

MEMORIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA VEGETAL DEL IRTA
(CENTRO DE CABRILS)

1. INTRODUCCIÓN

El melocotonero (*Prunus persica* (L.) Batsch) es un cultivo de importancia creciente en España, particularmente para producción temprana en las regiones meridionales de la Península. Además tiene una elevado ritmo de sustitución de variedades. Solamente entre los años 1990-96 se comercializaron en el mundo alrededor de 500 nuevos cultivares (Fideghelli et al. 1998). El valor de las nuevas obtenciones es muy elevado, por lo que existe también un gran interés en su protección por parte de los mejoradores, y en el control de su identidad por viveristas o agricultores.

La identificación varietal con datos sobre la morfología y fisiología de los frutales se realiza en ensayos de campo que requieren largo tiempo, generalmente años, de observación. Estos procesos son demasiado lentos para aplicaciones como el control de identidad en vivero o para la protección de los derechos de obtentor. Los marcadores moleculares, basados en la variabilidad del ADN, pueden detectarse en cualquier momento del desarrollo de la planta, y en diferentes tejidos, permitiendo establecer en pocos días un perfil único para cada variedad.

El melocotonero es una de las especies menos variables del género *Prunus* (Byrne, 1990). Ello se debe a su sistema de autocompatibilidad que permite la autofecundación, lo que probablemente ha causado una importante erosión de su variabilidad genética especialmente desde el uso de las técnicas modernas de mejora genética. La baja variabilidad de este cultivo significa que los

marcadores que deben ser utilizados para su identificación han de buscarse entre los de mayor polimorfismo, ya que el uso de marcadores de buena calidad pero poco polimórficos no permite el objetivo de la caracterización individual de cada genotipo (Messeguer et al., 1986).

2. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Al inicio del proyecto se planteó el uso de marcadores de tipo AFLP para los propósitos de estudio de la variabilidad genética de la especie e identificación varietal. Estos marcadores, de obtención relativamente nueva en aquel momento (Vos et al 1995), destacan por su alto polimorfismo y parecieron entonces la mejor opción para nuestros objetivos. En el transcurso del proyecto, sin embargo, se mejoraron algunas técnicas que facilitaron el desarrollo de marcadores de tipo microsatélite en muchas especies, y particularmente en *Prunus*, donde se han publicado recientemente 65 de ellos a partir de secuencias de melocotón (Sosinski et al. 2000; Testolin et al. 2000) y 10 más en cerezo (Cantini et al. 2001). La técnica que permitió este avance fue la de obtención de genotecas enriquecidas con fragmentos microsatélite, con la que fue posible aumentar de manera considerable la eficiencia en la localización de sondas que contienen este tipo de secuencias, reduciendo como consecuencia el coste de desarrollo de estos marcadores.

Los microsatélites representan una mejora sustancial de calidad con respecto a los AFLPs, por las siguientes razones: a) Son marcadores codominantes que generalmente detectan un solo locus; su mayor calidad comparada con marcadores de tipo dominante como los AFLPs los hace mucho más eficientes en análisis de pedigríes y en la transferencia de los resultados a otras poblaciones de la misma especie o de especies muy próximas, b) su método de obtención no está sometido a patente, como en el caso de los AFLPs; este es un aspecto crítico de cara a la utilización comercial de la técnica, c) su nivel de polimorfismo es muy elevado y d) la metodología es más simple que la usada para los AFLPs.

Optamos por tanto en mantener nuestros objetivos de desarrollo y uso de los AFLPs y añadimos a ellos la obtención y análisis de nuevos microsatélites (que abreviaremos como SSRs, por “simple-sequence repeats”). Puesto que consideramos los AFLPs de menor valor, el énfasis de nuestro trabajo ha ido centrándose progresivamente en los SSRs, de modo que finalmente optamos por descartar el mapado de los AFLPs para hacerlo solamente con los SSRs conocidos, tanto los obtenidos dentro del proyecto, como los que hemos podido acceder dentro de los desarrollados por otros grupos.

3. GRADO DE CONSECUCIÓN DE LOS OBJETIVOS

Los objetivos del proyecto los hemos mantenido tal como estaban en la propuesta original, aunque los resultados van a reflejar la introducción de los SSRs además de los AFLPs previstos.

Objetivos concretos:

- a) Puesta a punto de la técnicas de marcadores.

Puede considerarse conseguido para los AFLPs, que era el objetivo inicial. Además, se ha puesto a punto la técnica para microsatélites así como desarrollar un juego de microsatélites propio. Se ha establecido también un protocolo de extracción de ADN en fruto de melocotón y comprobado su efectividad con SSRs y AFLPs.

- b) Estudio de la variabilidad en 200 variedades.

También un objetivo logrado para AFLPs y para SSRs. Los datos de las últimas 100 variedades se han obtenido pero están siendo procesadas en el momento de escribir este informe.

- c) Estudio de la herencia de los marcadores y mapado de los mismos en la descendencia F_2 ‘Texas’ x ‘Earlygold’.

No se han mapado los 40 marcadores AFLP previstos inicialmente, pero en su lugar se ha estudiado la herencia y situado en el mapa un total de 94 marcadores SSR a partir de 131 de ellos obtenidos una parte por nuestro grupo (31) y el resto por otros equipos de investigación. La información aportada es mayor y de mejor calidad que la originalmente prevista, por lo que damos este objetivo por cumplido.

Consideramos por tanto el objetivo general, consistente en el “estudio mediante marcadores moleculares de la variabilidad genética de los distintos grupos varietales de melocotones y nectarinas”, como claramente conseguido a la vista de los resultados obtenidos en los objetivos concretos.

4. CONCLUSIONES Y RESULTADOS ALCANZADOS

a) Puesta a punto de las técnicas de marcadores.

a.1) Extracción de ADN en fruto:

Al estar la protección varietal extendida al producto además del material de reproducción, se hace necesario poder identificar también por marcadores muestras de fruto. Para ello desarrollamos un método relativamente simple de extracción a partir de la piel del melocotón (Aranzana et al., 2000a) que permitía obtener ADN en cantidad y calidad aceptables para los ensayos de AFLPs y SSRs.

a.2) Desarrollo de marcadores AFLPs:

Se obtuvieron buenos resultados usando 500 ng de ADN de melocotonero con el método de Vos et al. (1995) que implica una preamplificación inicial con cebadores con una sola base selectiva y posterior amplificación selectiva con cebadores de dos o tres bases selectivas. Se usaron algunas combinaciones de 2+3 bases selectivas, aunque la gran mayoría de las combinaciones

estudiadas fueron de 3+3 bases. Los enzimas de restricción usados para digerir el ADN fueron *MseI* y *EcoRI*. Se estudiaron los patrones de amplificación de ADN resultantes en un secuenciador capilar automático ABI/Prism 310 con tinción fluorescente. Se ensayaron un total de 80 combinaciones de cebadores en 8 cultivares. De ellos se seleccionaron 9 que detectaban 40 RFLPs para su estudio en la muestra de 215 cultivares de *P. persica*.

a.3) Desarrollo de marcadores SSR

Se obtuvo en primer lugar una genoteca de ADN genómico de la variedad de melocotonero 'Merrill O'Henry' que se enriqueció para fragmentos que contenían el microsatélite (CT)_n usando el método de Billotte et al. (2000) con modificaciones que se describen en Aranzana et al. (2001a). Se escogieron 163 clones de esta genoteca al azar y 99 de ellos hibridaron con una sonda (GA)_n marcada radiactivamente vía Southern blot, indicando que se trataba de sondas que contenían el microsatélite. Se secuenciaron 52 de estas sondas de las que 40 fueron legibles, diferentes y contenían un microsatélite. Para 35 de ellas se pudieron diseñar cebadores y obtener una buena amplificación. De ellos 24, la mayoría correspondiendo a microsatélites con un elevado número de "repeats", fueron polimórficos en una colección de 25 cultivares de melocotón. Se obtuvo, por tanto, un SSR polimórfico por cada 2,17 sondas seleccionadas, lo que es un buen resultado tratándose de que implica las dos etapas más costosas del método (secuenciación y obtención de cebadores) en una especie poco polimórfica.

En las primeras fases del desarrollo de los SSRs, se estudió su patrón de variabilidad en geles de acrilamida y detección radioactiva (α -³³P) en una colección de 25 variedades de melocotonero y nectarina, aunque los microsatélites seleccionados para estudiar las 215 variedades se analizaron en el secuenciador automático tal como se explica en el apartado anterior.

a.4) Comparación entre extractos de ADN de hoja y fruto para AFLPs y SSRs.

Se extrajo ADN de hoja y fruto de 18 cultivares de melocotonero y nectarina con las 9 combinaciones de AFLPs antes mencionadas y 7 microsatélites. Se realizaron tres replicaciones por muestra de ADN (Aranzana et al 2000a).

Los patrones observados para los AFLPs fueron similares entre ambos tejidos, aunque en un 2,5% de los casos se detectaron diferencias consistentes (observadas en todas las replicaciones de un mismo tejido) entre hoja y fruto. La mayor parte de estas diferencias (19 sobre 20 casos) se observaron en 3 AFLPs que presentaban ausencia de banda en ADN de hoja y presencia en ADN de fruto. La mayoría de las discrepancias ocurrían solamente en 6 de las variedades estudiadas. Desconocemos la causa de estos resultados.

Los perfiles observados en SSRs fueron idénticos dentro del mismo individuo, sin observarse diferencia alguna entre ADN de hoja y de fruto, aunque en uno de los SSRs (procedente de *P. cerassus*) no fue posible obtener una buena amplificación en ADN procedente de tejido de fruto para 8 variedades.

Se encontraron inconsistencias entre repeticiones en 16 casos usando AFLPs (1,01%), mientras que en SSRs no se encontró ninguna.

En resumen, ambos métodos permiten la identificación varietal en hojas y frutos, aunque los SSRs aparecen como un método mucho más consistente que los AFLPs.

b) Estudio de la variabilidad en 200 variedades.

b.1) AFLPs: Se ha estudiado la variabilidad para los 40 AFLPs detectados con 9 combinaciones de cebadores en una colección de 215 variedades de melocotonero y nectarina. Cada variedad se analizó independientemente dos veces. Los resultados de identificación de las 100 primeras variedades pueden encontrarse en Aranzana et al. (2000b). Con estos marcadores pudieron identificarse 97 de los 100 genotipos posibles. El porcentaje de identificación individual fue menor para el conjunto de las 215 variedades (92%), aunque estos resultados están aún en proceso y son por tanto provisionales.

b.2) SSRs: Se han realizado varios estudios parciales con estos marcadores. Todos los datos obtenidos lo han sido también por duplicado. En primer lugar se analizó una muestra de 38 microsatélites polimórficos en 25 variedades (Aranzana et al 2001a y 2001c). Estos marcadores detectaron un total de 135 alelos (3,5 alelos por microsatélite), con una variación entre 7 y 2 alelos en los SSRs más y menos polimórficos. Todas las variedades a excepción de dos, 'Spring Lady' y 'Queen Crest', podían distinguirse entre sí para muchos microsatélites. En realidad para identificar individualmente a todas las variedades menos esta pareja solamente fue necesaria la variación de 3 microsatélites seleccionados. Lo que estos datos indican con alta probabilidad es que 'Spring Lady' y 'Queencrest' deriven por mutación somática de un solo genotipo. En el caso de 'Queencrest' se sabe que es una mutación de 'Maycrest', que a su vez lo es de 'Springcrest', no hay datos sobre el pedigrí de 'Spring Lady' (Okie, 1998), sin embargo, todas estas variedades tienen otros caracteres morfológicos en común, como la flor rosácea, las glándulas del pecíolo reniformes y el fruto es un melocotón amarillo de carne blanda y hueso adherente.

Se estudió también en una primera fase la variación de 100 variedades, las mismas que para AFLPs, para 7 microsatélites (Aranzana et al. 2000b). Se detectaron 32 alelos que permitieron detectar 78 genotipos de los 100 posibles. Combinando estos datos con los de los AFLPs, podían identificarse todas las variedades a excepción de una pareja 'Queen Lady' y 'Spring Belle'.

Los datos actualmente disponibles sobre 15 SSRs permiten provisionalmente distinguir a 198 de los 215 genotipos analizados. Aunque estos resultados están en proceso, parece muy probable que buena parte de los individuos no detectados corresponda en realidad a 'sports' de variedades existentes por lo que la identificación individual de las variedades originadas de la reproducción sexual sería prácticamente del 100%.

c) Estudio de la herencia de los marcadores y mapado de los mismos en la descendencia F₂ 'Texas' x 'Earlygold'.

Se estudiaron un total de 131 microsatélites procedentes de diversos orígenes en los parentales y 75 plantas de la población 'Texas' x 'Earlygold' ('TxE') Aranzana et al. (2001b y 2001e). En esta población se dispone en la actualidad de un mapa con 374 marcadores, RFLPs en su práctica totalidad, del que existe publicada una primera versión con 247 marcadores (Joobeur et al., 1998) que es por el momento el mapa más detallado del género. Las características sobre el origen de los microsatélites empleados se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Microsatélites usados en el estudio de ligamiento con la población 'TxE'

Origen	No. Tes-tado	Poli-mórficos en TxE	No de loci	Terminología	Especie	Referencia
IRTA, España	31	25	32	CPPCT-	<i>Prunus persica</i>	Aranzana et al. (enviado)
INRA, Francia	40	26	27	BPPCT-	<i>P. persica</i>	Dirlewanger et al. (en preparación)
Universidad de Udine, Italia	26	15	15	UDP-	<i>P. persica</i>	Testolin et al. 2000
Clemson University, USA	12	9	9	pch- or B-	<i>P. persica</i>	Sosinski et al. 2000
HRI- Wellesbourne, UK	12	5	5	PS- or MS-	<i>P. cerasus</i>	Sosinski et al. 2000
Michigan State University, USA	10	6	6	PCe- or pms	<i>P. cerasus</i>	Cantini et al. 2001
TOTAL	131	86	94			

Los 94 marcadores detectados se situaron en los 8 grupos de ligamiento (G1-G8) del mapa de 'TxE' (Figura 1), que muy probablemente corresponden cada uno de ellos a uno de los 8 cromosomas del género. En conjunto, la cobertura del mapa con SSRs fue del 84% (Tabla 2). El número de ellos encontrado en cada grupo de ligamiento no fue significativamente diferente del esperado considerando el número de marcadores ya mapado en cada grupo ($\chi^2=7.78$; n.s.). Con la excepción de algunas agrupaciones de SSRs en G5 y G7, la distribución de marcadores siguió un patrón aparentemente al azar.

Tabla 2. Situación de los marcadores SSR en los grupos de ligamiento de 'TxE'

Grupo ligamiento	SSRs	Otros marcadores	Total marcadores	Distancia total (cM)	Distancia cubierta por SSRs (cM)	% Distancia cubierta por SSRs
G1	21	59	80	90	86	96
G2	10	29	39	48	39	81
G3	7	36	43	56	36	64
G4	14	28	42	67	63	94
G5	12	21	33	53	44	83
G6	11	30	41	88	85	97
G7	12	23	35	81	66	81
G8	7	21	28	64	42	66
TOTAL	94	247	341	547	461	84

Figura 1. Mapa genético de los grupos 1 a 4 de 'TxE' con la posición de los marcadores SSR (indicada por la flecha situada a la izquierda).

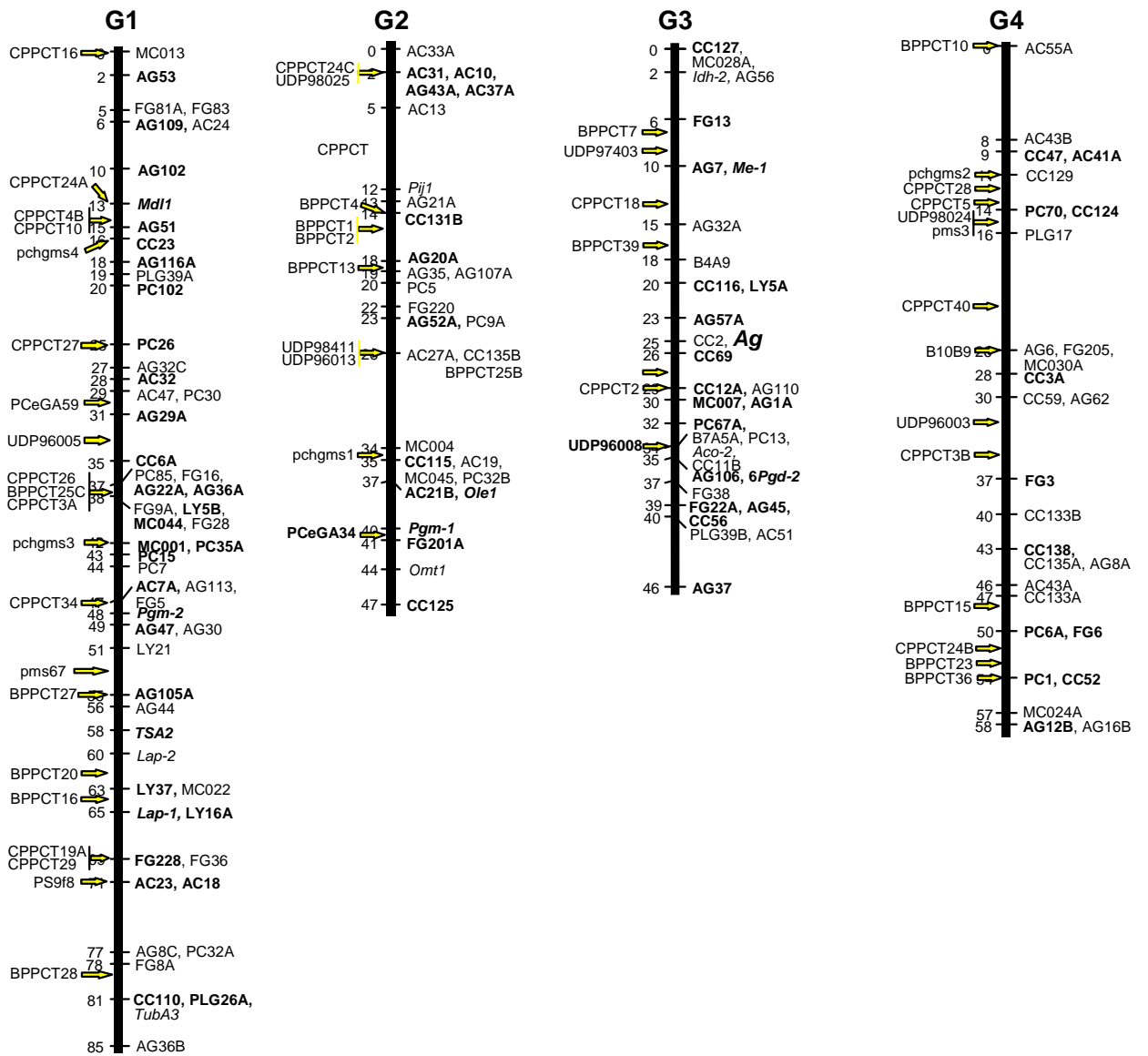
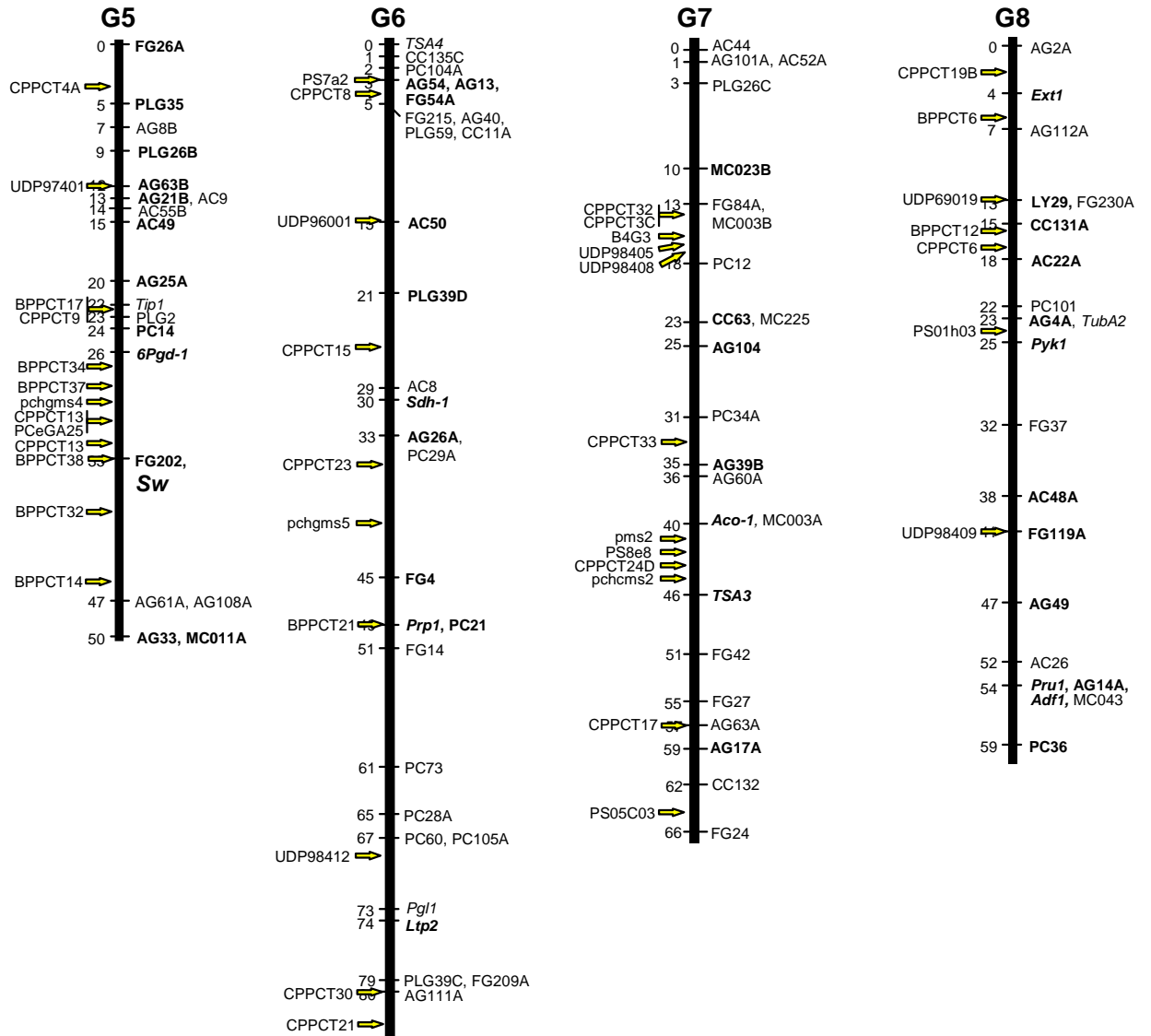


Figura 1 (continuación). Mapa genético de los grupos 5 a 8 de 'TxE' con la posición de los marcadores SSR (indicada por la flecha situada a la izquierda)



5. APLICACIÓN AL SECTOR Y POSIBLE DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Hay tres aspectos en el que los datos son de aplicación inmediata o están ya siendo aplicados:

5.1. IDENTIFICACIÓN VARIETAL:

Con los marcadores desarrollados, tanto AFLPs como SSRs es posible identificar la inmensa mayoría de las variedades de melocotonero con un nivel de precisión muy elevado. Por su simplicidad, calidad y reproducibilidad nos parece recomendable usar los SSRs mejor que los AFLPs. Con los datos obtenidos en las variedades estudiadas disponemos una base de datos muy completa de las variedades existentes en el mercado, lo que puede ser útil para compararlas con muestras problema de origen desconocido o dudoso. Seleccionando del orden de 15 a 25 microsatélites entre los más variables es suficiente como para obtener un patrón molecular de cada variedad con una probabilidad ínfima de que otro genotipo tenga este mismo perfil por azar.

Muchos de los microsatélites disponibles son también variables en otras especies de *Prunus*, lo que permite extender su uso a un número mucho mayor de variedades que las estudiadas.

5.2. SELECCIÓN DE PARENTALES EN PROYECTOS DE MEJORA

En una especie con bajo nivel de variabilidad genética como el melocotonero, es importante tener estimas fiables de la misma que permitan escoger dentro de un conjunto de posibles parentales aquellos que son más distantes. Con ello es posible maximizar la variabilidad seleccionable o potenciar el vigor híbrido. Esto puede hacerse con marcadores moleculares mejor que con cualquier otro procedimiento conocido (Tanksley y Mc Couch, 1997). Dentro del proyecto hemos suministrado al equipo del IVIA información sobre distancias genéticas entre las variedades estudiadas y un grupo de parentales de especial interés como genitores del programa de mejora del melocotón.

El mismo estudio de variabilidad (Aranzana et al, 2001a), nos ha permitido detectar algunos grupos (nectarinas) poco polimórficos y otros (melocotones de carne dura), especialmente distantes del germoplasma típicamente utilizado en mejora. Parece, por tanto, que el uso de variedades locales de carne dura puede aportar variabilidad genética aprovechable en la mejora de esta especie.

5.3. SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES EN MELOCOTONERO

La construcción de un mapa con SSRs representa un claro paso adelante hacia la selección asistida con marcadores en melocotonero, superando en parte la limitación que la baja variabilidad de la especie imponía a otros tipos de marcadores (como los RFLPs). El promedio de heterocigosidad observada en variedades de melocotonero para SSRs se sitúa en 35-40%, un nivel muy superior a cualquier otro tipo de marcadores de calidad semejante. Los marcadores existentes permitirían obtener ya mapas de muchos cruzamientos con una cobertura del genoma suficiente como para poder estudiar su cosegregación con caracteres cuantitativos, que son los más importantes en la mejora del melocotón.

Finalmente, el conocimiento de la posición de estos microsatélites en el mapa de *Prunus* puede ser también muy útil para el establecimiento de comparaciones entre mapas de diversas poblaciones o especies de este género, permitiendo localizar la posición de genes mayores o QTLs detectados e ellas en un mapa consenso.

5.4. DIFUSIÓN

Hemos escrito un artículo en la revista Fruticultura Profesional (Aranzana et al., 2001c) y presentado un cartel en el Congreso de la SECH (Aranzana et al 2001d) con el objeto de informar a sector e investigadores hortícolas sobre el interés de los SSRs para identificación varietal y mejora.

La actividad de identificación varietal en frutales en el IRTA está canalizada desde Julio de 1999 a través de su servicio IRTAGen, al que hemos transferido la información obtenida en este trabajo para que pueda atender las demandas que surjan en el sector dentro de este campo.

6. COLABORACIONES Y AYUDAS RECIBIDAS Y PRESTADAS

Recibimos información sobre cebadores para amplificar SSRs antes de su publicación por parte de G. King (HRI-Wellesbourne, R.U.); A. Abbott (Clemson University, U.S.A.), A. Iezzoni (Michigan State University, USA) y R. Testolin (Universidad de Udine, Italia).

J-C. Glaszmann y J.L. Noyer del CIRAD de Montpellier nos proporcionaron un protocolo de obtención de genotecas enriquecidas con microsatélites que usamos en el desarrollo de nuestra colección de SSRs.

Fuimos visitados por Javier Ascasibar, estudiante de doctorado de Santiago Pereira Lorenzo, profesor de Universidad de Lugo, que aprendió las técnicas de SSRs en nuestro laboratorio y colaboró en la obtención del mapa.

Colaboramos con el grupo de investigación del INRA de Burdeos que dirige Elisabeth Dirlewanger, proporcionándoles una alícuota de nuestra genoteca que ellos han usado en la obtención de 40 nuevos microsatélites que nosotros hemos colocado ya en el mapa.

Hemos proporcionado información sobre nuestros SSRs a I. Hormaza (CSIC-La Mayora), A. Iezzoni (Michigan S.U.), M. Badenes (IVIA- Valencia), A. Abbott (Clemson U.), D. Esmenjaud (INRA-Aviñón) y M. A. Moreno (CSIC-Aula Dei), para ser usados en sus programas de investigación en frutales.

La colaboración de Albert Pineda Rodó durante estos últimos meses como parte de su trabajo fin de carrera de la Universidad de Lleida ha permitido completar el mapa de SSRs con los marcadores del INRA de Burdeos.

7. VINCULACIÓN DEL PROYECTO A PROGRAMAS INTERNACIONALES

Además de las colaboraciones puntuales descritas en los apartados anteriores nuestro equipo forma parte de un proyecto europeo encaminado a la búsqueda de variedades de frutales resistentes a nematodos (FAIR6-CT98-4139). Las colaboraciones con E. Dirlewanger y D. Esmenjaud del INRA forman parte de la actividad de dicho proyecto.

Como actividades adicionales relacionadas con la cooperación internacional, hemos solicitado un proyecto USDA coordinado por Albert Abbott (Clemson U.) sobre genómica del melocotón. También durante este período hemos solicitado un proyecto europeo sobre la utilización de marcadores de tipo microsatélite para la mejora de resistencias a enfermedades liderado por R. Testolin (U. Udine).

8. REFERENCIAS CITADAS

- Aranzana, M.J., M.C. de Vicente and P. Arús. 2000a. Comparison of fruit and leaf DNA extracts for AFLP and SSR analysis in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Acta Horticulturae* 546:297-300
- Aranzana, M.J., J. Carbó, G.J. King and P. Arús. 2000b. AFLP and SSR markers for genetic diversity analysis and cultivar identification in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Acta Horticulturae* 546:367-370
- Aranzana, M.J., J. Garcia-Mas, J. Carbó and P. Arús. 2001a. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. Enviado a Plant Breeding.
- Aranzana, M.J., J. Ascacibar, J. Garcia-Mas and P. Arús. 2001b Development and mapping of a set of SSRs covering most of the *Prunus* genome. (póster). "Plant and Animal Genome Conference". San Diego (USA). Enero 2001
- Aranzana, M.J., J. Ballester, J. Carbó, y P. Arús. 2001c. Microsatélites: marcadores de alta eficiencia para la identificación varietal en melocotonero. *Fruticultura Profesional*. Nº 118, Mayo-Junio 2001.
- M.J. Aranzana, J. Carbó, J. Ballester y P. Arús. 2001d. Los marcadores de tipo microsatélite son altamente eficientes para la identificación varietal en melocotonero (póster). Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas. Cáceres, Mayo de 2001.
- M.J. Aranzana, P. Cosson, A. Pineda, J. Ascacibar, E. Dirlewanger and P. Arús. 2001e. A set of microsatellite markers covering the almond x peach linkage map. (poster) International pistachio and almond conference. Zaragoza, Mayo 2001
- Billote, N., P. J. L. Lagoda, A. M. Risterucci, and F. C. Baurens, 1999: Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277-288.
- Byrne, D. H., 1990: Isozyme variability in four diploid stone fruits compared with other woody perennial plants. *J. Hered.* **81**, 68-71.
- Cantini, C., A.F. Iezzoni, W.F. Lamboy, M. Boritzki and D. Struss. 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(2):205-209.

- Cipriani, G., G. Lot, W. G. Huang, M. T. Marrazzo, P. E., and R. Testolin, 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.
- Fideghelli, C., G. Della Strada, F. Grassi, G. Morico, and R. Monet, 1998: The peach industry in the world: present situation and trend. *Acta Horticulturae* **465**, 29-40.
- Joobeur, T., M. A. Viruel, M. C. de Vicente, B. Jáuregui, J. Ballester, M. T. Dettori, I. Verde, M. J. Truco, R. Messeguer, I. Batlle, R. Quarta, E. Dirlewanger, and P. Arús, 1998: Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using an almond x peach F₂ progeny. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 1034-1041.
- Messeguer, R., P. Arús, and M. Carrera, 1987: Identification of peach cultivars with pollen isozymes. *Scientia Hortic.* **31**, 107-117.
- Okie, W. R., 1998: *Handbook of Peach and Nectarine Varieties*. Agricultural Research Service.
- Sosinski, B., M. Gannavarapu, L. D. Hager, E. Beck, G. J. King, C. D. Ryder, S. Rajapakse, W. V. Baird, R. E. Ballard, and A. G. Abbott, 2000: Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 421-428.
- Tanksley S.D. and McCouch S.R. 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063-1066, 1997.
- Testolin, R., T. Marrazzo, G. Cipriani, R. Quarta, I. Verde, M. Dettori, M. Pancaldi, and 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., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.*, **23**: 4407-4414.