

# MARCADORES MOLECULARES EN GENÉTICA Y MEJORA DE ESPECIES FRUTALES DEL GÉNERO *PRUNUS*

P. Arús, M.C. de Vicente, M.J. Truco, J. Ballester, T. Joobeur y B. Jáuregui  
IRTA. Departament de Genètica Vegetal

## 1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de marcadores moleculares en frutales, así como en la mayoría de especies leñosas, empezó aproximadamente una década más tarde que en los cultivos herbáceos. Las primeras publicaciones sobre isoenzimas en plantas se produjeron al final de los años sesenta, mientras que el trabajo pionero en *Prunus* de Parfitt y colaboradores no se produjo hasta 1985. El primer mapa de RFLPs en plantas fue construido en tomate (Bernatzky y Tanksley, 1986), y el del melocotonero no se publicó hasta 1995 por Rajapakse y colaboradores. En el caso de las isoenzimas, este retraso se debe a que no fue posible obtener buenos resultados hasta que se hallaron métodos eficientes para la extracción de enzimas (Arulsekar y Parfitt, 1986). Para los RFLPs, la complejidad y alto coste de la técnica determinaron que los recursos necesarios se dedicaran antes a otras especies modelo como algunas solanáceas y cereales. En cambio, los marcadores descubiertos dentro de esta década, como los RAPDs y AFLPs, se han usado en *Prunus* (Gregor et al., 1994, Whetten y Dale, 1996) muy poco después. El reconocimiento generalizado de que los marcadores eran útiles en genética y mejora, que ha determinado un aumento considerable de la actividad en este área en los últimos años, es la causa más probable de que se haya acelerado su aplicación en estas especies.

Las características diferenciales de los cultivos leñosos, como la larga duración del período intergeneracional, el tamaño de la planta o la estacionalidad en la producción de flores, frutos u hojas, hace que la selección con marcadores moleculares sea particularmente interesante para la mejora de este grupo de especies, al permitir un ahorro de tiempo, espacio y personal muy superior al que se puede conseguir en los cultivos herbáceos.

## 2. ISOENZIMAS

La aplicación inicial de los polimorfismos isoenzimáticos fue en la identificación de genotipos. Con el uso de extractos de hoja de plántulas de la descendencia de varios cruzamientos interespecíficos, se pudieron distinguir rápidamente los híbridos verdaderos de los que no lo eran (Parfitt et al., 1985, Chaparro et al., 1987). Los isoenzimas también se usaron para la identificación de cultivares de almendro (Cerezo et al., 1989), melocotonero (Messeguer et al., 1987), cerezo (Granger, 1993), ciruelo (Byrne y Littleton, 1989), y albaricoquero (Battistini y Sansavini, 1991), proporcionando un método adicional para la protección de los derechos de obtentor, o para el control de calidad (identidad) varietal para los viveristas.

El estudio del genotipo isoenzimático de grupos de cultivares de varias especies de *Prunus* y el conocimiento de la herencia de los isoenzimas polimórficos permitió el análisis comparativo de la variación genética dentro y entre especies (Byrne, 1990). Tal como se ha encontrado en otros casos, existe en frutales una correlación entre el sistema de cruzamiento y el nivel de variabilidad, siendo este alto en las especies con sistemas de autoincompatibilidad (almendro, cerezo y ciruelo), bajo en las autocompatibles (melocotón), e intermedio en el albaricoquero especie en la que hay muchos cultivares autocompatibles. Por otra parte, la distribución de las frecuencias genotípicas en los cultivares analizados de almendro y melocotonero eran similares a las esperadas en una situación de panmixia (Arulsekhar et al., 1986).

Los isoenzimas se han aplicado al estudio del movimiento del polen en condiciones agrícolas con el objetivo de determinar la proporción de alogamia en melocotonero (Miller et al., 1989), y la migración del polen en una plantación comercial de almendro (Jackson y Clarke, 1991). Estos marcadores son ideales para el análisis genético en especies poliploides, y fueron usados por Beaver y Jezzoni (1993) para confirmar la hipótesis de un origen alotetraploide del cerezo tetraploide, usando para ello la segregación de siete genes isoenzimáticos.

## 3. MARCADORES DE ADN

Los marcadores de ADN son mucho más efectivos que los isoenzimas para la caracterización del genomio y para el etiquetado de genes, ya que resuelven el problema de la limitación del número de marcadores asociada a estos (raramente se han descrito más de 10-20 isoenzimas polimórficos en una especie determinada). Los métodos para la detección de RFLPs son complejos, implicando la elaboración de genotecas, mantenimiento de sondas, extracción de cantidades considerables de ADN de buena calidad, además de un proceso largo y laborioso de la propia técnica de detección de los marcadores. La calidad de los RFLPs es excelente, especialmente en lo que se refiere a su expresión codominante, y a su repetibilidad dentro de una especie y entre especies relacionadas. Los RAPDs se obtienen por métodos mucho más rápidos y simples, más adaptados a aplicaciones rutinarias asociadas a la mejora genética y también adecuados para la localización de marcadores ligados a genes concretos

en ausencia de mapas genéticos. Su expresión dominante y su poca reproducibilidad entre progenies de la misma especie los hace menos indicados para el mapado. Otros marcadores derivados de la PCR (SCARs, SSRs) mejoran la calidad de los RAPDs, y parecen los marcadores ideales para la mejora, aunque el coste necesario para su desarrollo es elevado. Los AFLPs se obtienen con un método que se basa en la misma fuente de generación de polimorfismos que los RFLPs (fragmentos obtenidos a partir de la digestión del ADN nuclear con enzimas de restricción), y en el uso de la PCR como procedimiento de selección de una parte de estos fragmentos. Los AFLPs son de mejor calidad que los RAPDs y comparten con ellos que pueden obtenerse muchos en poco tiempo, por lo que prometen ser muy útiles para encontrar marcadores próximos a genes de interés. Sin embargo, la complejidad del método hace que para su uso rutinario tengan que convertirse en otros (tipo SCARs) que puedan resolverse con una simple reacción de PCR.

#### 4. MAPAS GENÉTICOS CON MARCADORES EN *PRUNUS*

La mayor parte de los mapas que han sido elaborados hasta el momento en *Prunus* se basan en los marcadores RFLP y RAPD. Excepcionalmente, un mapa con un gran número de isoenzimas ha sido construido en cerezo (Boskovic y Tobutt, 1994). Las principales características de estos mapas se resumen en la Tabla I.

Las descendencias usadas para la construcción de estos mapas provienen de cruzamientos inter e intraespecíficos. En aquellos se busca un alto nivel de polimorfismo, que facilitará posteriormente la construcción del mapa. Esto es particularmente importante en el caso del melocotonero dado su bajo nivel de polimorfismo: solamente el 20% de las sondas usadas por Rajapakse et al. (1995) segregaban en una F2 intraespecífica. Este problema parece menos crítico en el caso de los RAPDs, porque es posible estudiar muchos más marcadores en relativamente menos tiempo y esfuerzo que con RFLPs o isoenzimas.

La población de mejora más común en frutales es la descendencia del cruzamiento entre dos individuos no relacionados y parcialmente heterocigotos, llamada F1 segregante o también doble pseudo-retrocruzamiento. Muchas de las poblaciones para mapado son de este tipo (Tabla I). Las poblaciones F1 plantean algunos problemas específicos para su análisis, ya que: a) el ligamiento tiene que estimarse para todos los pares de loci que segregan de cuatro maneras posibles (1:1, 1:2:1, 3:1 y 1:1:1:1), y b) la fase de los parentales es desconocida, de modo que en las segregaciones del tipo 1:2:1 y 3:1, tienen que considerarse todas las configuraciones de acoplamiento y repulsión para cada parental, incluso la configuración acoplamiento x repulsión que no se produce en ningún otro tipo de cruzamiento. En las descendencias F1 se construyen dos mapas, cada uno con todos los loci heterocigóticos en uno de los dos parentales. Los loci heterocigóticos en ambos padres (segregaciones 3:1, 1:2:1 y 1:1:1:1) sirven como "puentes" entre los dos mapas y permiten compararlos.

**Tabla I.** Mapas de marcadores moleculares construidos en frutales del género *Prunus*.

Cultivo	Descendencia	Nº plantas	Nº marcados	Tipo de marcador <sup>(a)</sup>	Grupos ligamiento <sup>(b)</sup>	Marcadores no ligados	Distancia <sup>(c)</sup>	Referencia
melocotonero	F2	96	95	M (4), I(1), RA(90)	15 (3II+9)	7	396**	Chaparro et al. (1994)
melocotonero	F2	71	65	M(7), RF(46), RA(12)	8	18	338	Rajapakse et al. (1995)
melocotonero	F2	270	53	RA (52), M(1)	8	4	350	Dirlewanger y Bodo (1994)
almendro	F1	60	180	I(7), RF(120), RA(53)	16 (8II)	0	456-476	Viruel et al. (1995) IRTA-Cabrils (no pub.)
cerezo	callos haploides	56	89	RA(87), I(2)	10	3	503	Stockinger et al. (1996)
melocotonero x almendro	F2	64	118	M(1), I(6), RF(111)	9	11	800	Foolad et al. (1995)
almendro x melocotonero	F2	75	205	M(1), I(11), RF(193)	8	6	551	Grupo Europeo de <i>Prunus</i> (no pub.)
melocotonero x <i>P. davidiana</i>	F1	77	112	RA(111), I(1)	13 (5+8)	-	83-536	Dirlewanger et al. (1995)
cerezo x <i>P. nipponica</i>	F1	47	46	I (46)	8	17	146*	Boskovic y Tobutt (1994)

(a) M=morfológico; I=isoenzimas; RF=RFLPs; RA=RAPDs

(b) En paréntesis, numero de grupos de ligamiento homologos (II) + grupos de homología desconocida

(c) Distancias medidas con la transformación de Kosambi excepto en \* que se midieron como % de recombinación y en \*\* que se midieron con la transformación de Haldane.

+ Distancia total de los mapas de los dos parentales. - datos desconocidos

Cuando se usan marcadores dominantes como los RAPD en descendencias F2 también es preciso elaborar dos mapas (Chaparro et al., 1994). Ello es debido a que es difícil estimar el ligamiento entre loci que están en repulsión, y cada uno de los dos mapas contiene solamente los loci en acoplamiento. Los dos mapas pueden compararse usando los loci codominantes como “puentes”.

## 5. MARCADORES LIGADOS A GENES MAYORES Y QTL

Existen ya datos sobre análisis de la cosegregación entre los marcadores usados para la elaboración de mapas y algunos genes mayores. Esto ha permitido la localización de marcadores útiles para su selección. Algunos de estos caracteres tienen poco interés en mejora o pueden ser detectados rápida y fácilmente sin la ayuda de marcadores. Todos ellos están relacionados en la Tabla II con especificación de su distancia genética a los marcadores más próximos.

**Tabla II.** Ligamientos conocidos entre caracteres morfológicos y marcadores

Cultivo	Carácter	Marcad. ligados <sup>(a)</sup>	Distancia cM	Método <sup>(b)</sup>	Referencia
melocotonero	hoja roja/verde	RA (4)	1-5	BSA	Chaparro et al. (1994)
almendro x melocotonero	hoja roja/verde	RF (1)	4	Mapa	IRTA-Cabrils (no pub.)
melocotonero	cto. pilar/normal	RA (2)	8	Mapa	Chaparro et al. (1994)
melocotonero	flor simple/doble	RA (1)	0	Mapa	Chaparro et al. (1994)
melocotonero	cto. enano/normal	RF (5)	0-8	Mapa	Foolad et al. (1995)
melocotonero	porte llorón/normal	RA (2)	11-17	Mapa	Dirlewanger y Bodo (1994)
melocotonero	androesterilidad	RA (1)	6	Mapa	Dirlewanger et al. (1996)
melocotonero	hueso adherente	RF (2)	-	Mapa	Rajapakse et al. (1996)
melocotonero	carne blanda/dura	RF (1)	0	Gen	Lester et al. (1996)
melocotonero	paraguayo/normal	RF (1)	0	Mapa	Dirlewanger et al. (1996)
melocotonero	fruto no ácido	RA (2)	9-11	Mapa	Dirlewanger (com. pers.)
almendro	autoincompatibilidad	RF (4)	5-6	Mapa	IRTA-Cabrils
almendro	almendra dulce/amarga	RA (2)	21-24	BSA	IRTA-Cabrils (no pub.)
almendro	cáscara dura/blanda	RF (2)	2-3	Mapa	IRTA-Cabrils (no pub.)
almendro x melocotonero	color antera (antocianico/amarillo)	RF (2)	2-4	Mapa	IRTA-Cabrils (no pub.)
cerezo	hoja albina/normal	I (1)	5	Mapa	Tobutt y Nicoll (1992)
ciruelo (P.cerasifera)	resistencia a nemátodos	RA(6)	5-13	BSA	Lecouls (1996)

<sup>(a)</sup> I=isoenzimas; RF=RFLPs; RA=RAPDs. En paréntesis número de marcadores ligados

<sup>(b)</sup> Marcadores localizados por estudios de cosegregación con los mapas (Mapa), por el método del 'bulk segregant analysis' (BSA), o a partir de la secuencia del mismo gen (Gen)

El método de análisis de mezclas de ADN o 'bulk segregant analysis' (BSA) se ha usado como una aproximación alternativa al etiquetado de genes con marcadores. Chaparro et al. (1994) encontraron marcadores ligados a dos genes, uno codominante (*Mdh-1*) y el otro con dominancia incompleta (*Gr/gr*) después de examinar los RAPDs obtenidos con 170 cebadores en una población F<sub>2</sub>. Sin embargo, la búsqueda de marcadores fue infructuosa para otros dos genes dominantes. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que en descendencias F<sub>2</sub> este método es dos veces más eficiente si el gen es codominante que si es dominante. El BSA fue usado también por nuestro grupo para encontrar marcadores para los genes que determinan el sabor de la almendra (dulce o amargo) (*D/d*) y la autocompatibilidad (*Sf/S*), usando 60 plantas de dos descendencias F<sub>1</sub> segregantes. Después de estudiar 400 cebadores, encontramos dos marcadores para *D*, pero ninguno para *Sf*. La no localización de marcadores para este gen puede explicarse en parte por la naturaleza dominante de este carácter y por la menor eficiencia de la descendencia F<sub>1</sub> segregante para la BSA en comparación con una F<sub>2</sub> o un retrocruzamiento. La BSA ha demostrado ser útil en muchos otros casos, pero la expresión y tipo de segregación del carácter, así como el tipo de descendencia utilizados son aspectos críticos para la obtención de buenos resultados.

Hay muy pocos datos aún sobre el análisis de caracteres cuantitativos con marcadores en *Prunus*. Dirlewanger et al. (1995) encontraron algunos QTLs tras el análisis de la cosegregación entre marcadores y la resistencia a *Taphrina deformans*, *Sphaeroteca pannosa* y *Myzus persicae* en un cruzamiento entre melocotonero y *P. davidiana*. El carácter de la dureza de la cáscara ha sido también analizado en el cruzamiento entre las variedades de almendro 'Ferragnes' y 'Tuono' (ver Tabla II), y un QTL que explicaba la mayor parte de la varianza de este carácter fue localizado en una zona homóloga del grupo de ligamiento 2 del mapa de ambos cultivares. Cuando se analizó este carácter como si fuera debido a la acción de un solo gen, este se situó en la misma posición que el QTL ya mencionado. No descartamos que otros genes puedan tener un efecto menor en la herencia de este carácter, pero el pequeño tamaño de la población usada (60 individuos) impidió un análisis en mayor detalle.

## 6. MAPADO COMPARATIVO

La construcción de mapas de ligamiento ha permitido la comparación entre genomios de especies próximas y lejanas. Los frutales del género *Prunus* tienen probablemente una organización del genomio muy parecida, ya que comparten el mismo número básico de cromosomas, uno de los contenidos de ADN más pequeños de las especies cultivadas (aproximadamente dos veces el de *Arabidopsis*) y además es posible producir híbridos interespecíficos fértiles entre algunas de estas especies.

Las comparaciones de mapas requieren el uso de marcadores homólogos. Los isoenzimas y RFLPs son adecuados para tales comparaciones, pero el establecimiento de homologías es más problemático con marcadores RAPD. Existen claras similitudes entre los grupos de ligamiento obtenidos con

isoenzimas en diferentes especies de *Prunus* (Arús et al., 1994a). Sin embargo, la mayor parte de los mapas de RFLPs se han construido con sondas diferentes y no pueden compararse. Una excepción son los mapas elaborados por nuestro grupo en almendro y almendro x melocotonero, donde fue posible comparar 66 loci homólogos. Todos ellos han sido localizados en los mismos grupos de ligamiento, generalmente en el mismo orden. Los pocos cambios de orden observados correspondieron a loci estrechamente ligados, lo que se debe más probablemente a errores en la estimación de la posición relativa de estos loci, que a cualquier tipo de cambio estructural. El tamaño de los mapas fue también parecido ( $\approx 500\text{cM}$ ) y no se encontraron diferencias significativas entre las distancias genéticas de los marcadores homólogos más alejados dentro de cada grupo de ligamiento, sugiriendo que los niveles de recombinación también son similares.

## 7. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares han proporcionado una enorme cantidad de información genética en los cultivos frutales, permitiendo su uso en identificación de genotipos y en la evaluación de la diversidad genética de este grupo de especies. También se han usado para la construcción de mapas genéticos, con los que se han localizado marcadores ligados a varios genes de interés en mejora. Es de esperar que en los próximos años se obtengan muchos más resultados de este tipo que permitan la selección asistida con marcadores para la mayoría de los caracteres valiosos de estas especies.

Para que estos resultados puedan obtenerse, es crítico que se pueda disponer de las progenies adecuadas con las que estudiar la cosegregación marcadores-caracteres agronómicos, es decir, poblaciones suficientemente grandes (150-200 individuos como mínimo si hay que estudiar caracteres cuantitativos), no seleccionadas, segregando para los caracteres de interés, y con una edad suficiente como para que los caracteres de flor, fruto y vegetativos puedan medirse adecuadamente. Idealmente, para un carácter determinado, deberían analizarse dos o más poblaciones de diferentes orígenes durante varios años para tener datos completos y fiables. Es difícil encontrar descendencias con estas características, y si no están disponibles, crearlas requiere un período de tiempo muy largo (6-7 años), por lo que son un factor limitante ya que los resultados a corto plazo pueden solamente obtenerse con las poblaciones que ya existen.

Dado que los genomios de *Prunus* son probablemente muy similares tanto a nivel de sintenia entre cromosomas, como de homología de ADN, lo que es seguramente cierto también para otras especies cultivadas de la familia de las rosáceas (manzano, fresón), la posición de genes que afectan a algunos caracteres clave puede ser la misma en diferentes especies, y los marcadores que se desarrollen en una especie serán probablemente útiles en otras.

La semejanza genética entre especies más la dificultad de encontrar poblaciones de mejora debería animar a la colaboración entre mejoradores y grupos de investigación que trabajan en marcadores moleculares aplicados a la

mejora de frutales. Algunos proyectos europeos, uno de ellos en *Prunus* (Arús et al., 1994b), pretende la construcción de mapas de ligamiento usando marcadores y poblaciones comunes. Otros proyectos con objetivos similares están en marcha actualmente en manzano y olivo. Los grupos de investigación Europeos, Norteamericanos y de otros países que trabajan en *Prunus* y en manzano, han intercambiado sondas para RFLPs. Los marcadores obtenidos con estas sondas darán lugar a loci homólogos entre los mapas existentes, permitiendo la unificación y uso común de la información contenida en cada uno de ellos. Estas iniciativas deberían ser potenciadas, ya que acelerarán y simplificarán la obtención de resultados útiles para la selección asistida por marcadores en frutales.

## 8. REFERENCIAS

- Arulsekhar, S., D.E. Parfitt y D.E. Kester. 1986. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *J. Hered.* 77:272-274.
- Arulsekhar, S. y D.E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio and fig. *HortScience* 21(4):928-933.
- Arús, P., C. Olarte, M. Romero y F. Vargas. 1994a. Linkage analysis of ten isozyme genes in F1 segregating almond progenies. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(2): 339-344.
- Arús, P., R. Messeguer, M. Viruel, K. Tobutt, E. Dirlwanger, F. Santi, R. Quarta y E. Ritter. 1994b. The European *Prunus* mapping project. Progress in the almond linkage map. *Euphytica* 77:97-100.
- Battistini, S. y S. Sansavini. 1991. Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot cultivars. *J. Genet. Breed.* 45:117-122.
- Beaver, J.A. y A.F. Iezzoni. 1993. Allozyme inheritance in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118(6):873-877.
- Byrne, D.H. 1990. Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *J. Hered.* 81(1):68-71.
- Byrne, D.H. y T.G. Littleton. 1989. Interspecific hybrid verification of plum x apricot hybrids via isozyme analyses. *HortScience* 24(1):132-134.
- Byrne, D.H. y T.G. Littleton. 1988. Verification of the parentage of presumed peach x almond hybrids by isozyme analyses. *Fruit Varieties J.* 42(4):130-134.
- Cerezo, M., R. Socias i Company y P. Arús. 1989. Identification of almond cultivars by pollen isoenzymes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114(1):164-169.



- Chaparro, J.X., D.J. Werner, D.O'Malley y R.R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87:805- 815.
- Chaparro, J.X., R.E. Durham, G.A. Moore y W.B. Sherman. 1987. Use of isozyme techniques to identify peach x 'Nonpareil' almond hybrids. *HortScience* 22(2):300-302.
- Dirlewanger, E. y C. Bodo. 1994. Molecular genetic mapping of peach. H. Schmidt y M. Kellerhals (Eds.). In: *Progress in Temperate Fruit Breeding* pp:309-311.
- Dirlewanger, E., C. Zuger, J. Kervella, T. Pascal, y R. Monet. 1995. Quantitative trait loci controlling resistance to several pests and diseases in peach (*Prunus persica*) and in a related species, *Prunus davidiana*. *Plant Genome III Conference. Program and Abstracts Guide.* p 34.
- Dirlewanger, E., A. Moing, C. Rothan, L. Svanella, J.P. Gaudillere y R. Monet .1996. Identification of QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Plant Genome IV Abstracts.* January 14-18 ,1996; San Diego (USA)
- Foolad, M.R., S. Arulsekhar, V. Becerra y F.A. Bliss. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91:262-269
- Granger, A.R., G.R. Clarke y J.F. Jackson. 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 86:458-464.
- Gregor, D., W. Hartmann y R. Stösser. 1994. Cultivar identification in *Prunus domestica* using random amplified polymorphic DNA markers. *Acta Horticulturae* 359:33-40.
- Iezzoni, A., D. Wang, T. Brettin, y E. Stockinger. 1995. Strategies for mapping sour cherry (*Prunus cerasus*), a segmental allotetraploid. *Plant Genome III Conference. Program and Abstracts Guide.* p 47.
- Jackson, J.F., y G.R. Clarke. 1991. Gene flow in an almond orchard. *Theor. Appl. Genet.* 82:169-173.
- Lecouls A.C. 1996. Spectre d'activité et marquage moleculaire des genes Ma1 et Ma2 controlant la resistance aux nematodes *Meloidogyne* chez *Prunus cerasifera* (Prunier Myrobolan). *Memoire de D.E.A. Université Pierre et Marie Curie*, Paris.
- Lester, D.R., W.B. Sherman y B.J. Atwell. 1996. Endopolygalacturonase and the melting flesh (*M*) locus in peach. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(2):231-235.

- Messeguer, R., P. Arús y M. Carrera. 1987. Identification of peach cultivars with pollen isozymes. *Scientia Hortic.* 31:107-117.
- Miller, P.J., D.E. Parfitt y S.A. Weinbaum. 1989. Outcrossing in peach. *HortScience* 24(2):359-360.
- Parfitt, D.E., S. Arulsekar y D.W. Ramming. 1985. Identification of plum x peach hybrids by isoenzyme analysis. *HortScience* 20(2):246-248.
- Rajapakse, S., L.E. Belthoff, G. He, A:E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R.E. Ballard, W.V. Baird, A. Callahan, R. Monet y A.G. Abbott. 1995. Genetic mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90(3-4):503-510.
- Rajapakse, S., M. Gannavarapu, B. Sosinski, R. Scorza, A. Callahan, R.E. Ballard, W.V. Baird y A.G. Abbott. 1996. Mapping fruit quality characters in peach. *Plant Genome IV Abstracts*. January 14-18, San Diego (USA).
- Stockinger, E.J., C.A. Mulinix, C.M. Long, T.S. Brettin, y A.F. Iezzoni. 1996. A linkage map of sweet cherry based on RAPD analysis of a microspore derived callus culture population. *J. Hered.* 87:214-218.
- Tobutt, K.R. y R. Boskovic. 1994. Progress in constructing a linkage map for Prunus. *Annual Report of Horticultural Research International 1993-94*, p. 35.
- Viruel, M.A., R. Messeguer, M.C. de Vicente, J. Garcia-Mas, P. Puigdomènech, F. J. Vargas y P. Arús. 1995. A linkage map with RFLP and isozyme markers for almond. *Theor Appl. Genet.* 91:964-971
- Whetten, R. y G. Dale. 1996. Genetic Mapping in Peach. *Plant Genome IV Abstracts*. January 14-18, 1996; San Diego (USA)