. On the basis of polymorphism and quality of amplification, a set of nine primer pairs and the resulting 27 informative alleles were used to identify 72 genotype profiles. Of these, 68 correspond to unique cultivar genotypes, and the remaining four correspond to three cultivars that could not be differentiated from the two original genotypes of which they are mutants, and two very closely related cultivars. The mean number of alleles per locus was

3.7 while the mean heterozygosity over the nine polymorphic loci averaged 0.49. The results demonstrate the usefulness of cross-species transferability of microsatellite sequences allowing the discrimination of different genotypes of a fruit tree species with sequences developed in other species of the same genus. UPGMA cluster analysis of the similarity data divided the ancient genotypes studied into two fairly well-defined groups that reflect their geographic origin, one with genotypes originating in southern Europe and the other with the genotypes from northern Europe and North America.

Heredity (2002) 89, 56–63 doi:10.1038/sj.hdy.6800101

Keywords: cultivar identification; fingerprinting; SSR transferability; molecular markers; microsatellites

Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L., Rosaceae, $2n = 16$) is cultivated in temperate regions of the world for its edible fruit. Cherries are thought to have originated around the Caspian and Black Seas and currently they are found across mainland Europe and in western Asian areas (Webster, 1996). Sweet cherry cultivation spread through Europe in times of the Roman Empire, although they were not planted extensively until the 16th century (Watkins, 1976). The spread of sweet cherry cultivation across western Europe was probably based on domestication of wild individuals that were well adapted to each area of cultivation. A limited number of these cultivars were taken, by European settlers, to North America and spread throughout the continent. However, since sweet cherries were not commercially exploited until a century ago (Hedrick *et al.*, 1915), most sweet cherry cultivars grown today are only a few generations from these landraces (Iezzoni *et al.*, 1990).

Current breeding objectives have triggered a constant release of genetically improved genotypes (Iezzoni *et al.*

1990; Brown *et al.*, 1996). Precise identification of the existing sweet cherry cultivars is essential for sweet cherry orchard establishment, efficient germplasm collection management, and selection of genotypes in cherry breeding programmes. Moreover, efficient characterisation methods are needed to assess the precious germplasm still present in eastern Europe and to study variability in wild stands scattered through Eurasia.

Cultivar identification has traditionally been based on morphological traits although DNA markers allow a more precise identification of plant genotypes and are of great interest for the characterisation of fruit trees. However, little work has been dedicated to the identification of sweet cherry cultivars. Thus, Granger *et al.* (1993) and Beaver *et al.* (1995) used isozymes to identify unique genotype profiles from sweet cherry cultivars whilst Gerlach and Stösser (1997) differentiated sweet cherry cultivars using RAPD markers.

Microsatellite markers (SSR; Litt and Luly, 1989; Tautz, 1989) are becoming the markers of choice for fingerprinting purposes due to their high polymorphism and reproducibility (Gupta and Varshney, 2000; Wünsch and Hormaza, in press). Among temperate fruit tree species, most microsatellite flanking sequences have been cloned and sequenced in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch; Cipriani *et al.*, 1999; Sosinski *et al.*, 2000; Testolin *et al.*, 2000; Aranzana *et al.*, 2002) and apple (*Malus × domestica* Borkh; Guilford *et al.*, 1997; Gianfranceschi *et al.*, 1998; Hokanson *et al.*, 1998), where they have been used in genotype identification and the determination of genetic relatedness. One drawback of microsatellites is the

Correspondence: A Wünsch, Unidad de Fruticultura, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Campus de Aula Dei Apdo 727 50080 Zaragoza Spain. E-mail: awunsch@aragob.es

²Current address: Estación Experimental la Mayora, CSIC, 29750 Algarrobo-Costa Málaga, Spain. E-mail: ihormaza@eelm.csic.es
Received 5 June 2001; accepted 14 February 2002

difficulty of their initial isolation. However, once the primer sequences have been identified, SSR markers can be easily applied and the flanking sequences are frequently conserved among species and genera (Downey and Iezzoni, 2000; Hormaza, 2002; Yamamoto *et al.*, 2001). However, studies of cross-species transferability in temperate fruit tree species have included limited numbers of genotypes and studies at a larger scale are required to validate the widespread use of the currently available SSR sequences. Thus, in this work, we have tested 34 microsatellite primer pairs developed in peach to characterise and study the genetic similarities among 76 sweet cherry genotypes, including old cultivars obtained from diverse geographical regions, and new genotypes released from different cherry breeding programmes.

Materials and methods

Plant material and genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 76 sweet cherry genotypes (Table 1) maintained at the SIA-DGA experimental orchards located at the Campus de Aula Dei in Zaragoza, Spain, using a modified version (Hormaza, 1999) of the DNA extraction protocol described by Doyle and Doyle (1987). Since low quality DNA was extracted from old leaves and fresh leaves are only available in spring, genomic DNA was extracted from eight to 10 winter buds collected during November and December. DNA from fresh leaves collected in spring was compared with that obtained from winter buds for 10 genotypes. Extracted DNA was quantified spectrophotometrically and diluted to 10 ng/ μ l before PCR amplification.

PCR amplification and product electrophoresis

Extracted genomic DNA was PCR-amplified using 34 pairs of microsatellite primers developed in peach (Tables 2 and 3). PCR reactions were performed in 20 μ l volumes containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.1 mM each dNTP, 0.2 μ M each primer, 40 ng genomic DNA, 0.45 units *Taq* polymerase (Life Technologies, Rockville, MD, USA) and a drop of mineral oil. Reactions were carried out on a PTC-100 (MJ Research) thermocycler using the following temperature profile: an initial step of 2 min at 94°C, 35 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 57°C and 1 min at 72°C, and a final step of 5 min at 72°C. For primers pchcms1 and pchcms3, the annealing temperature was lowered to 40°C. PCR products were separated by electrophoresis using 3% 'Metaphor' agarose gels (FMC Bioproducts) in 1 \times TBE buffer at 5 V/cm, stained with ethidium bromide and visualised under UV light. Band scoring was carried out using a standard 10 bp DNA ladder (Life Technologies). To confirm the results, microsatellite products that revealed differences smaller than 5 bp in agarose gels, were also separated using 10% polyacrylamide gel electrophoresis in 1 \times TBE buffer at a constant current of 40 mA, stained with ethidium bromide and visualised under UV light.

Data analysis

Heterozygosity was calculated as the number of heterozygous individuals over the total number of individuals analysed for each locus and averaged over the polymorphic loci. Genetic relationships among the genotypes

were calculated using UPGMA cluster analysis of the similarity matrix obtained from the proportion of shared fragments (Nei and Li, 1979). Cophenetic coefficients were computed for the dendrograms after the construction of a cophenetic matrix. All those analyses were computed with the programme NTSYS-pc 2.02 (Exeter Software, Stauket, New York, NY, USA). The robustness of the dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis was assessed with bootstrap analysis running 2000 iterations using the WinBoot program (Yap and Nelson, 1996).

Results

Repeatable amplification was obtained for 24 (70%) of the 34 microsatellite primer pairs tested. 13 (38%) were polymorphic and nine of these (Table 2) were selected for the identification of the 76 sweet cherry genotypes. As expected, no differences were recorded between the amplification patterns among the samples taken from fresh leaf tissue in spring and dormant winter buds. Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the results using 'Metaphor' agarose gel electrophoresis but revealed no additional bands. In fact, polyacrylamide electrophoresis showed greater numbers of artefact and stutter bands, making identification of microsatellite alleles more difficult than with agarose gel electrophoresis.

Out of the 24 primer pairs that amplified either poly- or monomorphic loci, 11 (45%) of them showed alleles in the same size range as those reported in peach for the same primer pairs (Tables 2 and 3). Four of the 13 polymorphic loci were discarded, because either size differences among bands were too small to be accurately scored (Pchcms1, UPD98-024, UPD98-410) or complex band patterns (UPD98-411) did not allow identification of unique loci. Three primer pairs (Pchms3, UPD98-409, UPD98-412) amplified alleles common to all genotypes analysed. The number of alleles per locus ranged from two to seven, ranging from 90 bp to 290 bp. Heterozygosity ranged from 0.04 to 0.94 for loci UPD98-409 and UPD96-005 respectively, the mean heterozygosity being 0.49. Heterozygosity for the 23 ancient and/or of unknown pedigree cultivars was 0.49, whilst heterozygosity for the other 53 genotypes from more recent breeding programmes was 0.47.

Genotypes showing a single amplified fragment were considered homozygous for that particular locus (Callen *et al.*, 1993). Inheritance of microsatellites was checked for the genotypes with known pedigree and whose parental genotypes were present in our collection. In all cases, bands present in the progeny were always present in at least one of the parental genotypes. Rare alleles were amplified with primer pairs UPD98-409, UPD98-412, UPD97-402 and UPD98-022. All the sampled cherry genotypes present a common allele of 130 bp with primer pair UPD98-409 and only 'Ambrunes', 'Pico Negro' and 'Pico Colorado' show a second band of 160 bp. The cultivars 'Marmotte', 'Hedelfinger' and 'Blanca de Provenza' share a distinct allele with primer pair UPD98-412. Generally, old cultivars, eg 'Burlat', 'Marmotte' or 'Hedelfinger', and several Spanish cultivars contributed most of the rare alleles.

The combination of nine selected primers and the resulting 27 informative markers allowed the unambiguous

Table 1 Sweet cherry cultivars included in this study with the SSR genotypes obtained after amplification with nine SSR primer pairs (primer details in Table 2)

Cultivar	Origin*	Pchgms1	Pchcms3	Pchcms5	UDP96-005	UDP98-409	UPD98-021	UPD98-022	UPD97-402	UPD98-412
Ambrunes	U, S	140	180/160	290	150/125	160/130	110/100	110/90	125	130
Arcina	BP, F	140	180	260	150/130	130	110/100	100/90	140/125	130
Belge	U, CE	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/90	130	130
Bing	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/90	130	130
Bianca de Provenza	U	140	180/160	290/260	120	130	100	105/90	145/125	130/100
Brooks	BP, US	140	180	290	150/120	130	110/100	90	135/125	130
Burlat	U, F	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130
Burlat C-1	BP, I	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130
Celeste (Sumpaca)	BP, C	140	180	290	150/130	130	110/100	100	135/125	130
Chinook	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110	145/130	130
Compact Stella	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	145/125	130
Coralise (Gardel)	BP, F	140	180	260	150/130	130	110/100	100/90	135/125	130
Corum	BP, US	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	140/130
Cristalina (Sumnue)	BP, C	190/140	180/160	260	150/120	130	110	110/100	135/125	130
Cristobalina	U, S	190/140	180	290/260	150/115	130	110/100	110/90	135/125	130
Duroni 3	U, I	140	180	290/260	150/115	130	110/100	100/90	125	130
Earlise (Riverdel)	BP, F	140	180	290/260	150/130	130	100	90	130/120	130
Earlystar	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	100	100/90	145/125	130
Early Van Compact	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Ferrovía	U, I	140	180	290/260	150/120	130	110	100	145/130	140/130
Garnet (Magar)	BP, US	140	180	260	120	130	110/100	110/90	130	130
Gil Peck	BP, US	190/140	180/160	260	150/120	130	110	110	145/130	130
Giorgia	BP, I	140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	125	130/120
Hartland	BP, US	140	180	260	150/120	130	110	100/90	140/130	130
Hedelfinger	U, CE	140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130/100
Lambert	BP, US	190/140	180/160	290/260	150/120	130	110/100	110	125	130
Lamida	BP, US	140	180	260	150/120	130	110	110	145/125	130
Lapins	BP, C	190/140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130
Larian	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110	110/100	145/130	130
Marmotte	U, F	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130/100
Marvin (Niram)	BP, US	140	180	290/260	120	130	110/100	100/90	130/125	130
Moreau	U, F	140	180	290/260	150/115	130	100	100/90	145/125	130
Napoleon	U, CE	190/140	180	260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
Newstar	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	100	135/125	130/120
Pico Colorado	U, S	140	180/160	290/260	150/130	160/130	110/100	110	140/125	130
Pico Negro	U, S	140	180/160	290/260	150/115	160/130	100	110/90	140/120	130
Precoce Bernard	U, F	140	180	290/260	150/130	130	100	100/90	145/130	130
Rainier	BP, US	190/140	180	290/260	120	130	110/100	90	130	130
Ramon Oliva	U, F	140	180/160	290	150/130	130	100	90	120	130
Reverchon	U, I	140	180	290/260	150/115	130	110/100	100	125	130
Royalton	BP, US	190/140	180	260	150/130	130	100	110/100	135/125	130
Ruby	BP, US	190/140	180	260	120	130	110/100	110/90	130	130
Sam	BP, C	140	180/160	290/260	150/120	130	100	110/100	145/125	130
Samba (Sumste)	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/90	135/130	130
Santina	BP, C	190/140	180/160	290/260	150/130	130	100	110/100	135/125	130
Skeena	BP, C	190	180	290/260	150/120	130	100	90	145/125	130
Somerset	BP, US	190/140	180	260	150/120	130	110/100	100	135/125	130/120
Sonata (Sumleta)	BP, C	190	180	290	150/120	130	100	100/90	145/125	130/120
Spalding	BP, US	190/140	180	260	150/130	130	110/100	110/100	135/125	140/130
Star	BP, C	190/140	180/160	260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
Stark Hardy Giant	BP, US	140	180	260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130
Sue	BP, C	140	180/160	260	150/120	130	110	110/100	135/125	140/130
Sumesi (12S 8 33)	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	145/130	130
Summit	BP, C	140	180/160	290/260	150/120	130	110/100	100	125	130
Sunburst	BP, C	140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	145/130	130/120
Sweetheart	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130/120
Sylvia	BP, C	140	180/160	290	150/120	130	110/100	100	145/125	130
Taleguera Brillante	U, S	140	180/160	290/260	150/115	130	100	100/90	135	130
Iigre	U, F	140	180	290	150/115	130	110	110/90	120	130
Van	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Van Spur	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	100/90	135/125	130/120
Vega	BP, C	190/140	180	260	150/130	130	110	100/90	135/125	140/130
Vic	BP, C	140	180	260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	140/130

Continued

Table 1 Continued

Cultivar	Origin*	Pchgms1	Pchcms3	Pchcms5	UDP96-005	UDP98-409	UPD98-021	UPD98-022	UPD97-402	UPD98-412
Vignola (Duroni 2)	U, I	140	180	260	150/130	130	110	100	140/125	130
Vitoria	U, I	140	180	290/260	150/130	130	110	100/90	145/130	130/120
13N.7.19	BP, C	140	180	290/260	150/120	130	110/100	100/90	135/125	130/120
13S.17.20	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/90	130	130
13S.18.10	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110/100	110/100	135/125	130
13S.18.15	BP, C	190/140	180	290/260	150/120	130	110	110/100	135/125	130/120
13S.21.7	BP, C	140	180	290	150/130	130	110/100	100	135/125	130
13S.27.17	BP, C	140	180	260	150/120	130	110	100/90	135/125	140/130
13S.3.13	BP, C	190/140	180	290	150/120	130	100	110/100	145/130	130
44W.11.8	BP, C	190/140	180	260	150/120	130	110	110/100	145/130	130
83703007	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	100	100	145/120	130
84703002	BP, I	190/140	180	290	150/120	130	110/100	100/90	130/120	130
84704006	BP, I	140	180	290	150/130	130	110/100	100/90	130/120	130

*U = Unknown pedigree; BP = Breeding programme; C = Canada; CE = Central Europe; F = France; I = Italy; S = Spain; US = USA

Table 2 Microsatellite primer pairs used for the identification of sweet cherry genotypes

Locus	SSR repeat structure in peach	Product size in peach (bp)	Size range in sweet cherry (bp)	No. of alleles in peach	No. of alleles in sweet cherry	H
Pchgms1 ^a	(AC) ₁₂ (AT) ₆	194	140-190	4	2	0.43
Pchcms3 ^a	(CT) ₁₃	220	160-180	2	2	0.21
Pchcms5 ^a	(CA) ₃ (TA) ₃	246	260-290	3	2	0.47
UDP96-005 ^b	(AC) ₁₆ TC(CT) ₂	155	120-150	4	5	0.94
UDP98-409 ^b	CA(CT) ₁₁					
UPD98-021 ^c	(AG) ₁₉	129	130-160	5	2	0.04
UPD98-022 ^c	(GA) ₂₂ (CA) ₁₁	145	100-110	2	2	0.52
UPD97-402 ^b	(TG) ₁₂ (AG) ₂₄	139	90-110	5	4	0.75
UPD98-412 ^c	(AG) ₁₇	136	120-150	3	7	0.81
	(AG) ₂₈	129	100-140	5	4	0.25

^aSosinski *et al* (2000) ^bCipriani *et al* (1999) ^cTestolin *et al* (2000)

Table 3 Microsatellite primers that did not amplify scorable or polymorphic loci in sweet cherry genotypes

Locus	Reference	SSR repeat structure in peach	Size range* (bp)
Pchcms1	Sosinski <i>et al</i> (2000)	(CA) ₉ (TA) ₁₄ (GA) ₁₃	130-190
UPD98-024	Testolin <i>et al</i> (2000)	(GT) ₁₉ TC(TG) ₇	70-80
UPD98-411	Testolin <i>et al</i> (2000)	(TC) ₁₆	150-190
UPD98-410	Testolin <i>et al</i> (2000)	(AG) ₂₃	130-160
Pchgms2	Sosinski <i>et al</i> (2000)	(CT) ₂₄	135 n.p.
Pchgms3	Sosinski <i>et al</i> (2000)	(CT) ₁₄	190 n.p.
Pchgms4	Sosinski <i>et al</i> (2000)	(CT) ₂₁	150 n.p.
Pchcms2	Sosinski <i>et al</i> (2000)	(CA) ₈	90 n.p.
UDP96-003	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(CT) ₁₁ (CA) ₂₈	85 n.p.
UDP96-008	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(CA) ₂₃	135-155 n.p.
UDP96-018	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(AC) ₂₁	265 n.p.
UDP96-019	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(TG) ₁₆ (AG) ₇	320 n.p.
UDP98-405	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(AG) ₉	105 n.p.
UDP98-406	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(AG) ₁₂	395 n.p.
UPD98-025	Testolin <i>et al</i> (2000)	(CA) ₁₉	70-95 n.p.
UPD98-407	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(GA) ₂₉	na
UPD98-416	Testolin <i>et al</i> (2000)	(AG) ₁₈	na
UDP96-001	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(CA) ₁₇	na
UDP97-403	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(AG) ₂₂	na
UPD96-010	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(GT) ₂₁ (GAGT) ₄ (GA) ₁₈	na
UPD96-013	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(AG) ₂₂ (TG) ₃ TT(TG) ₁₀	na
UPD96-015	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(CA) ₂₁	na
UPD97-401	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(GA) ₁₉	na
UPD98-408	Cipriani <i>et al</i> (1999)	(CT) ₁₄	na
UPD98-414	Testolin <i>et al</i> (2000)	(TC) ₂₄	na

*n.p. = no polymorphism; na = no or weak amplification

ous differentiation of 72 (94%) genotypes. UPGMA cluster analysis revealed several possible dendrograms and the dendrogram with the highest cophenetic correlation coefficient (0.66) is shown in Figure 1. As expected the genotypes derived by mutation could not be distinguished from the original genotype ('Van Spur' and 'Early Van Compact' from 'Van' and 'Burlat' C1' from 'Burlat'). The other genotypes that could not be distinguished are two pairs of genotypes that share a common pedigree ('Celeste' and '13S 21.7' and 'Burlat' and '84704006'). Most genotypes obtained from the same breeding programmes and/or sharing common parents, group together.

Since most of the recently released genotypes share common parents, UPGMA cluster analysis was performed with the 23 genotypes that are not recent releases from breeding programmes. Those genotypes include the ancient cultivars of unknown origin and parental breeding genotypes directly derived from old cultivars. In this case, a single dendrogram with a cophenetic correlation coefficient of 0.70 was obtained (Figure 2). The dendrogram clustered these 23 cultivars into two main groups, although with a low bootstrap value (<50%) support, that separate the genotypes originating from northern

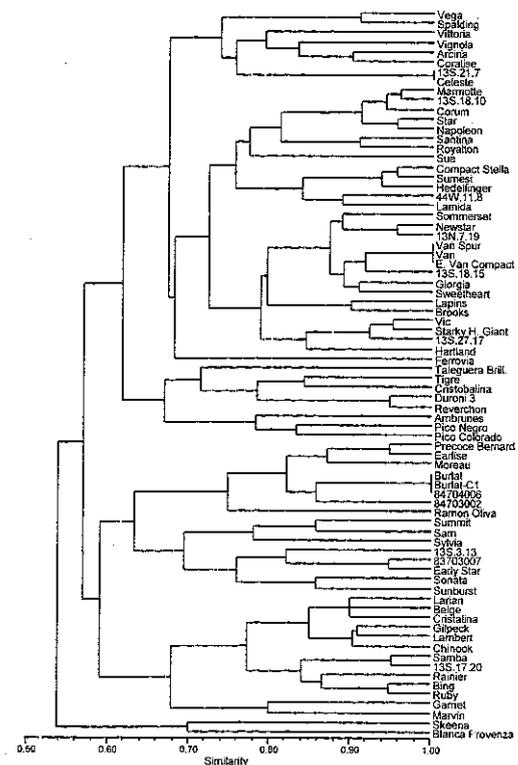


Figure 1 Dendrogram of the 76 sweet cherry cultivars included in this study based on UPGMA analysis using the similarity matrix generated by the Nei and Li coefficient after amplification with nine pairs of microsatellite primers.

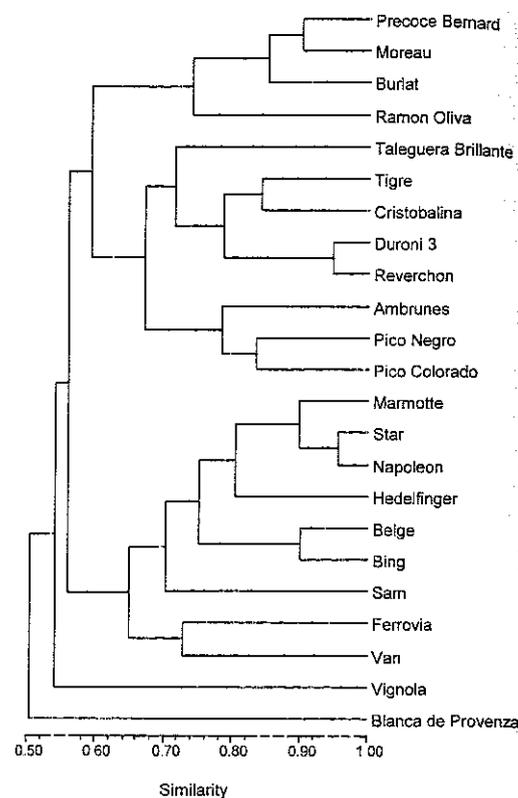


Figure 2 Dendrogram of 23 ancient or directly derived from ancient sweet cherry cultivars based on UPGMA analysis using the similarity matrix generated by the Nei and Li coefficient after amplification with nine pairs of microsatellite primers

Europe and North America from those originating from southern Europe

Discussion

In this work 72 sweet cherry genotypes were characterised with 27 SSR markers using nine primer pairs initially developed in peach. The results confirm the efficiency of microsatellite markers for fingerprinting purposes. Moreover, they demonstrate that microsatellites are highly conserved among peach and sweet cherry allowing the use of the same SSR primers to detect intra-specific variation in related species even though the ability to amplify loci and detect polymorphism usually decreases as the genetic distance increases (Steinkellner *et al.*, 1997; White and Powell, 1997; Maguire *et al.*, 2000; Roa *et al.* 2000).

The fact that both DNA sources used, leaves and dormant buds, produce DNA of sufficient quality for SSR amplification allows the characterisation of plant material at any time of the year. SSR detection using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) complicates the identification of microsatellite alleles, mainly due to the presence of ladder-like stutter patterns, with no significant improvement in resolution compared to agarose gel

electrophoresis. Moreover, PAGE is more time-consuming and toxic than agarose gel electrophoresis. An automated detection system would be able to resolve allelic variation at a finer scale and, consequently, the number of alleles detected would even be greater than that reported in this work. However, for routine SSR genotype analysis, agarose gel electrophoresis is a convenient method (Morgante *et al.*, 2001).

In this work, amplification of the microsatellite loci in sweet cherry was possible for 24 of the 34 (73%) peach microsatellites, of which 13 (38%) were polymorphic. This efficiency is lower than that recently reported in apricot (*Prunus armeniaca* L.), where 88% of peach SSR primers amplified loci, while 54% of them were polymorphic (Hormaza, 2002) probably due to the different position of apricot and cherry in relation to peach in *Prunus* phylogeny. Thus, morphological studies (Westwood, 1993) supported by cpDNA variation (Badenes and Parfitt, 1995) classifies *Prunus* species into five subgenera (*Prunophora*, *Amygdalus*, *Cerasus*, *Padus* and *Laurocerasus*). The main cultivated *Prunus* species belong to three of them: *Amygdalus* (peach and almond), *Prunophora* (plum and apricot), and *Cerasus* (sour and sweet cherries). The studies on cpDNA variation (Badenes and Parfitt, 1995) confirm the hypothesis (Watkins, 1976) that cherries are genetically more distant from peach than apricot, since the present day subgenus *Cerasus* species diverged earlier from the ancestral *Prunus* species than the other two subgenera.

For the set of sweet cherry genotypes analysed, the mean heterozygosity of the polymorphic loci was 0.49 ranging from 0.04 to 0.94. Although sweet cherry is an outbreeding species, the mean heterozygosity reported here is similar to that reported for other *Prunus* species, including peach (0.47, Testolin *et al.*, 2000; 0.45, Sosinski *et al.*, 2000) and apricot (0.51, Hormaza, 2002) using SSR markers. A low level of polymorphism in sweet cherry has also been detected by Stockinger *et al.* (1996) and Gerlach and Stösser (1997), using RAPD markers, and by Boskovic and Tobutt (1998) and Beaver *et al.* (1995) with isozyme markers, probably reflecting a narrow genetic base in sweet cherry germplasm.

Neither 'Burlat' C1, a compact mutation of 'Burlat', nor 'Van Spur' or 'Early Van Compact', both mutations of 'Van', could be differentiated from 'Burlat' or 'Van', respectively. The impossibility of differentiating mutants that differ from the original genotype in one or few genes, was expected due to the intrinsic nature of SSRs since it is very unlikely that the microsatellites amplified correspond to the mutated DNA region when they have been randomly isolated from the whole genome. The case of the other two pairs of genotypes 'Celeste' and '13S 21.7', and '84704006' and 'Burlat' can be explained regarding the pedigree information available. 'Celeste' and '13S 21.7' both originated from the cross of 'Van' and 'Newstar', and '84704006' descends from the cross of 'Burlat' and 'Sunburst'. In the first situation, the two genotypes appear to have inherited the same alleles for the loci analysed, and, in the second, the allele segregation has resulted in the same band profile as one of the parental genotypes, 'Burlat'. The use of more SSRs recently developed in *Prunus* (Aranzana *et al.*, 2002; Cantini *et al.*, 2001) may allow discrimination between these two closely related genotypes.

Since several of the genotypes share common ancestors

various similar dendrograms were possible and they were ranked according to their cophenetic correlation coefficient. The phenogram generated from the SSR data illustrates the identification of the genotypes studied and groups them according to their known pedigree (Figure 1). A better representation of the similarity relationships in this species is obtained when only the 23 genotypes that include the ancient cultivars of unknown origin and parental breeding genotypes directly derived from other old cultivars are used to construct the dendrogram (Figure 2). In this case, a single dendrogram was obtained after UPGMA analysis. Consequently, we believe that this dendrogram has a real biological significance although the scarcity of markers available results in the low cophenetic correlation coefficient and the low bootstrap value support obtained. This situation will likely change when additional SSRs developed in *Prunus* are tested in cherry.

The dendrogram grouped the 23 ancient cultivars into two main clusters according to their geographical origin and area of cultivation, probably reflecting local selection of outstanding wild genotypes. One group contains genotypes from southern Europe, and the other contains cultivars that mainly originated in northern and central Europe or in North America but derive from ancient cultivars from northern Europe. The cultivar 'Blanca de Provenza', the only cherry tree in our collection that produces cherries with yellow-white coloured skin and flesh, appears separated from the other two clusters together with the Italian cultivar 'Vignola'. Interestingly, within the group that comprises southern European cultivars, the three cultivars that originated in the Spanish Extremadura region ('Ambrunes', 'Pico Negro' and 'Pico Colorado') cluster together. Another subgroup is formed by some French cultivars ('Precoce Bernard', 'Moreau', and 'Burlat'), that were obtained in the French region of Rhone by the end of the nineteenth and the beginning of the twentieth century (Hedrick *et al.*, 1915; Société Pomologique de France, 1927, 1947). The cultivar 'Ramon Oliva', that clusters closer to those three French cultivars, although it is sometimes reported to be of Spanish origin (Bargioni, 1996), seems to have been found originally near Angers in France (Hedrick *et al.*, 1915). 'Duroni-3' and 'Reverchon', that cluster closely together, were both taken to France from Italy (Cifli, 1990; Bargioni, 1996), while 'Taleguera Brillante', 'Cristobalina' and 'Tigre' have an unclear origin. 'Tigre' is thought to come from France as well (Société Pomologique de France, 1927) whereas 'Cristobalina' originated in eastern Spain is morphologically different and geographically separated from the other Spanish cultivars studied; furthermore, it is self-compatible (Hugard, 1978) and the earliest variety to flower.

The second main cluster includes the ancient cultivars from Northern and Central Europe like 'Marmotte' (Northern France), 'Napoleon' (Central Europe) and 'Hedelfinger' (Central Europe probably from Germany) and the newer genotypes originating in North America or Europe but derived from cultivars from Northern Europe: 'Star' from the open pollination of 'Deacon', 'Sam' from the open pollination of a seedling of 'Windsor' (found in Ontario, Canada), 'Bing' from a seedling of 'Republican' (probably a seedling of Napoleon) and 'Van' from the open pollination of 'Empress Eugenie' (Northern France) (Hedrick *et al.* 1915; Société Pomolo-

gique de France, 1927; Ctifl, 1990; Bargioni, 1996; Brooks and Olmo, 1952, 1997). A southern European cultivar, 'Ferrovia', from the Italian region of Bari, also clusters in this subgroup.

The possibility of using SSR primers developed in a related species to detect intra-specific variation overcomes the troublesome process of their development, making a whole battery of already isolated SSR *Prunus* primer sequences available for the genetic characterisation of different species in the genus. Molecular characterisation of fruit tree scions and rootstocks is essential for the interests of fruit tree breeders, germplasm collections and the commercial sector such as nurseries. Since most temperate fruit tree species are vegetatively propagated, the identification of genotypes allow a standardisable reference for the identification of any cultivar and control of its propagation, independently of any factors that may limit or influence phenotypic characterisation, such as the environment, the time of year or the age of the tree. Furthermore, the possibility of studying the genetic diversity among different cultivars and populations, will benefit cherry breeding programmes by helping to take decisions on parental genotypes for crosses, and germplasm management to maximise the conserved diversity. This is becoming increasingly important to conserve the existing variability in the wild stands of this species scattered through most European and some Asian countries, especially due to the progressive narrowing of the genetic base. This situation is evidenced by the fact that the variability of traits of potential economic interest is limited in good fruit quality sweet cherry varieties (Iezzoni *et al.*, 1990) and that all the self-compatible cultivars currently planted or used in breeding programmes derive from a single cultivar, 'Stella'. Microsatellites seem to be appropriate to fulfil those objectives and it will be of interest to expand these kind of studies to areas where it is necessary to conserve interesting cultivars or genotypes before they disappear.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge M Herrero for her helpful comments on this manuscript, A Abbott and R Testolin for gently providing sequences of the microsatellite primers before publication, and R Gella for valuable information on sweet cherry germplasm. AW was supported by a SIA fellowship and financial support for this work was provided by INIA (Project Grant SC00-019).

References

- Aranzana MJ, Garcia-Mas J, Carbo J, Arus P (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121: 87-92.
- Badenes ML, Parfitt DE (1995). Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theor Appl Genet* 90: 1035-1041.
- Bargioni G (1996). Sweet Cherry Scions: characteristics of the principal commercial cultivars, breeding objectives and methods. In: Webster AD, Looney NE (eds) *Cherries: Crop physiology, production and uses*. Cab International: Wallingford, Oxon, UK. pp 73-112.
- Beaver JA, Iezzoni AF, Ramm CW (1995). Isozyme diversity in sour, sweet and ground cherry. *Theor Appl Genet* 90: 847-852.
- Boskovic R, Tobutt KR (1998). Inheritance and linkage relationships of isoenzymes in two interspecific cherry progenies. *Euphytica* 103: 273-86.
- Brooks RM, Olmo HP (1952). *Register of fruit & nut varieties, 1920-1950*. University of California Press: Berkeley and Los Angeles, USA.
- Brooks RM, Olmo HP (1997). *Register of fruit & nut varieties*. 3rd edn. ASHS Press: Alexandria, VA, USA.
- Brown SK, Iezzoni AF, Fogle HW (1996). Cherries. In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit Breeding, Vol. 1. Tree and Tropical Fruits*, vol. 1, John Wiley & Sons: New York. pp 213-255.
- Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RJ, Mulley JC, Sutherland GR (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52: 922-927.
- Cantini C, Iezzoni AF, Lamboy WF, Boritzki M, Struss D (2001). DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J Am Soc Hort Sci* 126: 205-209.
- Cipriani G, Lot G, Huang W-G, Marrazo MT, Peterlunger E, Testolin R (1999). AC/GI and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99: 65-72.
- Ctifl (1990). *Le Cerisier 'Le Cerise De Table'*. Ctifl: Paris.
- Downey S, Iezzoni A (2000). Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *J Am Soc Hort Sci* 125: 76-80.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Gerlach HK, Stösser R (1997). Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angew Bot* 71: 412-418.
- Gianfranceschi L, Seglias N, Tarchini R, Komjanc M, Gessler C (1998). Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor Appl Genet* 96: 1069-1076.
- Granger AR, Clarke GR, Jackson JF (1993). Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theor Appl Genet* 86: 458-464.
- Guilford P, Prakash S, Zhu JM, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R (1997). Microsatellites in *Malus × domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor Appl Genet* 94: 249-254.
- Gupta PK, Varshney RK (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Hedrick UP, Howe GH, Taylor OM, Tubergen CB, Wellington R (1915). *The Cherries of New York. Report of the New York Agricultural Experiment Station for the Year 1914 II*. J.B. Lyon: Albany, NY.
- Hokanson SC, Szewc-MCFadden AK, Lamboy WF, MCFerson JR (1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus × domestica* Borkh core subset collection. *Theor Appl Genet* 97: 671-683.
- Hormaza JI (1999). Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Sci Hort* 79: 121-126.
- Hormaza JI (2002). Molecular characterisation and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor Appl Genet* 104: 321-328.
- Hugard J (1978). Origine du pollen et variétés pollinisatrices. *Le Fruit Belge* 381: 11-32.
- Iezzoni A, Schmidt H, Albertini A (1990). Cherries (*Prunus*). In: Moore JN, Ballington JR Jr (eds) *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*, vol 1. ISHS: Wageningen, The Netherlands. pp 111-173.
- Litt M, Luly JA (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Gen* 44: 397-401.
- Maguire TL, Edwards KJ, Saenger P, Henry R (2000). Characterisation and analysis of microsatellite loci in a mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Theor Appl Genet* 101: 279-285.
- Morgante M, Pfeiffer A, Jurman I, Paglia G, Olivieri AM (2001). PCR analysis of SSR polymorphisms in plant using agarose gels. In: Karp A, Isaac PG, Ingram DS (eds) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 206-207.
- Nei M, Li WH (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5269-5273.
- Roa AC, Chavarriaga-Aaguire P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C, Tohme J (2000). Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *Am J Bot* 87: 1647-1655.
- Société Pomologique de France (1927). *Le Verger Français. Catalogue Descriptif des Fruit Adoptés par le Congrès Pomologique Réveil du Beaujolais*. Villefranche.
- Société Pomologique de France (1947). *Le Verger Français. Catalogue Descriptif des Fruit Adoptés par le Congrès Pomologique B Aranud*. Lyon, Paris.
- Sosinski B, Gannavarapu M, Hager LD, Beck LE, King CJ, Ryder CD, Rajapakse S, Baird WV, Ballard RE, Abbott AG (2000). Characterisation of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor Appl Genet* 101: 421-428.
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glossl J (1997). Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. *Mol Ecol* 6: 1189-1194.
- Stockinger EJ, Mulinix CA, Long CM, Brettin IS, Iezzoni AF (1996). A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore-derived callus culture population. *J Hered* 87: 214-218.
- Iautz D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
- Testolin R, Marrazo MT, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, Pancaldi M, Sansavini S (2000). Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.
- Watkins R (1976). Cherry plum, peach, apricot and almond. In: Simmonds NW (eds) *Evolution of Crop Plants*. Longman: London and New York. pp 242-247.
- Webster AD (1996). The taxonomic classification of sweet and sour cherries and a brief history of their cultivation. In: Webster AD and Looney NE (eds) *Cherries: Crop physiology production and uses*. CAB International: Wallingford, Oxon, UK. pp 3-24.
- Westwood MN (1993). *Temperate-zone pomology: physiology and culture*. 3rd edn. Timber Press: Portland, Or.
- White G, Powell W (1997). Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Mol Ecol* 6: 1195-1197.
- Wünsch A, Hormaza JI (in press). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*.
- Yamamoto I, Kimura T, Sawamura Y, Kotobuki K, Ban Y, Hayaishi T, Matsuta N (2001). SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor Appl Genet* 102: 865-870.
- Yap V, Nelson RJ (1996). *WinBoot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms*. International Rice Research Institute Manila, Philippines.

ANEXO 10

Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of Spanish local sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars.

Genetic Resources and Crop Evolution, 2003 (en prensa).



Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars

A. Wünsch¹ and J.I. Hormaza²

¹Unidad de Fruticultura, S.I.A. – D.G.A. Campus de Aula Dei. Apdo. 727, 50080 Zaragoza, Spain;

²Estación Experimental la Mayora – CSIC, 29750 Algarrobo-Costa, Málaga, Spain

Received 22 October 2002; accepted in revised form 21 February 2003

Key words: Germplasm, Microsatellites, Molecular markers, Self-incompatibility, SSRs

Abstract

A group of 28 sweet cherry (*Prunus avium* L.) local cultivars from the Jerte Valley in Western Spain were fingerprinted using microsatellites and their self-incompatibility alleles determined using S-RNase conserved primers. A total of 12 microsatellite primer pairs revealed 42 informative alleles that allowed the unequivocal identification of 26 genotypes. UPGMA cluster analysis of the similarity data produced a clear separation between the old traditional cultivars and the most recent introductions. The S-allele analysis showed a low number of different alleles in the older cultivars studied and revealed the presence of three new S-alleles not described previously. The combined information obtained from SSR fingerprinting and S-allele identification will be useful to optimize the conservation of the cherry genetic resources present in the area. Moreover, this approach can be applied to optimize the conservation of local genetic resources of other fruit tree species.

Introduction

Sweet cherry (*Prunus avium* L., Rosaceae, $2n=16$) originated around the Caspian and Black Seas (Watkins 1976) and it is cultivated in cool and temperate regions for its edible fruit. The earliest report of cherry cultivation appears in classical times although the fruits were collected from the wild long before their cultivation (Zohary and Hopf 1988). The spread of the cultivation of sweet cherry across Western Europe gave rise to specific ecotypes well adapted to each area of cultivation probably due to domestication of promising wild individuals.

Total world cherry production has reached close to 2 million Metric tons (the fourth species among stone fruit crops after peach, plum and apricot), although some countries (Iran, USA, Turkey, Germany, Italy, Spain and Romania) concentrate more than 60% of the production (Faostat, 2002). In Spain, almost 30% of the sweet cherry fresh market production is concentrated in the Jerte river valley. This valley, located in the North of the Extremadura region in western Spain, has a cherry growing tradition that dates back to the

14th century, although it is believed that cherries were introduced earlier (Flores del Manzano, F. 1985). The importance of cherry in this area increased dramatically at the beginning of the 20th century after the chestnut blight disease destroyed the other important crop industry of the valley, chestnut production (Flores del Manzano, F. 1985). Characteristic features of the cherries produced in this area together with traditional agricultural practices make these cherries a highly appreciated fruit in both national and foreign markets.

The Jerte valley is deep and narrow and cherries are cultivated mainly on terraces at different altitudes between 700 and 1200 m. The combination of different cultivars planted at different elevations results in a large harvest window. Thus, although early and mid-season cherries contribute to a significant percentage of the annual yield, more than 60% of the production comes from a group of late maturing cultivars collectively called "Picotas" like 'Ambrunés', 'Pico Colorado', 'Pico Limón Negro' or 'Pico Negro' harvested until mid July (Ionso-Gavilla). In fact, these cultivars represent some of the latest ripening cherries

cultivated worldwide. Other distinguishing characteristics are the taste, that combines a high sugar content with a slight acidity, a firm pulp and the release of the peduncle during harvest resulting in the marketing of peduncle-less cherries. Together with these autochthonous cultivars, other traditional cultivars like 'Ramón Oliva' or 'Burlat' and more recent introductions like 'Lapins' or 'Sunburst' are also grown in the area.

The traditional way of cherry cultivation in the Valley involved mainly small orchards maintained by different owners and this allowed, on the one hand, the maintenance of the local germplasm diversity and, on the other hand, the avoidance of fruit setting problems derived from self-incompatibility. However, the pressure of modern cultural techniques leads to the planting of the most productive local and introduced cultivars reducing the traditional diversity of local germplasm. Thus, efforts should be made to maintain and characterize the autochthonous cherry germplasm found in the Jerte Valley to conserve the genetic variability that has been maintained in this area and to make it available for further use in sweet cherry breeding programmes. Moreover, incompatibility relationships among the cultivars grown in the valley should be studied in order to recommend the best cultivar combinations.

Nowadays, the availability of molecular DNA markers allows a precise characterization of plant genotypes. Molecular fingerprinting complements morphological characterization and permitting the identification in the absence of phenotypic traits, at an early stage of development and in any phenological phase of the tree. Among the available DNA markers, SSRs or microsatellites (Litt and Luty 1989; Tautz 1989) have become the markers of choice for fingerprinting purposes in most plant species (Gupta and Varshney 2000) including fruit trees (Wünsch and Hormaza 2002a) due to their high polymorphism, codominancy and reproducibility. Moreover, flanking sequences are frequently conserved among species and genera allowing cross-species transferability of the markers (Downey and Iezzoni 2000; Hormaza 2002; Wünsch and Hormaza 2002b; Yamamoto et al. 2001). In the case of *Prunus*, most of the available SSR sequences have been developed in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch. (Aranzana et al. 2002; Cipriani et al. 1999; Dirlwanger et al. 2002; Sosinski et al. 2000; Testolin et al. 2000)] and some of them have been shown to be conserved in sweet cherry (Dirlwanger et al. 2002; Wünsch and Hormaza 2002b).

Since most traditional sweet cherry cultivars are self-incompatible and many of them are inter-incompatible, the knowledge of the incompatibility relations among cultivars is essential for a correct orchard establishment. The recent cDNA cloning and characterization of the S-RNases for sweet cherry (Tao et al. 1999) allows the determination of the S-allele composition of sweet cherry genotypes by PCR analysis. Similarly to other cultivated Rosaceae species such as almond [*Prunus dulcis* (Mill.) Webb] (Tao et al. 1997), Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd) (Sassa et al. 1992) or apple (*Malus x domestica* Borkh.) (Broothaerts et al. 1995), this ribonuclease is involved in the stylar determination of the gametophytic self-incompatibility response. Thus, the design of PCR primers derived from the conserved regions of the sweet cherry RNase cDNA sequence, have proved useful for S-allele identification by PCR and PCR-RFLP analysis (Sonneveld et al. 2001; Tao et al. 1999; Wiersma PA et al. 2001; Yamane et al. 2000) as well as using RFLP profiles (Hauck et al. 2001). Molecular typing of S-alleles using PCR speeds the process of S-allele identification, that has traditionally been carried out through pollination tests (Crane and Brown 1937; Matthews and Dow 1969) and, more recently, by the isolation of stylar proteins by isoelectric focusing (Bošković and Tobutt 1996, 2001).

Thus, in this work we have used twelve SSR sequences developed in peach to fingerprint 28 local sweet cherry cultivars from the Jerte valley. Furthermore in order to optimise orchard management and efficiency and to complement the genotype characterization, the S-allele composition of each cultivar has also been investigated using recently identified primers in the conserved regions of the S-RNase cDNA of sweet cherry.

Materials and methods

SSR genotype characterization and genetic similarities among genotypes

The 28 sweet cherry cultivars analysed (Table 1) were obtained from the sweet cherry germplasm bank located in Barrado (Cáceres, Spain) (Moreno et al. 2001). DNA extraction and SSR amplification was carried out according to Wünsch and Hormaza (2002b) using 12 previously selected *Prunus* SSR primer pairs (Table 2). SSRs were visualized on high-

Table 1 List of the 28 sweet cherry cultivars analyzed and their S-allele constitution identified by PCR analysis. S allele nomenclature according to Tobutt, K.R., T. Sonneveld & F. Bošković(1c).

Cultivar	Salleles	Incompatibility Group
Pedro Merino	S ₁ -S ₃	II
Ambrunés	S ₃ -S ₆	VI
Coloradilla	S ₃ -S ₆	VI
De la Casa	S ₃ -S ₆	VI
Del Gordo	S ₃ -S ₆	VI
Jarandilla	S ₃ -S ₆	VI
Mollar	S ₃ -S ₆	VI
Pico Limón Colorado	S ₃ -S ₆	VI
Pico Limón Negro	S ₃ -S ₆	VI
Pico Negro	S ₃ -S ₆	VI
Pico Negro Barrado	S ₃ -S ₆	VI
Pretera	S ₃ -S ₆	VI
Venancio	S ₃ -S ₆	VI
Del Pollo	S ₃ -S ₉	X
Navalinda	S ₃ -S ₉	XVI
Temprana Negra	S ₃ -S ₆	XX
Garrafal	S ₃ -S ₇	
Del Cardito	S ₃ -S ₇	
Lucinio	S ₃ -S ₁	
Pico Colorado	S ₆ -S ₇	
Pico Colorado Cirino	S ₆ -S ₇	
Virgo Juliana	S ₆ -S ₇	
Cubeto	S ₃	
Especial	S ₃	
Nabuca	S ₃	
Veterinaria	S ₃	
Noelia	S ₄	
Ramón Rachilla	S _R	

resolution agarose (MetaPhor, FMC Bioproducts) and ethidium bromide staining. Genetic similarities were estimated with the program NTSYS-pc 2.02, using Nei and Li (1979) coefficient of similarity and the unweighted pair-group method (UPGMA) cluster analysis.

Table 2. Microsatellite primer pairs used for the identification of genotypes.

SSR	Reference	No alleles	Range (bp)
Pchgms1	Sosinski et al (2000)	2	140-190
Pchgms3	Sosinski et al (2000)	2	160-180
Pchgms5	Sosinski et al (2000)	2	260-290
UDP96-005	Cipriani et al (1999)	5	120-150
UDP98-409	Cipriani et al (1999)	2	130-160
UPD98-021	Testolin et al (2000)	2	100-110
UPD98-022	Testolin et al (2000)	3	90-110
UPD98-412	Testolin et al (2000)	4	100-140
UPD97-402	Cipriani et al (1999)	8	120-150
CPPCT6	Aranzana et al (2002)	2	190-220
PS12A02	Downey and Iezzoni (2000)	10	160-200

S allele identification

S alleles for each cultivar were identified by PCR amplification using primer pairs T2-C4R, C2-C4R (Tao et al. 1999) and SI31-SI32, SI19-SI20 (Wiersma PA et al. 2001), plus the primer pair combinations SI31-SI20, PruC2-SI20, SI19-PruC4R y PruT2-SI32. PCR reactions were performed in a total volume of 20 µl containing 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 40 ng of genomic DNA and 0.45 units of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The PCR temperature profile used was an initial cycle of 3 minutes at 94 °C, followed by 35 cycles of 1 minute at 94 °C, 1 minute at 56 °C and 3 minutes at 72 °C, finished with 7 minutes at 72 °C. The amplification products were analysed in 1.7% agarose gels in TBE and ethidium bromide staining using a 1Kb ladder (Invitrogen). Cultivars of known S-allele constitution were used as control for the establishment of the band size of alleles S₁ to S₆ and S_R. The nomenclature used for the S-alleles corresponds with that proposed by Tobutt, K.R., T. Sonneveld & R. Bošković(1c).

Results and Discussion

SSR genotype characterization and genetic similarities

Twelve selected *Prunus* SSR primer pairs and the resulting 42 alleles (Table 2) were used to characterize the genotypes of 28 sweet cherry cultivars (Table 1). All the genotypes analysed with the exception of

two cultivars, produced unique SSR profiles. The two cultivars that could not be distinguished are 'Pico Colorado' and 'Pico Colorado Cirino'. Those two cultivars are phenotypically very similar but present some differential traits (M. Manzano personal communication) that would suggest that they are in fact different although genetically very close genotypes.

The similarity data grouped the genotypes in four main clusters that reveal the autochthonous character of most of the varieties cultivated in the area (Figure 1). Thus, it is possible to differentiate a main group that contains cultivars like 'Ambrunés', 'Pico Colorado', 'Pico Negro' or 'Pico Limón Negro'. These cultivars comprise the group of late maturing cultivars called "picotas" and their features are characteristic of the sweet cherry germplasm traditionally cultivated in this area. All the other genotypes included in this group are also late maturing traditional cultivars grown in the valley although cultivated to a lesser extent, with the exception of 'Del Pollo' and 'Noelia' which are believed to be more recent introductions (M. Manzano, pers. comm.). A similar separation between local and foreign cultivars has been reported using RAPDs (Moreno and Trujillo 2001).

The other three groups include a set of more heterogeneous cultivars of which only 'Pretera' and 'Del Gordo' are known to be old local cultivars. The rest correspond to foreign material either introduced directly like 'Especial', or 'Pedro Merino', that could correspond to exogenous material brought to the valley and identified by a different name (Iñso-Gavilla; Moreno et al. 2001) or, indirectly, obtained through crosses between new introductions and local genotypes. The situation of 'Pretera' and 'Del Gordo' outside of the group that comprises old local cultivars could be explained by a genetic proximity to some of the new genotypes obtained by crossing old cultivars with new introductions.

S allele identification

The use of the primer pairs I2-C4R, C2-C4R and SI31-SI32, SI19-SI20 recently developed by Tao et al. (1999) and Wiersma PA et al. (2001), allowed the identification of the complete S-allele constitution of 23 of the sweet cherry genotypes analyzed and just one of the S-alleles of the remaining 5 cultivars (Table 1). The amplification of only one allele in the cultivars 'Cubeto' (S_3), 'Ramón Rachilla' (S_R), 'Nabuca' (S_3), 'Noelia' (S_4) and 'Veterinaria' (S_3) indicates that the additional allele could not be am-

plified with the primers used, probably due to differences in the DNA sequence of the conserved regions, where the primers are designed.

The S-allele constitution of the cultivars (Table 1) is characterized by the presence of four previously reported alleles (S_3 , S_4 , S_6 and S_9) together with three new alleles (temporarily named S_7 , S_L , S_R). S_7 could only be amplified with the primer pairs SI31-SI32 or PruT2-SI32 producing an amplification product of 495 bp in the cultivars 'Garrafal', 'Pico Colorado', 'Pico Colorado Cirino', 'Virgo Juliana' and 'Del Cardito'. Similarly in the cultivar 'Lucinio' we identified a band of 404 bp with the same primer pairs, which could also correspond with a new S-allele (S_L). In the cultivar 'Ramón Rachilla' we identified another putative S allele (S_R) that could be amplified with all the primer pair combinations, producing amplification products consistent with the situation of the primers in the RNase DNA sequence and different from previously described band sizes. All these new putative S-alleles have been sequenced and appear to correspond to fragments of RNase sequences (Wünsch and Hormaza, in prep).

Interestingly, with the exception of the cultivar Noelia (S_4), and Del Pollo (S_6S_9), which are recent introductions, all the cultivars that group together according to the similarity data in the first group, and that correspond with the traditional Jerte cultivars, have a narrow distribution of S alleles with different combinations of just three S alleles: S_3 , S_6 and S_7 . Most of these cultivars (Table 1) have the constitution S_3S_6 and would pertain to the cherry incompatibility group VI, while the remaining are either S_3S_7 or S_6S_7 . Similarly, two other old cultivars that appear in the other groups ('Del Gordo' and 'Pretera') also have the S-constitution S_3S_6 . The rest of cultivars show the S_3 allele in combination with different additional alleles like S_1 and S_9 , except 'Temprana Negra' that is S_1S_6 and 'Ramón Rachilla' that is S_R . Thus, it seems that the traditional germplasm from the Jerte valley contains three alleles (S_3 , S_6 and S_7), while the introduction of new cultivars has resulted in the presence of additional alleles. The origin of cherry cultivation in this Valley is unclear. Whether it started with few genotypes introduced centuries ago in this area, or through local domestication of promising wild individuals, the genetic basis appears to be small. This is compatible with the good number of phenotypic characteristics shared by the local cultivars. If the cultivars are derived from populations of wild cherries present in the Valley, those populations

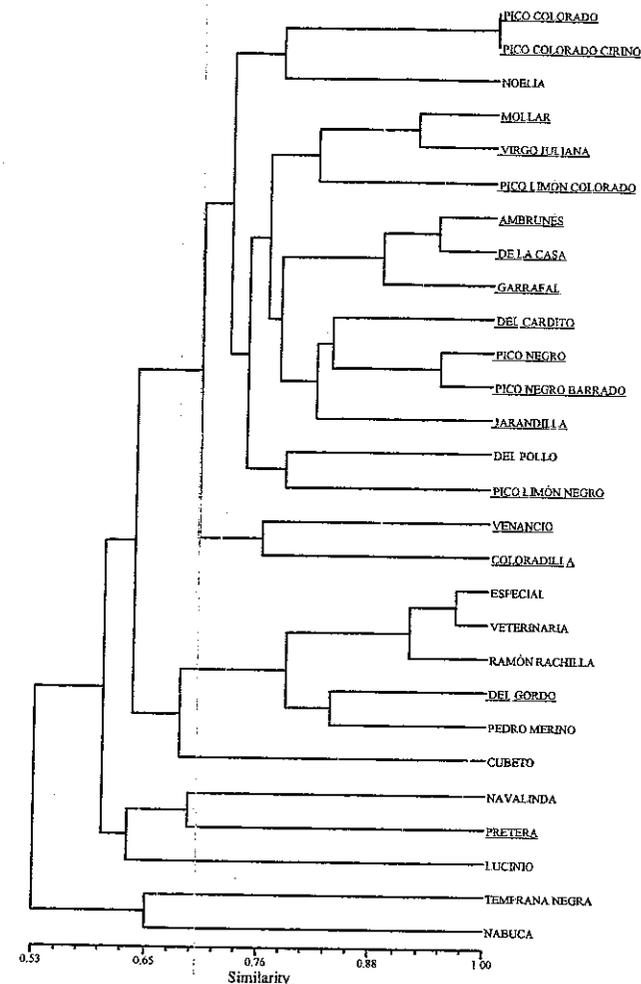


Figure 1. Dendrogram of the 28 cherry cultivars included in this study based on UPGMA analysis using the similarity matrix generated by the Nei and Li coefficient after amplification with 12 pairs of microsatellite primers. Old traditional cultivars from the Jerte Valley are underlined.

should present a high frequency of the S_3 allele. Theoretical models predict that populations should contain a limited number of alleles but the frequencies of the different incompatibility phenotypes are expected to be equal although this can be altered by a number of factors such as linkage of the S-locus to other loci subject to selection, stochastic effects related to the founding of populations or the size of the

population (Lawrence 2000; Raspé and Kohn 2002). Studies involving local wild cherry populations should be carried out in order to answer these questions.

We are aware of only one study on the intercompatibility of the varieties cultivated at the Jerte valley (Gil-Albert F. & P. Hoyos, 1986). In that work, the authors made some crosses between some of the

cultivars included in our study and, although most of the results are corroborated with the molecular data obtained here, some discrepancies are apparent, probably due to the unreliability of the nomenclature of the cultivars. The establishment of the germplasm bank and the fingerprinting of the genotypes with molecular markers can be useful to overcome this problem. Regarding the four most important "picoña" cultivars ('Ambrunés', 'Pico Colorado', 'Pico Limón Negro' or 'Pico Negro') our results indicate that only 'Pico Colorado' (S_6S_6) would be intercompatible with any of the other three cultivars that show the same S-allele constitution (S_3S_6) that, consequently, are inter-incompatible.

The traditional way of cherry cultivation in the Valley based on small properties and a diversity of cultivars allowed an efficient pollination with compatible pollen among cultivars that shared some S-alleles since compatible cultivars were likely always found nearby. However, the process of selection of the most interesting genotypes, especially in the late-maturing traditional cultivars could lead to the cultivation of fewer cultivars and, consequently, to the appearance of production problems due to incompatibility. Consequently, the results obtained in this work can be of help in order to conserve the local germplasm, design crosses to develop new genotypes taking advantage of the variability already present and designing the best cultivar combinations in new orchards to keep the traditional characteristics of the cherries harvested in the valley together with the avoidance of production problems due to incompatibility.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge T. Bespín for technical assistance, M. López-Corrales for kindly providing the plant material, M. Manzano for valuable information on the Jerte cherry germplasm and M. Herrero for helpful comments on the manuscript. A.W. was supported by a SIA fellowship and financial support for this work was provided by INIA (Project Grant SC00-019) and MCYT (Project Grant AGL2001-2414).

References

Ionso-Gavilán, I. 1967. El cerezo en el Valle del Jerte. Ministerio de Agricultura. Monografías No. 16. Madrid

- Aranzana M.J., Garcia-Mas J., Carbo J. and Arus P. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding* 121: 87-92.
- Bošković R. and Tobutt K.R. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymograms with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 90: 245-250.
- Bošković R. and Tobutt K.R. 2001. Genotyping cherry cultivars assigned to incompatibility groups by analysing stylar ribonucleases. *Theor. Appl. Genet* 103: 475-485.
- Broothaerts W., Janssens G.A., Proost P. and Broekaert F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol Biol* 27: 499-511.
- Cipriani G., Lot G., Huang W.-G., Marrazo M.T., Peterlunger E. and Testolin R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus Persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet* 99: 65-72.
- Crane M.B. and Brown A.G. 1937. Incompatibility and sterility in the sweet cherry, *Prunus avium* L. *J. Pom. Hort. Sci.* 15: 86-116.
- Dirlewanger E., Cosson P., Tavaud M., Aranzana M.J., Poizat C., Zanetto A. et al. 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus Persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor. Appl. Genet* 105: 127-138.
- Downey S. and Iezzoni A. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry peach and sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125: 76-80.
- Faostat, 2002. Agriculture data. <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>
- Flores del Manzano, F. 1985. Historia de una comarca altoextremeña: el valle del Jerte. Institución Cultural "El Broceense". Excmo. Diputación General de Cáceres. Cáceres.
- Gil-Albert, F. & P. Hoyos, 1986. Algunas notas sobre la biología floral de variedades de cerezo del Valle del Jerte. *Actas SECH* 1986: 181-190.
- Gupta P.K. and Varshney R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis in bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- Hauck N., Iezzoni A.F., Yamane H. and Tao R. 2001. Revising the S-allele nomenclature in sweet cherry (*Prunus avium*) using RFLP probes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 654-660.
- Hormaza J.I. 2002. Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet* 104: 321-328.
- Lawrence M.J. 2000. Population genetics of the homomorphic self-incompatibility polymorphisms in flowering plants. *Ann. Bot. (Supplement A)* 221-226.
- Litt M. and Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet* 44: 397-401.
- Matthews P. and Dow K.P. 1969. Incompatibility groups: sweet cherry (*Prunus avium*). In: Knight R.L. (ed.) *Abstract Bibliography of Fruit Breeding and Genetics to 1965: Prunus*. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal. pp. 540-544.
- Moreno J. and Trujillo I. 2001. Relaciones entre las variedades de cerezo cultivadas en el valle del Jerte con marcadores RAPDs. *Actas de Horticultura* 35: 405-410.
- Moreno J., Manzano M.A., Toribio F., Trujillo I. and Rallo I. 2001. Establecimiento del banco de germoplasma de variedades de cerezo del valle del Jerte. *Actas de Horticultura* 36: 824-830.
- Nei M. and Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Raspé O. and Kohn J.R. 2002. S-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae). *Heredity* 88: 458-465.
- Sassa H., Hirano H. and Ikeshashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiol* 33: 811-814.
- Sonneveld T., Robbins T.P., Bošković R. and Tobutt K.R. 2001. Cloning six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theor. Appl. Genet* 102: 1046-1055.
- Sosinski B., Gannavarapu M., Hager I.D., Beck I.E., King G.J., Ryder C.D. et al. 2000. Characterisation of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet* 101: 421-428.
- Tao R., Yamane H., Sassa H., Mori H., Gradziel I.M., Dandekar A.M. et al. 1997. Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiol* 38: 304-311.
- Tao R., Yamane H., Sugiyama A., Murayama H., Sassa H. and Mori H. 1999. Molecular typing of S-alleles through identification, characterization and cDNA cloning for S-RNases in sweet cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 224-233.
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Testolin R., Marrazo M.T., Cipriani G., Quarta R., Verde I., Dettori M.T. et al. 2000. Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome* 43: 512-520.
- Tobutt, K.R., T. Sonneveld & R. Bošković, 2001. Cherry (in)compatibility genotypes-harmonization of recent results from UK, Canada, Japan and USA. *Eucarpia Fruit Breeding Section Newsletter* 5: 41-46.
- Watkins R. 1976. Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: Simmonds N.W. (ed.) *Evolution of Crop Plants*. Longman London and New York, pp. 242-247.
- Wiersma P.A., Wu, Zhou L., Hampson C. and Kappel F. 2001. Identification of self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis. *Theor. Appl. Genet* 102: 700-708.
- Wünsch A. and Hormaza J.I. 2002a. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica* 125: 59-67.
- Wünsch A. and Hormaza J.I. 2002b. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity* 89: 56-63.
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T. et al. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet* 102: 865-870.
- Yamane H., Tao R., Murayama H. and Sugiyama A. 2000. Determining the S-genotypes of several sweet cherry cultivars based on PCR-RFLP analysis. *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 562-567.
- Zohary D. and Hopf M. 1988. *Domestication of plants in the Old World*. Oxford University Press, Oxford.

ANEXO 11

Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers.

Euphytica, 2002, 125:59-67.



Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers

A. Wünsch & J.I. Hormaza*

Unidad de Fruticultura, S.I.A. -D.G.A. Campus de Aula Dei, Apdo 727. 50080 Zaragoza, Spain. * Current address. Estación Experimental la Mayora CSIC, 29750 Algarrobo-Costa Málaga, Spain e-mail: thormaza@eelm.csic.es

Received 12 July 2000; accepted 5 August 2001

Key words: cultivar identification, DNA fingerprinting, fruit trees, molecular markers

Summary

In recent years we have witnessed critical advances in the applications of molecular markers for genetic fingerprinting in cultivated plants. Their advantages have been widely recognised but they are even more important in woody perennials due to some particularities of these species such as their long generation time, their large individual size and their vegetative propagation. In this review, the information so far published in molecular fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers is analysed with the goal of obtaining a common ground that will allow an easier and faster genetic identification that, at the same time, has to be reproducible among laboratories.

Introduction

The production of certified plant material in fruit and nut tree species requires the application of fast and reliable techniques to identify both old and new genotypes. Traditional methods to identify cultivars and rootstocks are based on phenotypic observations; however, this is a slow process due to the long juvenile period of the trees and it is subjected to environmental influences. The incorporation of new methodologies into fruit certification schemes will accelerate and optimise the identification process, by allowing the fingerprinting of each genotype at any stage of development and independently of environmental factors that may influence the phenotype. Furthermore, since most temperate fruit tree species are vegetatively propagated, the identification of genotypes allows a standardizable reference for the identification of any cultivar and to control its propagation.

During the last ten years we have witnessed fast and important advances in the methods used to analyse and study nucleic acids in both animals and plants. These studies have resulted in the development of different kinds of DNA markers that have been successfully applied in plant and fruit tree breeding. Among other applications, DNA markers are a useful tool for

selection and gene introgression when they are linked to genes of interest (Hormaza et al., 1994a; Durman & Korban, 1994) for the construction of genetic maps (Rajapakse et al., 1995), and for the identification of cultivars and the study of the similarity and the genetic distance among them (Duneman, 1994).

Almost any kind of DNA markers can be used for fingerprinting fruit tree species. The most widely used have been RAPDs, RFLPs, AFLPs and, more recently, SSRs and ISSRs. In this paper, we review the work carried out using different molecular marker approaches for the genetic fingerprinting of the main temperate fruit tree species, including pome and stone fruits, olive and nuts, and analyse the advantages and disadvantages of the different methods.

RFLPs: Restriction Fragment Length Polymorphisms

RFLPs are DNA fragments obtained from a DNA digestion step followed by a hybridisation step, thus resulting in a specific DNA-restriction enzyme-probe pattern. Following their initial use in human genome studies in the late 70's (Botstein et al., 1980), RFLPs have been widely used in plant breeding and finger-

printing (Tanksley et al. 1989; De Vicente et al. 1998)

Pome fruits

Initial work with RFLP markers to detect cultivar variation among apple (*Malus × domestica* Borkh.) cultivars and clones was carried out using a cDNA library of the micropropagated cultivar McIntosh 'Wijcik' (Watillon et al., 1991). A selected probe revealed enough polymorphism to distinguish among ten apple cultivars and six rootstocks and it was possible to identify closely related cultivars as 'Golden' and 'Jonagold' but as expected, not the monogenic mutant 'Jonagored' developed from 'Jonagold'. Chloroplast and mitochondrial DNA probes have also been used for RFLP analysis. Thus, Ishikawa et al. (1992) used this technique to analyse eighteen apple cultivars and three rootstocks and observed three different cytoplasmic groups that could imply different genetic origins. On the other hand Nybom et al. (1990) used the minisatellite probe M13 for DNA fingerprinting in several Rosaceae species. They were able to differentiate the four apple cultivars included in the study with any one of the restriction enzymes used and they detected intracultivar variation in one of them ('Rome Beauty'). However in a later work (Nybom, 1990), the same approach did not allow to differentiate among fifteen different sports of the apple cultivar 'Red Delicious'.

Stone fruits

Within the stone fruits, the minisatellite probe M13 in combination with four restriction enzymes (Nybom et al. 1990), was used to differentiate four genotypes of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). Later, 34 peach (*Prunus persica* L.) cultivars were identified with just nine RFLP fragments from six selected genomic clones that were used as probes (Rajapakse et al., 1995). Similarly 45 different phenotypes from 52 apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars (De Vicente et al. 1998) were identified using 31 selected probes developed in almond (*P. amygdalus* Batsch). The similarity matrix obtained from the molecular data was used to construct a dendrogram that separated the Spanish apricot cultivars from those from Europe and North America.

Other species

In olive (*Olea europaea* L.), RFLPs have also been used to identify five types of chloroplast-DNA patterns

in cultivars, old local trees and oleasters (wild olives) from the Mediterranean basin (Amane et al., 1999). The study concluded that one type of chloroplast is mainly found in oleasters and cultivated trees, three are exclusive of oleasters and a fifth is found in both cultivated and oleasters. In walnut, RFLP markers were used to identify and estimate the genetic relationships among 48 accessions of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) of different geographical sources grouping the genotypes studied into two main groups according to their origin (Fjellstrom et al., 1994).

Although RFLPs are a strong tool for many plant breeding applications, the main limitation for their utilisation in the identification of genotypes in plants lies in the low relation between the degree of polymorphism generated and the complexity of their use. As a consequence, new strategies mainly based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) have been used to obtain molecular markers useful in genetic fingerprinting. Among these, RAPDs and microsatellites have been the preferred markers for fingerprinting fruit and nut tree species.

RAPDs: Randomly Amplified Polymorphic DNA

RAPDs are fragments of genomic DNA amplified through PCR using a decamer primer of random sequence, where polymorphism depends upon the presence or absence of an amplification product. The use of RAPDs in different organisms began in the late 80s (Williams et al. 1990), and due to their simplicity and speed they have become a very valuable tool for cultivar identification and genetic similarity studies in plants. RAPD markers have been used by several laboratories to identify genotypes of different temperate fruit tree species.

Pome fruits

Various examples of the application of RAPDs for fingerprinting and analysis of genetic similarities are available in apple. Thus, Koller et al. (1993) could differentiate eleven cultivars using just two primers. Mulcahy et al. (1993) were able to characterise twenty-five apple accessions representing eight cultivars again with two primers and Tancred et al. (1994) used a single primer to differentiate a new apple genotype from three similar commercial cultivars. Duneman (1994) used RAPD markers to differentiate and study the similarity of 27 apple cultivars and 18 accessions

of different *Malus* species and the results obtained agreed with their known pedigree or phylogenetic information. Similarly, Landry et al. (1994) fingerprinted eight apple rootstocks and the lines derived from them and confirmed the known genetic relationships among them. Although new molecular markers are currently available, RAPD markers are still being used for fingerprinting apple genotypes; thus, Autio et al. (1998) identified 15 rootstocks with just two primers and Oraguzie et al. (2001) have recently identified 155 genotypes representing new and old cultivars with 9 primers.

Contrasting to the work carried out in apple, molecular studies in pear have only recently been initiated. Thus, characterisation of the genus *Pyrus* has been carried out with RAPDs by Oliveira et al. (1999), that fingerprinted and calculated genetic relationships among nine pear (*P. communis* L.) cultivars and 3 wild *Pyrus* species. More recently, Monte-Corvo et al. (2000) also used RAPD markers to fingerprint and study the genetic similarities among 25 common and 4 Japanese pear [*Pyrus pyrifolia* (Buim.) Nak.] cultivars.

Stone fruits

RAPDs have been used extensively to fingerprint genotypes of the most agronomically interesting *Prunus* species such as peach, almond, plum, cherry or apricot.

In peach, Warburton & Bliss (1996) analysed with RAPDs a set of 136 cultivars from different geographical origins. The genotypes clustered into twelve main groups. Nine of these clusters comprised the Asian cultivars while the European and American cultivars were grouped in three clusters revealing less genetic diversity. Lu et al. (1996) were able to distinguish among eighteen peach rootstocks with RAPDs, obtaining genetic similarity relations that agreed with their putative pedigree. In this sense, genetic diversity of forty-one *Prunus* rootstocks involving different species and interspecific hybrids was analysed with RAPDs by Casas et al. (1999), distinguishing three main clusters in agreement with previously defined groups.

Bartolozzi et al. (1998) studied the genetic relatedness and possible origins of seventeen California almond varieties using 20 RAPD primers, and they were able to distinguish all the cultivars from each other, except the bud sports mutations, and clustered the genotypes in three groups according to their pedigree.

Ortiz et al. (1997) were able to differentiate among twenty-eight hexaploid and three diploid plum cultivars of different geographical origins with the amplification fragments obtained with three primers, showing a clear separation between the diploid and hexaploid genotypes and a good correlation with their known pedigree. Similarly, Shimada et al. (1999) were able to discriminate among 42 plum cultivars of different ploidy levels with 20 RAPD markers establishing two major clusters (European and Japanese) with good correlation with previous classifications.

In sweet cherry (*P. avium* L.), molecular characterisation of a set of eighteen cultivars with RAPD markers was carried out by Gerlach & Stösser (1997). They were able to distinguish sixteen of the cultivars with twenty-three RAPD primers but as expected they found no differences among sports.

Shimada et al. (1994) studied the genetic relationships among 54 Japanese apricot (*P. mume* Sieb. et Zucc.) cultivars with 95 RAPD primers and classified them in seven groups that reflected their origin. Later, Takeda et al. (1998) investigated the relationships between thirty-three apricot cultivars and two related species (*P. sibirica* L. and *P. brigantina* Vill.) with 18 RAPD primers, clustering the genotypes into two main groups, cultivars originated in the East (eastern China and Japan) and cultivars from the West (Europe, Central Asia and Western China).

Olive

Initial RAPDs studies in olive involved the analysis of a group of seventeen olive cultivars from different origins by Fabbri et al. (1995) with seventeen RAPD primers. The resulting dendrogram clustered the cultivars according to their fruit size-oil content, but not in agreement with their geographic origin. Similar studies have been carried out using RAPD markers in several sets of olive cultivars from the Mediterranean Basin. Thus, different accessions of six olive cultivars commonly cultivated in Israel and the West Bank were also fingerprinted with RAPDs by Wiesman et al. (1998). Fourteen primers were needed to conclude that the 'Nabali' group contains genetically different genotypes. On the other hand the four 'Souri' variants showed to be genetically identical. The fingerprinting analysis with RAPDs showed a high genetic diversity among the most common cultivated varieties in the area. Mekuria et al. (1999) investigated the genetic variability of twenty-two accessions of three common cultivars ('Manzanillo',

Kalamata' and 'Verdale'), and seventeen accessions of other eight cultivars that are thought to include synonyms or homonyms. Six primers were used to differentiate among the accessions. A high degree of genetic variability was found among the 'Verdale' accessions while little or no variation at all was detected among the 'Manzanillo', 'Kalamata', 'Nevadillo' and 'Picual' accessions. Twenty-two Spanish olive accessions collected in areas geographically proximal, were identified with RAPD markers by Claros et al. (2000). Similarly, Besnard et al. (2001) distinguished 102 olive cultivars with 45 markers that grouped them according to their geographic origin and to their specific use. Belaj et al. (2001) identified 51 olive accessions obtained in diverse countries with 46 RAPD primers, obtaining a good correlation between similarity results and geographical origin. Finally, Sanz-Cortes et al. (2001) were able to identify 40 olive cultivars with 34 RAPD bands also finding a good correlation of the similarity data with their geographic origin.

Nuts

Initial work on molecular identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) was carried out by Hormaza et al. (1994b) and Dollo et al. (1995). They examined fifteen pistachio cultivars with fourteen RAPD primers and clustered them according to their geographical origin distinguishing two major clusters: one comprising cultivars originated in the Mediterranean countries and the other from Iran and the Caspian Sea. In a latter experiment (Hormaza et al., 1998), the number of genotypes closer to the centre of origin analysed by RAPDs was increased, and the results agreed with earlier results since most of the new genotypes fell into the Iranian-Caspian cluster.

Nicese et al. (1998) characterised with eighteen RAPD primers a group of nineteen walnut genotypes that included closely related released cultivars and parents of breeding programs; the cluster analysis separated the genotypes into two groups based in the similarity with their ancestors.

Molecular fingerprinting of clones of sixteen sweet or European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) commercial cultivars from the south of Italy was also carried out with RAPD markers (Galderisi et al., 1998). All the cultivars could be distinguished with the amplification pattern of nineteen primers and some mislabelled clones were uncovered. Oraguzie et al. (1998) compared morphological and RAPD markers of eighteen New Zealand chestnut accessions in an attempt

to establish phylogenetic relationships and origin of the genotypes. The results obtained with 10 primers showed to be efficient in grouping the selections according to their geographic origin and to clear some hypothesis about the origin of the accessions.

All these results point out that RAPD markers can be successfully used to establish identification programs for a specific laboratory, but it is difficult to compare or reproduce results among different laboratories. Due to the short length of RAPD primers (10 bp), there can be many complementary sites in the genome, and consequently, the amplification pattern obtained may vary among different assays with the same material (Jones et al., 1997). An alternative technique to generate more reproducible markers from RAPD data could be the use of Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs) (Paran & Michelmore, 1991). SCAR markers are obtained from a PCR reaction using longer primers synthesised after the sequencing of selected RAPD amplification fragments, resulting in a more restrictive and robust assay. This technique has been successfully applied for rootstock identification in *Vitis* (Xu & Bakalinsky, 1996) and cultivar identification in raspberry (*Rubus idaeus* L.) (Parent & Pagé, 1998).

AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphisms

Other kind of DNA markers used to a lesser extent in the identification of temperate fruit trees are AFLPs (Vos et al., 1995). These markers combine RFLP and PCR techniques as they are specific PCR amplified fragments of restriction digests. Their use is more complex than that of RAPDs or SSRs since there are several steps involved besides PCR amplification and marker analysis. They require a genomic restriction digestion, ligation of adapters to the restriction ends and the use of primers that contain the adapter sequence, the enzyme target sequence and selective nucleotides. Although AFLPs are also dominant markers they reveal a high level of polymorphism and a great amount of markers per assay resulting in a very high discrimination power for germplasm analysis.

Anglioli et al. (1999) used AFLP markers to establish genetic relationships in the genus *Olea* by comparing 43 olive cultivars, 30 wild olives and 9 *Olea* species. Five primer combinations produced 121 polymorphic AFLP markers that allowed the genetic analysis of the genotypes. Twenty-five common and

4 Japanese pear cultivars were also analysed with AFLPs by Monte-Corvo et al. (2000) that also studied the genetic similarities among the genotypes studied. They obtained similar results using AFLPs and RAPDs. Recently, Goulao et al. (2001) analysed 24 diploid and 4 hexaploid plum cultivars with AFLPs clearly separating both groups.

Despite the numerous reports on the application of AFLPs for fingerprinting purposes in annual plants, their use in identification of temperate fruit tree genotypes has been scarce, probably due to the availability of other approaches such as microsatellites that are easier to handle.

Microsatellites or SSRs: Simple Sequence Repeats

Besides the development of RAPDs and AFLP markers, newer PCR-based techniques are being increasingly used for fingerprinting purposes. Microsatellite markers or SSRs (Litt & Luly, 1989) are currently becoming the preferred technique for the molecular characterisation of different plant species (Gupta & Varshney, 2000). The presence in the eukaryotic genomes of sequences of repetitive DNA, flanked by specific regions, allows their amplification when the flanking sequences are used as primers in PCR. The polymorphism reflects changes in the number of repeats in each genotype. When there is not enough sequence data available, the process to identify, clone and sequence the flanking regions is cumbersome as it requires the construction and screening of genomic libraries. However, new alternatives are available to avoid the process of library construction and screening. One can be the RAHM (Random Amplified Hybridization Microsatellites) technique (Cifarelli et al., 1995) that hybridises repetitive sequences directly onto RAPD bands. Another alternative is based on recent results that demonstrate that flanking sequences can be transported among related species and genera (Cipriani et al., 1999; Di Gaspero et al., 2000; Hormaza, 2002; Huang et al., 1998; Sosinski et al., 2000; Yamamoto et al., 2001) opening the possibility of using sequences already isolated in a different species for identification purposes.

A variation on SSRs are ISSRs or Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz et al., 1994). In this system microsatellites are targeted to take advantage of their abundance but without the need of prior sequence knowledge to design the primers. ISSRs are obtained through the amplification of DNA found

between microsatellites, by priming the PCR reaction with a repetitive sequence anchored by arbitrary or degenerate nucleotides. As a result, a large number of bands useful for fingerprinting purposes are obtained.

Pome fruits

Isolation and sequencing of microsatellite flanking sequences in the apple genome have been carried out by several laboratories and the obtained polymorphic loci have been used efficiently to determine the identity of various cultivars. Thus, twenty-eight microsatellite primer sequences were obtained from a genomic library of the cultivar 'Royal Gala' enriched with (GA) repeats (Guilford et al., 1997). With fourteen selected pairs of primers, polymorphic loci were observed in most of the twenty-one cultivars analysed, and Mendelian inheritance of those markers was confirmed in the progeny of a cross between 'Royal Gala' and clone A-172-2. Similarly, from an enriched library of the apple cultivar 'Florina', Gianfranceschi et al. (1998) developed sixteen microsatellite primers that were used for the identification of nineteen apple cultivars. Again two cultivars that differ in a few colour mutations ('Starking' and 'Red Delicious') could not be differentiated but it was possible to identify the triploid cultivars due to the presence of three alleles. Hokanson et al. (1998) used eight microsatellite markers developed in the cultivar 'Golden Delicious' to characterise sixty-six apple accessions. Through this screening they were able to determine the genetic diversity among the accessions, although seven pairs of accessions could not be differentiated due to being sport mutations or closely related genotypes. Similarity analysis clustered the accessions in agreement with their putative pedigree. In a recent work (Hokanson et al., 2001) analysed 142 accessions of 23 *Malus* species, hybrids and cultivars with the eight previously developed SSR primers. This set of primers was enough to distinguish all but five pairs of genotypes that were thought to be different, and revealed a high level of variation.

Although molecular studies in pear are scarce, SSRs developed in apple can be useful for pear fingerprinting. Thus Yamamoto et al. (2001) have used that approach to identify 36 pear accessions that included both Japanese pears (*P. pyrifolia*), Chinese pears (*P. bretschneideri* Rehder and *P. ussuriensis* Maxim.), European pears (*P. communis*), a wild species (*P. calleryana* Decne.) and interspecific hybrids

All the genotypes studied except mutants could be distinguished.

Stone fruits

Most SSR sequences in stone fruit species have been developed in peach. Cipriani et al. (1999) cloned and sequenced seventeen microsatellite primer pairs from the cultivar 'Redheaven'; fifteen of those were polymorphic and useful to identify ten peach genotypes and their Mendelian inheritance was demonstrated through analysis of a segregating backcross population. Testolin et al. (2000) used a set of twenty-six microsatellite sequences, including those published by Cipriani et al. (1999), to analyse 50 cultivars. Similarly to other molecular fingerprinting studies, the sport mutants could not be differentiated from the original genotypes. Another set of ten peach microsatellite loci have been reported by Sosinski et al. (2000), who screened 28 peach cultivars.

Microsatellite primer pairs developed mainly in peach have been used for fingerprinting other *Prunus* species. Thus, Downey and Iezzoni (2000) used one primer pair developed in sweet cherry, and 2 developed in sour cherry and peach to fingerprint 66 black cherry (*Prunus serotina*) genotypes; Cantini et al. (2001) used 10 primer pairs from peach sweet and sour cherry to identify 59 tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.) genotypes; Hormaza (2002) identified 48 apricot genotypes with 20 primers pairs from peach grouping the cultivars according to their geographical origin and/or known pedigree information; similarly, Wünsch & Hormaza (submitted) have used nine peach primer pairs to fingerprint 76 sweet cherry genotypes grouping them according to their origin.

Regarding ISSRs, Goulao et al. (2001) have compared the results obtained analysing 24 diploid and 4 hexaploid plum cultivars with AFLPs and ISSRs. All the genotypes could be identified and the genotypes separated into two groups according to their ploidy. They reported higher reproducibility for ISSRs than for AFLPs.

Olive

Thirteen microsatellite loci have been identified in olive from a genomic enriched library of the cultivar 'Arbequina' (Rallo et al., 2000). This set of SSR primers were used to screen a set of 46 olive cultivars, five of them revealed polymorphic patterns of the expected size, and were useful to differentiate 95% of the genotypes analysed. A segregating population of

96 genotypes from the cross of 'Leccino' and 'Dolce Agogia' was also screened and Mendelian segregation was confirmed for those loci that were polymorphic between the parental genotypes.

Conclusions

The different works reviewed in this paper reveal that the studies to identify temperate fruit tree species with different molecular DNA markers, have succeeded in distinguishing among accessions, clarifying synonyms, identifying mislabelled cultivars, establishing genetic similarities or geographical origins and giving hints about the process of domestication. In fact, molecular identification is especially useful in fruit tree species, generally characterised by a high level of polymorphism among cultivars and no variation within cultivars due to vegetative propagation. DNA fingerprinting is even more important in the case of rootstocks since often there are little morphological differences among them, and once they have been grafted their identification results extremely difficult.

However, most of the results reported deal with research carried out in unrelated laboratories and the cultivars studied vary among the different experiments, a situation that makes difficult the comparison of results among laboratories or among the different approaches used. Therefore, it is becoming necessary the establishment of standard protocols for molecular identification of these species; in fact this standardisation is indispensable in order to be used in any official certification system.

Each type of marker system has advantages and disadvantages and it is necessary to evaluate the usefulness of each marker before its application. Among the DNA markers developed in the last two decades, probably microsatellites are currently the marker of choice for fingerprinting purposes in fruit tree species. One of the advantages is the high level of polymorphism they reveal due to the high mutation rates associated to the repetitive sequences. Another advantage is the fact that they are mostly codominant markers which allows to distinguish between heterozygous and homozygous individuals, at the same time they are inherited in a Mendelian fashion which permits to carry out paternity analyses. Furthermore the high reproducibility of microsatellites compared to other markers (McGregor et al., 2000) allows confident exchange and standardisation of protocols among laboratories. The main disadvantage of microsatellite

markers is the large amount of effort that has to be dedicated to isolate them. Nevertheless the possibility to transport microsatellite loci among species and genera, makes a whole set of isolated microsatellites readily available for germplasm characterisation. In the case of fruit tree species, microsatellites developed in apple and peach can be useful for other pome and stone species respectively. None of the other kind of currently widespread markers used for fingerprinting purposes (RAPDs, RFLPs, ISSRs or AFLPs) meet those advantages at the same level than microsatellites.

New DNA technologies are constantly being developed in human genomic research. Among those, SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) (Wang et al., 1998) seem to be of growing interest due to their high frequency. Although SNPs are just beginning to be used in plants (Coryell et al., 1999) and their application into fruit breeding schemes will not take place immediately, fruit tree identification will surely benefit from them in the future.

On the other hand, we have always to keep in mind that in several fruit species, such as apple, some of the main commercial cultivars are somatic mutations of different traits, 'sports', that constitute an improvement over the original genotype. However, since most 'sports' are single or few gene mutations, the original and the derived cultivar are identical at the genetic level except for the mutation responsible for the difference. As evidenced in some of the works described here the distinction between the original and the derived genotype is difficult using just the currently implemented molecular approaches. However, since most of these mutations are identifiable phenotypically (fruit colour, fruit shape, tree size, tree shape, branching habit, etc.), phenotypic observations must still complement the results obtained using molecular markers to identify clones that differ in one or few genes at least until new molecular methods become available. In fact, molecular identification is just another tool that will be added to the battery of approaches used to identify fruit tree cultivars and rootstocks and both phenotypic and genotypic observations must be mutually complementary for cultivar fingerprinting.

Acknowledgements

We gratefully thank M. Herrero for her helpful comments on the manuscript. A.W. was supported by a

SIA fellowship and financial support for this work was provided by INIA (project grant SC00-19).

References

- Amare, M., R. Lumaret, V. Hany, N. Ouazzani, C. Debain, G. Vivier & M.F. Deguilloux, 1999. Chloroplast-DNA variation in cultivated and wild olive (*Olea europaea* L.). *Theor Appl Genet* 99: 133-139.
- Angiolillo, A., M. Mencuccini & L. Baldoni, 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet* 98: 411-421.
- Autio, W.R., J.R. Schupp, D.C. Ferree, R. Glavin & D.I. Mulcahy, 1998. Application of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks. *HortScience* 33: 333-335.
- Bartolozzi, F., M.L. Warburton, S. Arulsekar & I.M. Gradziel, 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J Am Soc Hort Sci* 123: 381-387.
- Belaj, A., I. Trujillo, R. De la Rosa, L. Raño & M.J. Gimenez, 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *J Am Soc Hort Sci* 126: 64-71.
- Besnard, G., P. Baradat & A. Berville, 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor Appl Genet* 102: 251-258.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick & R.W. Davis, 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet* 32: 314-330.
- Cantini, C., A.F. Iezzoni, W.F. Lamboy, M. Boritzki & D. Struss, 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using Simple Sequence Repeats. *J Amer Soc Hort Sci* 126: 205-209.
- Casas, A.M., E. Igartua, G. Balaguer & M.A. Moreno, 1999. Genetic diversity of *Prunus* rootstocks analyzed by RAPD markers. *Euphytica* 110: 139-149.
- Claros, M.G., R. Crespillo, M.L. Aguilar & F.M. Canovas, 2001. DNA fingerprinting and classification of geographical related genotypes of olive tree (*Olea europaea* L.). *Euphytica* 116: 131-142.
- Cifarelli, R.A., M. Gallitelli & F. Cellini, 1995. Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucl Acids Res* 23: 3802-3803.
- Cipriani, G., G. Lot, W.-G. Huang, M.I. Marrazo, E. Peterlunger & R. Testolin, 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* 99: 65-72.
- Coryell, V.H., H. Jenssen, J.M. Schupp, D. Webb & P. Keim, 1999. Allele specific hybridization markers for soybean. *Theor Appl Genet* 98: 690-696.
- De Vicente, M., M.J. Truco, J. Egea, L. Burgos & P. Aris, 1998. RFLP variability in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Breeding* 117: 153-158.
- Di Gasparo, G., E. Peterlunger, R. Testolin, K.J. Edwards & G. Cipriani, 2000. Conservation of microsatellite loci within the genus *Vitis*. *Theor Appl Genet* 101: 301-308.
- Dollo, L., J.I. Hormaza & V.S. Polito, 1995. RAPD polymorphisms among pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. *Fruit Varieties J* 49: 147-152.

- Downey S & A. Jezzoni, 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry peach and sour cherry J Am Soc Hort Sci 125: 76-80.
- Duneman, F. 1994. Molecular classification of *Malus* with RAPD markers. In: H. Schmidt & M. Kellerhals (Eds.) Progress in Temperate Fruit Breeding pp. 295-300. Kluwer Academic Publishers Dordrecht
- Durman, R.E. & S.S. Korban, 1994. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. Euphytica 79: 109-114.
- Fabbri, A., J.I. Hormaza & V.S. Polito, 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars J Am Soc Hort Sci 120: 538-542.
- Fjellstrom, R.G. D.E. Parfitt & G.H. McGranahan, 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). J Am Soc Hort Sci 119: 833-839.
- Galderisi, U., M. Cipollaro, G. Di Bernardo, L. De Masi, G. Galano & A. Cascin, 1998. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis J Hort Sci Biotech 73: 259-263.
- Gerlach, H.K. & R. Stösser, 1997. Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. Angewandte Botanik 71: 212-218.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc & C. Gessler, 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. Theor Appl Genet 96: 1069-1076.
- Goulao, L., L. Monte-Corvo, C.M. Oliveira, 2001. Phenetic characterization of plum cultivars by high multiplex ratio markers: Amplified fragment length polymorphisms and inter-simple sequence repeats J Am Soc Hort Sci 126: 72-77.
- Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu., E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett & R. Forster, 1997. Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor Appl Genet 94: 249-254.
- Gupta, P.K. & R.K. Varshney, 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica 113: 163-185.
- Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McPadden, W.F. Lamboy & J.R. McFerson, 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh core subset collection. Theor Appl Genet 97: 671-683.
- Hokanson, S.C., W.F. Lamboy, A.K. Szewc-McPadden & J.R. McFerson, 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* (apple) species and hybrids. Euphytica 118: 281-294.
- Hormaza, J.I. 2002. Molecular characterisation and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using Simple Sequence Repeats. Theor Appl Genet 104: 321-328.
- Hormaza, J.I., L. Dollo & V.S. Polito, 1994a. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulk segregant analysis. Theor Appl Genet 89: 9-13.
- Hormaza, J.I., L. Dollo & V.S. Polito, 1994b. Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* (pistachio: Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Econ Bot 48: 349-358.
- Hormaza, J.I., K. Pinney & V.S. Polito, 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera* Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Econ Bot 52: 78-87.
- Huang, W-G, G. Cipriani, M. Morgante & R. Testolin, 1998. Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterisation, and homology in related species. Theor Appl Genet 97: 1269-1278.
- Ishikawa, S., S. Kato, S. Imakawa, T. Mikami & Y. Shimamoto, 1992. Organelle polymorphism in apple cultivars and rootstocks. Theor Appl Genet 83: 963-967.
- Jones C J., K.J. Edwards, S. Castaglione, M.O. Windfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevschii, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez & A. Karp, 1997. Reproducibility testing of RAPD AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol Breeding 3: 381-390.
- Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott & C. Gessler, 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor Appl Genet 85: 901-904.
- Landry, B.S., R.Q. Li, W.Y. Cheung & R.L. Granger, 1994. Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical gene tagging. Theor Appl Genet 89: 847-852.
- Litt, M. & J.A. Luly, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44: 397-401.
- Lu Z-X, G.L. Reighard, W.V. Baird, A.G. Abbott & S. Rajapakse, 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortScience 31: 127-129.
- McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw & L. Warnich, 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica 113: 135-144.
- Mekuria, G.T., G.G. Collins & M. Sedgley, 1999. Genetic variability between different accessions of some common commercial olive cultivars. J Hort Sci Biotech 74: 309-314.
- Monte-Corvo, L., L. Cabrita, C. Oliveira & J. Leitao, 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. Genet Resour Crop Ev 47: 257-265.
- Mulcahy D.L., M. Cresti, M., S. Sansavini, G.C. Douglas, H.F. Linskens, G. Bergamini, Mulcahy R. Vignani & M. Pancaldi, 1993. The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. Sci Hortic 54: 89-96.
- Nicese, F.P., J.I. Hormaza & G.H. McGranahan, 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101: 199-206.
- Nybohm, H., 1990. DNA fingerprints in sports of Red Delicious apples. HortScience 25: 1641-1642.
- Nybohm, H., S.H. Rogstad & B.A. Schaal, 1990. Genetic variation detected by use of the M13 DNA fingerprint probe in *Malus Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). Theor Appl Genet 79: 153-156.
- Oliveira, C.M., M. Mota, L. Monte-Corvo, L. Goulao & D.M. Silva, 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Sci Hort 79: 163-174.
- Oraguzie, N.C., D.L. McNeil, A.M. Paterson & H. Chapman, 1998. Comparison of RAPD and morpho-nut markers for revealing genetic relationships between chestnut species (*Castanea* spp.) and New Zealand chestnut selections. New Zeal J Crop Hort Sci 26: 109-115.
- Oraguzie, N.C., S.E. Gardiner, H.C.M. Heather, M. Stefanati, R.D. Ball, V.G.M. Vincent & A.G. White, 2001. Genetic diversity and relationships in *Malus* sp. germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. J Amer Soc Hort Sci 126: 318-328.
- Ortiz, A., R. Renaud, I. Calzada & E. Ritter, 1997. Analysis of plum cultivars with RAPD markers. J Hort Sci 72: 1-9.
- Paran, I. & R.W. Michelmore, 1991. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. P Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832.
- Parent, J.G. & D. Pagé, 1998. Identification of raspberry cultivars by sequence characterised amplified region DNA analysis. HortScience 33: 140-142.
- Rajapakse, S., L.E. Belthoff, G. He, A.E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet & A.G. Abbott, 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological RFLP and RAPD markers. Theor Appl Genet 90: 503-510.
- Rallo, P., G. Dorado & A. Martín, 2000. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). Theor Appl Genet 101: 984-989.
- Sanz-Cortes, F., M.L. Badenes, S. Paz, A. Iniguez & G. Llacer, 2001. Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. J Am Soc Hort Sci 126: 7-12.
- Shimada T., T. Haji, M. Yamaguchi, T. Takeda, K. Nomura & M. Yoshida, 1994. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. J Jpn Soc Hort Sci 63: 543-551.
- Shimada T., H. Hayama, T. Haji, M. Yamaguchi & M. Yoshida, 1999. Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA analysis. Euphytica 109: 143-147.
- Sosinski, B., M. Gannavarapu, L.D. Hager, I.E. Beck, G.J. King, C.D. Ryder, S. Rajapakse, W.V. Baird, R.E. Ballard & A.G. Abbott, 2000. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). Theor Appl Genet 101: 421-428.
- Takeda T., T. Shimada, K. Nomura, T. Ozaki, T. Haji, M. Yamaguchi & M. Yoshida, 1998. Classification of apricot varieties by RAPD analysis. J Jpn Soc Hort Sci 67: 21-27.
- Tancred, S.J., A.G. Zeppa & G.C. Graham, 1994. The use of the PCR-RAPD technique in improving the plant variety rights description of a new Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar. Aust J Exp Agr 34: 665-667.
- Tanksley S.D., N.D. Young, A.H. Paterson & M.W. Bonierbale, 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Biotechnology 7: 257-264.
- Testolin, R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M.I. Dettori, M. Pancaldi & S. Sansavini, 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome 43: 512-520.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, I. van de Lee, M. Homes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res 23: 4407-4414.
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapoisky, R. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, I. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubell, E. Robinson, M. Mittman, M.S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T.J. Hudson, R. Lopshutz, M. Chee & E.S. Lander, 1998. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. Science 280: 1077-1082.
- Warburton, M.L. & F.A. Bliss, 1996. Genetic Diversity in peach (*Prunus persica* L. Batsch) revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and compared to inbreeding coefficients. J Am Soc Hort Sci 12: 1012-1019.
- Watillon, B., P. Druart, P. Du Jardin, R. Kettmann, P. Boxus & A. Burny, 1991. Use of random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. Sci Hort 46: 235-243.
- Wiesman, Z., N. Avidan, S. Lavee & B. Quebedeaux, 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the west bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. J Am Soc Hort Sci 123: 837-841.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6531-6535.
- Xu, H. & A.I. Bakalinsky, 1996. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. HortScience 31: 267-268.
- Yamamoto T., T. Kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi & N. Matsuta, 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor Appl Genet 102: 865-870.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. Genomics 20: 176-183.